



REPUBLIQUE DU BENIN

MINISTRE 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 : 42/EDSV

Année académique : 2012-2013

Présentée par : **Razaki Adiho OSSE**
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI
OPTION : ENTOMOLOGIE MEDICALE ET VETERINAIRE

Evolution des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme après l'arrêt de la pulvérisation intradomiciliaire dans le département de l'Ouémé, au Bénin.

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Président : Ousmane FAYE, Professeur Titulaire, Université Cheikh Anta Diop, Sénégal
Directeur de Thèse : Martin AKOGBETO, 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
Pierre ATACHI, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin
Examineurs : Kabirou MOUTAÏROU, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin
Nestor SAKITI, Maître de Conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Date de soutenance : 05 Juin 2013. **Mention :** Très honorable avec les félicitations du jury

A mon Père
Iliass Odjoundé OSSE,
Sois heureux d’assister à la présentation de ce travail.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce document ont été menés au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) sous la direction du Pr Martin AKOGBETO que je remercie sincèrement pour m'avoir offert des conditions de travail idéales, tant sur le plan matériel et logistique que managérial. Ils ont été soutenus financièrement par l'Initiative Présidentielle de Lutte contre le Paludisme du Gouvernement Américain. Merci au Gouvernement Béninois à travers le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour nous avoir dotés d'une allocation et d'un appui financier à la recherche de 2010 à 2012.

Nous arrivons tous dans ce monde dans les mains des Hommes et nous dépendons des Hommes pendant les premières années de notre vie. Quand nous quittons ce monde, c'est encore les Hommes qui s'occupent de la gestion de notre dépouille mortelle. Nul succès n'est donc possible sans la contribution des Hommes et nul mérite ne peut s'envisager en dehors des opportunités créées par les Hommes. Nous sommes tous, puissants comme faibles, redevables des autres dans nos succès et nous devons faire preuve de gratitude. 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. J'aimerais aujourd'hui pouvoir les remercier :

- Son Excellence Madame le Ministre de la Santé, Dorothée A. KINDE GAZARD pour tous les efforts personnels qu'elle a accomplis pour la mise en œuvre de la campagne de pulvérisation intradomiciliaire et de distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action dans l'Ouémé.

- Monsieur Martin AKOGBETO, Professeur titulaire au Département de Zoologie de l'Université d'Abomey-Calavi et Directeur du CREC, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Très cher Maître, je suis arrivé en DIT (Diplôme d'Ingénieur des Travaux en Analyse Biomédicale) au CREC où vous m'avez offert l'opportunité de faire un stage avec vous et je ne le regrette pas. Vous m'avez formé, soutenu et inculqué les notions qui m'ont permis d'évoluer et d'avancer. Je n'aurais pas eu la chance de faire partie de la première promotion du Master d'Entomologie Appliquée et faire cette thèse sans votre soutien. Je vous suis très reconnaissant pour votre encadrement exemplaire. Merci de m'avoir fait aimer l'entomologie de terrain, apprécier la beauté de l'anophèle, progresser sur le chemin de l'autonomie, vous êtes un exemple pour moi. Votre simplicité, votre jovialité, votre amour du travail bien fait, votre excellente qualité dans la gestion des ressources humaines et

matérielles, votre rigueur scientifique et l'endurance dont vous faites preuve ont toujours forcé notre admiration. Daignez trouver ici le témoignage de notre gratitude.

- Professeur Ousmane FAYE, malgré vos nombreuses occupations, vous avez accepté d'être rapporteur de ma thèse, veuillez recevoir mes sincères remerciements. Merci pour l'honneur que vous me faites à nouveau en acceptant de présider le jury qui évalue cette thèse.

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

- Professeur Pierre ATACHI, recevez ici mes sincères remerciements pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

- Professeur Kabirou MOUTAÏROU, sincère merci à vous pour avoir accepté de participer à ce jury.

- Professeur Nestor SAKITI, vous m'aviez enseigné la parasitologie en première année de 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.

- Mesdames et Messieurs Marie-Claire Henry, Fabrice Chandre, Vincent Corbel, Thierry Baldet, Thibaut Martin, Frank Remoué, Cédric Pennetier, Sylvie Cornelié, Alain Nahum, Raphaël N'Guessan, Alex Asidi, Luc Djogbénou chercheurs dont j'ai fait la connaissance au CREC. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour notre fructueuse et franche collaboration.

- Monsieur Joseph Chabi, pour tes conseils et ta constante disponibilité. Ton accueil chaleureux lors de mon passage à l'IRD m'a permis de faire mon premier pas dans l'identification morphologique des moustiques. C'est le lieu de vous dire merci pour les forts moments passés ensemble.

- Monsieur Gil Germain Padonou, Armel Djènonatin et Anges Yadouléton, chers aînés, j'ai bénéficié de précieux conseils de votre part et nos échanges m'ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Recevez à travers ce document, nos sincères remerciements.

- Monsieur Rock Aïkpon mon collègue de bureau, je voudrais te dire grand merci pour ton noble soutien, ta sincère collaboration et pour les moments forts vécus ensemble au cours de mon Master et de la présente thèse au CREC.

- Mes chers amis Christian Agossou, Maurille Elégbédé, Augustin Koudamiloro, Filémon Tokponnon, Odile Aïmihoué, Cyriaque Azondékon, Yoa Mario, Yarou Boni de la première

promotion de Master d'Entomologie Appliquée de la FAST je voudrais vous dire un chaleureux merci pour rappeler l'ambiance conviviale de nos relations qui sont demeurées très solidaires.

- Mes autres collègues du bureau notamment Renaud Govoétchan, Arthur Sovi et Rodrigue Agossa, j'ai partagé avec vous au cours de cette thèse beaucoup de choses et nos échanges m'ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Je vous dis un sincère merci.

- Je tiens aussi à remercier mesdames et messieurs Yamadjako Médard, Clémence Durand, Balbine Kindji, Noukpo Herbert, Lin Atigli, Félix Zouménou, Narcisse Hounmassè, Oriane Nadège Aïcheou, Cyrille Agoli-Agbo, Ibrahim Sidick, Guedou Etienne, Arouna Salé, Aziz Bouraïman, Lazare Houkanrin, Saka Alabi, Issiaka Adélodjou, Pélagie Boko, Abibatou Odjo, Alia Roland, Vigninou Estelle, Clémence Mètonnou, Eugène Zinzalo, Hubert Tagon, Bio Bangana Sahabi, Innocent Djègbé, Emmanuel Elanga, Ola Boussari, Georgia Damien, Jean-Robert Klotoé, Carline Santos, Barnabas Zogo, Pape Dramé, Nicolas Moiroux, Azondékon Roseric, Chéhouéno Clément, Fagbohoun Josias, Kèlomey Audes, Oumbouké Achille, Zogo Barnabas, Fongnikin Augustin, Ole-Sangba-Zelo Marina, Agbanrin Y. Ramziath, Ahounou Daniel, Attolou Roseline, Aïzoun Nazaire, Ganhoutode S. Gabriel, Toffodji Ulrich, Gnanguenon Virgile, Hounkanrinkpè Firmin, Klotoé Armand, Badirou Kéfilath, Richard Houssou, Faizil Kifouly, Désiré Aikpé, et tous les étudiants en Master d'Entomologie Appliquée, qui sont mes amis et collaborateurs du CREC.

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

- Une attention particulière à Olivier Oussou, pour sa contribution et sa motivation sans faille sur le terrain pendant plusieurs mois dans le cadre des activités de la présente thèse, mille mercis pour ta précieuse contribution.

Il nous est également très agréable d'adresser de vifs remerciements à :

- Les autorités politico-administratives et sanitaires des communes prospectées, les captureurs et toutes les populations de ces communes dont la confiance et l'amitié ont permis de surmonter les multiples difficultés rencontrées.

- Mes chers collègues Sofiou Yessoufou, Edgard Tchéoubi et Mouïnath Souradjou, recevez à travers ce document, la marque de notre profonde amitié.

Enfin, nous ne saurions oublier tous les parents auprès de qui nous avons toujours trouvé réconfort et appui, en particulier :

- Mes chers père et mère, jamais je ne trouverai les mots exacts pour vous exprimer tout mon amour, mon admiration et ma fierté. Puisse Dieu vous garder encore longtemps auprès de nous car nous n'aurons jamais fini d'avoir besoin de vous.
- Messieurs Sikirou Ossè et Galy Elégbédé. Merci pour l'encouragement et les soutiens dont vous m'avez fraternellement comblé.
- Mes oncles et tantes, je ne vous rendrai jamais assez l'affection que vous me donnez si gracieusement.
- Tous les membres de ma belle famille, sincère merci pour toutes vos contributions.
- Mes sœurs Raoufath, Isbath, Azimanth, Bakiath et mon frère Wadjid, je n'exprimerai jamais assez tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes et vous serez toujours mes premiers compagnons pour la vie. Je vous souhaite beaucoup de courage et de chance dans la vie pour qu'ensemble, nous puissions adoucir et remplir de bonheur les vieux jours de nos parents.
- Mes cousins et cousines, vous avez tous contribué d'une façon ou d'une autre à mon bonheur actuel. C'est pour cela que cette thèse est aussi la votre.
- Kabirath ma chère épouse et Andilath Achabi mon adorable fille, votre présence à mes côtés est un bien précieux pour tout ce que j'entreprends dans ma vie. Je n'ai pas assez de mots pour exprimer mes sentiments. Merci pour votre confiance et votre compréhension à supporter mes multiples absences et conséquences de mes études.
- Je dis enfin merci à tous ceux dont les noms n'ont pu être cités.

Tables de matières

Liste des sigles et abréviations	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des annexes	6
 Chapitre 1: Introduction et généralités	7
1. Introduction générale.....	8
2. Généralités.....	15
2.1. Définition du paludisme.....	15
2.2. Anophèles vecteurs du paludisme.....	17
2.3. Méthodes de lutttes antivectorielles.....	20
2.3.1. Lutte contre les larves.....	21
2.3.2. Lutte contre les adultes.....	21
2.3.3. Réduction du contact homme-vecteur.....	23
2.4. Insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle.....	23
2.4.1. Organochlorés.....	25
2.4.2. Organophosphorés.....	25
2.4.3. Carbamates.....	26
2.4.4. Pyréthriinoïdes.....	26
2.4.5. Phényl pyrazole.....	26
2.4.6. Régulateurs de croissance.....	27
2.4.7. Toxines bactériennes.....	27
2.5. Répulsifs.....	28
2.6. Résistance de <i>An. gambiae</i> s.l aux insecticides.....	29
2.6.1. Mécanismes de résistance.....	29
2.6.1.1. Résistance comportementale.....	31
2.6.1.2. Résistance métabolique.....	31
2.6.1.3. Résistance physiologique.....	31
2.6.1.3.1. Détoxification accrue.....	31
2.6.1.3.2. Résistance par modification de cible.....	33
2.6.2. Impact de la résistance sur les programmes de lutte contre les vecteurs.....	33
2.7. Stratégies de gestion de la résistance.....	34

2.7.1. Utilisation d'insecticides ayant une autre cible.....	35
2.7.2. Utilisation de mélanges d'insecticides.....	35
2.7.3. Concept d'association des moustiquaires et de la PID (ou bâches murales imprégnées).....	36

Chapitre 2: Matériels et méthodes.....37

1. Cadre de l'étude.....	39
1.1. Climat.....	39
1.2. Végétation.....	42
2. Sites d'étude.....	42
3. Mise en place du 3 ^{ème} et du 4 ^{ème} tour de la PID.....	46
4. Mise en place des MIILD: campagne de distribution des Olyset.....	47
5. Evaluation des indicateurs entomologiques dans les zones d'étude.....	48
5.1. Méthodes d'échantillonnage des moustiques.....	48
5.1.1. Capture de nuit sur homme.....	48
5.1.2. Capture par piège fenêtre.....	49
5.1.3. Collecte des larves.....	50
5.1.4. Elevage des larves.....	51
5.2. Identification et traitement des moustiques.....	52
5.3. Bioessais.....	53
5.3.1. Test de sensibilité.....	53
5.3.2. Bioessai sur les supports traités.....	54
5.3.3. Tests d'efficacité des moustiquaires.....	56
6. Identification des espèces et formes moléculaires au sein du complexe <i>An. gambiae</i> s.l. et caractérisation moléculaire des gènes de résistance <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i>	57
7. Enquête sociologique sur l'utilisation des moustiquaires distribuées par le PNLP.....	57
8. Analyses statistiques.....	60

Chapitre 3: Dynamique de population des Culicidae et de l'infectivité de *Anopheles gambiae* pour *Plasmodium falciparum* à la dernière campagne de pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide au bendiocarb au Bénin.....62

1. Résultats.....	64
1.1. Variation de l'agressivité de <i>An. gambiae</i> sur homme (ma) avant et après intervention PID et dans la zone témoin.....	64

1.2. Variation de l'agressivité des <i>Mansonia spp</i> et <i>Culex spp</i> sur homme avant et après intervention PID dans la zone témoin.....	66
1.3. Efficacité du 3 ^{ème} tour de la PID sur le taux d'inoculation entomologique (TIE) dans les zones traitées.....	67
1.4. Diminution spectaculaire de la longévité de <i>An. gambiae</i> dans les communes sous intervention PID.....	67
1.5. Exophilie induite sur les moustiques dans les communes sous intervention PID.....	68
a) Chez <i>An. gambiae</i>	68
b) Chez <i>Mansonia spp</i> et <i>Culex spp</i>	68
1.6. Impact du 3 ^{ème} tour de la PID sur le taux de gorgement des moustiques dans les zones traitées.....	69
2. Discussion.....	71
3. Conclusion.....	73

Chapitre 4: Etude du taux de couverture et d'utilisation des moustiquaires

imprégnées à longue durée d'action et leur efficacité sur les populations de <i>Anopheles gambiae</i> résistantes aux pyréthrinoïdes.....	74
1. Résultats.....	77
1.1. Nature des moustiquaires imprégnées rencontrées et taux de distribution des Olyset par commune.....	77
1.2. Taux de couverture des moustiquaires par commune.....	78
1.3. Taux d'utilisation des moustiquaires dans les communes visitées.....	78
1.4. Position et emplacement des moustiquaires dans les ménages par commune.....	79
1.5. Etat physique des Olyset après 6 mois d'utilisation.....	80
1.5.1. Etat de propreté.....	80
1.5.2. Degré d'usure.....	81
1.6. Efficacité des Olyset après 6 mois d'utilisation.....	84
1.7. Fréquences alléliques de la mutation <i>Kdr</i> observées chez les morts et survivants de <i>An. gambiae</i> issus des tests d'efficacité.....	85
2. Discussion.....	86
3. Conclusion.....	90

Chapitre 5 : Impact de l'arrêt de la PID sur la transmission du paludisme dans l'Ouémé: évolution des indicateurs entomologiques dans les zones sous couverture universelle des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action..... 91

1. Résultats.....	93
1.1. Biodisponibilité du bendiocarb sur les supports traités après 4 tours de PID de 2008 à 2010.....	93
1.2. Comportement de <i>An. gambiae</i> après arrêt de la PID.....	98
1.2.1. Comparaison des taux de piqûres de moustiques sur homme (PHN) enregistrés pendant la campagne PID et après l'arrêt de la PID.....	98
1.2.2. Pluviométrie, un facteur déterminant du contact homme-vecteur.....	101
1.2.3. Réduction de l'exophilie après l'arrêt de la PID chez <i>An. gambiae</i>	103
1.2.4. Augmentation de la longévité des anophèles après l'arrêt de la PID.....	104
1.2.5. Augmentation du taux de gorgement des moustiques à l'intérieur des maisons après l'arrêt de la PID.....	105
1.3. Impact de l'arrêt de la PID sur le taux d'inoculation entomologique (TIE) dans les zones sous intervention PID.....	106
2. Discussion.....	112
3. Conclusion.....	115

Chapitre 6: Résistance des vecteurs aux insecticides après l'arrêt de la PID: évolution et signification opérationnelle: mesure de quelques paramètres indirects d'impact de la résistance. Relation entre le portage des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* et la présence de l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum* chez *An. gambiae* s.s.....116

1. Résultats.....	119
1.1. Surveillance de la résistance de <i>An. gambiae</i> aux insecticides dans les différentes communes après l'arrêt de la PID.....	119
1.1.1. Evolution de la résistance des vecteurs aux insecticides.....	119
a) Avec la perméthrine.....	119
b) Avec le DDT.....	119
c) Avec la deltaméthrine.....	119
d) Avec le bendiocarb.....	120
1.1.2. Evolution des mécanismes de résistance des vecteurs dans les zones d'étude.....	122
1.2. Relation entre le portage des gènes de résistance <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i> et la présence de l'antigène circum sporozoïtique de <i>P. falciparum</i> chez <i>An. gambiae</i> s.s.....	123

1.2.1. Fréquence allélique des mutations <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i> chez les formes moléculaires M et S	123
1.2.2. Indice de positivité en antigène circum sporozoïtique de <i>P. falciparum</i> chez les formes M et S de <i>Anopheles gambiae</i>	124
1.2.3. Génotypes et phénotypes des gènes <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i> chez les <i>An. gambiae</i> s.s. positifs et non positifs en antigène CS de <i>P. falciparum</i>	125
2. Discussion.....	127
3. Conclusion.....	130
 Chapitre 7: Discussion générale, conclusion et perspectives	131
1. Niveau de la transmission du paludisme au cours de la campagne PID.....	132
2. Niveau de la transmission du paludisme après le remplacement de la PID par les moustiquaires imprégnées.....	133
3. Efficacité des MIILD et leur acceptabilité par la population de l'Ouémé.....	134
4. Dynamique de la résistance de <i>An. gambiae</i> aux insecticides après trois ans d'utilisation du bendiocarb en PID dans l'Ouémé et gestion de la résistance des vecteurs.....	135
 Références bibliographiques	139
 Annexes	161

Liste des sigles et abréviations

Ace-1: Acetylcholinesterase

An: *Anopheles*

ASECNA: Agency for Aerial Navigation Safety in Africa and Madagascar

C : Carbamate

COEs: Carboxylestérases

CREC : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

CS: Circum Sporozoïtique

CSP: Circum Sporozoïtic Protein

CTA: Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

CYPs: Cytochromes P450

DDT: Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

DEET: Diéthyl-m-Toluamide

DIT : Diplôme d'Ingénieur des Travaux

EC : Concentré émulsifiable

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAST: Faculté des Sciences et Techniques

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GR : Granulés

GSTs: Glutathion-S-Transférases

IAS: Indice d'Antigène Sporozoïtique

IC: Intervalle de Confiance

IDR: Incidence Density Ratio

IGN: Institut Géographique National

INSAE: Institut National de la statistique et de l'Analyse Economique

IRD: Institut de Recherche pour le Développement

Kdr: Knock-down resistant

LLINs: Long-Lasting Insecticidal Nets

LLN: Long-Lasting Net

MFO: Oxydase à Fonction Multiple

MII : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide

MIILD: Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée

MS: Ministère de la Santé

OC : Organochloré
OCP: Onchocerciasis Control Programme
OMD: Objectifs du Millénaire pour le Développement
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
OP: Organophosphoré
OR: Odd Ratio
P: Pyréthrianoïde
PCR : Polymerase Chain Reaction
PHN: Piqûre par Homme par Nuit
PID: Pulvérisation Intradomiciliaire
PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme
PNUD: Programme des Nations Unies pour le Développement
Rdl: Resistance dieldrin
RTI: Research Triangle Institute
SC: Concentré en suspension
TDR : Tests de Diagnostic Rapide
TIE: Taux d'Inoculation Entomologique
TPI: Traitement Préventif Intermittent
USA: United States of America
USAID: United States Agency for International Development
WHO: World Health Organization
WHOPES: World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme
WP: Poudre mouillable

Liste des figures

Figure 1 : Cycle du paludisme.....	17
Figure 2 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels.....	20
Figure 3 : Poissons larvivores culiciphages : <i>Gambusia affinis</i> (A) et <i>Poecilia reticulata</i> (B).....	21
Figure 4 : Appicateurs en tenue et pulvérisation intradomiciliaire.....	22
Figure 5 : Principaux mécanismes de résistances aux insecticides chimiques chez les insectes.....	30
Figure 6 : Répartition géographique des sites d'étude sur le territoire national.....	38
Figure 7 : Données pluviométriques de l'Ouémé des 5 dernières années (2008-2012) : Adjohoun (A), Dangbo (B) et Sèmè (C).....	41
Figure 8 : Carte de la zone d'étude montrant les localités choisies dans la zone centrale et la zone périphérique pour l'échantillonnage des anophèles.....	45
Figure 9 : Pulvérisateur manuel à pression préalable du type HUDSON XPERT.....	47
Figure 10 : Campagne de distribution des MIILD.....	48
Figure 11 : Capture de nuit sur appât humain.....	49
Figure 12 : Capture à l'aide d'un piège fenêtre.....	50
Figure 13 : Récolte, tri (A et B) et élevage (C) des larves d'anophèles.....	52
Figure 14 : Diagramme montrant le processus d'identification et de traitement des vecteurs.....	53
Figure 15 : Test en cône sur les supports traités (A) et mise en observation des moustiques pour une lecture après 24 heures (B).....	55
Figure 16 : Réalisation des tests en cône sur les MIILD retirées de la zone d'étude.....	57
Figure 17 : Variation du taux de parturité de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> collectés pendant la longue saison pluvieuse en 2008 avant intervention et pendant la même période après PID...67	67
Figure 18 : Exophilie de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> collectés pendant la longue saison pluvieuse en 2008 avant intervention et pendant la même période après PID.....	68
Figure 19 : Taux de gorgement de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> collectés par aspersion matinale de bombe aérosol et par piège fenêtre de sortie avant (mai- juillet 2008) et après intervention (mai- juillet 2010).....	69
Figure 20 : Les types de moustiquaires rencontrées par arrondissement.....	77
Figure 21 : Taux d'utilisation des Olyset PNLP 2011 par arrondissement.....	79

Figure 22 : Etat de propreté des moustiquaires par arrondissement.....	81
Figure 23 : Fréquences de moustiquaires trouées dans les différentes communes.....	81
Figure 24 : Fréquences des types de trous rencontrés sur les Olyset PNLP 2011 (A), autres Olysets (B), Permanets (C) et autres moustiquaires (D) dans les différentes communes.....	83
Figure 25 : Taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> Kisumu (souche sensible) après 3 min d'exposition aux moustiquaires Olyset PNLP retirées dans la population.....	84
Figure 26: Taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> Ladj (souche de terrain) après 3 min d'exposition aux moustiquaires Permanet retirées dans la population.....	85
Figure 27 : Taux de mortalité de <i>Anopheles gambiae</i> Kisumu (souche sensible) et de <i>An. gambiae</i> sauvage (population locale résistante aux insecticides) après 30 minutes d'exposition aux différents matériaux imprégnés, 2 semaines après la PID (3 ^{ème} et 4 ^{ème} tours).....	94
Figure 28 : Taux de mortalité de <i>Anopheles gambiae</i> Kisumu (souche sensible) et de <i>Anopheles gambiae</i> population sauvage (population résistante) après 30 minutes d'exposition aux murs en ciment non crépis (A), banco non crépis (B), ciment badigeonné (C), ciment crépi (D) et en banco crépi (E) après 1, 2, 3 et 4 tours de la PID au bendiocarb.....	97
Figure 29 : Taux de piqûre sur homme de <i>An. gambiae</i> observé pendant la campagne de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les zones centrales (A) et les zones périphériques (B) des différentes communes.....	101
Figure 30 : Variation de la densité agressive d' <i>An. gambiae</i> s.l en fonction de la pluviométrie à Adjohoun (A), Sèmè (B) et à Dangbo (C).....	102
Figure 31 : Taux d'exophilie de <i>An. gambiae</i> observé pendant la campagne de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les zones centrales (A) et les zones périphériques (B) des différentes communes.....	103
Figure 32 : Taux de parturité de <i>Anopheles gambiae</i> observé durant la mise en œuvre de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les différentes communes de l'Ouémé.....	104
Figure 33 : Taux de gorgement de <i>Anopheles gambiae</i> observé durant la mise en œuvre de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les différentes communes de l'Ouémé.....	105
Figure 34 : Taux de gorgement des Culicidae observé durant la mise en œuvre de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les différentes communes de l'Ouémé.....	106
Figure 35 : Taux de mortalité de <i>An. gambiae</i> après 60 minutes d'exposition aux différents papiers imprégnés observé pendant la campagne de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les communes de Adjohoun (A), Dangbo (B), Misséréte (C), Sèmè (D) et Adjara (témoin) (E).....	121

Liste des tableaux

Tableau I: Produits et formulations recommandés par WHOPES pour le contrôle des larves de moustiques.....	24
Tableau II: Insecticides recommandés par WHOPES pour la PID contre les vecteurs du paludisme.....	24
Tableau III : Taux de piqûre (PHN) et taux d'inoculation entomologique (TIE) observés avant et après intervention de la PID.....	65
Tableau IV : Taux de piqûre (PHN) de <i>Mansonia spp.</i> et de <i>Culex spp</i> observés avant et après intervention de la PID.....	66
Tableau V : Exophilie de <i>Mansonia spp</i> et de <i>Culex spp</i> induit par les murs traités au bendiocarb avant et après intervention de la PID.....	70
Tableau VI : Taux de couverture des Olyset PNL 2011 par commune.....	78
Tableau VII : Position et emplacement des moustiquaires dans les ménages par commune (Janvier 2012).....	80
Tableau VIII : Fréquences alléliques de la mutation <i>Kdr</i> observées chez <i>An. gambiae</i> (morts et vivants) après exposition à la moustiquaire Olyset.....	86
Tableau IX : Taux de mortalité de <i>Anopheles gambiae</i> exposé à la moustiquaire Olyset en fonction des génotypes pour la mutation <i>Kdr</i>	86
Tableau X : Densités de moustiques enregistrées pendant la campagne de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011).....	99
Tableau XI : Taux d'inoculation entomologique (TIE) de <i>An. gambiae</i> observé pendant la campagne de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans le département de l'Ouémé.....	108
Tableau XII : Répartition des formes, des espèces et des fréquences <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i> de <i>An. gambiae</i> s.l issue des zones d'études.....	122
Tableau XIII : Fréquence des allèles <i>Kdr</i> et génotypes observés chez la forme M et S de <i>An. gambiae</i> s.s.....	124
Tableau XIV : Indices de positivité en CS de <i>P. falciparum</i> chez les formes M et S de <i>An. gambiae</i> s.s.....	125
Tableau XV : Génotypes et phénotypes ([R], [S]) des mutations <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i> chez les <i>An. gambiae</i> s.s. positifs et non positifs à l'antigène CS de <i>P. falciparum</i>	126

Liste des annexes

Annexes 1 : Articles publiés et soumis.....	162
Annexes 2 : Protocoles.....	247

Chapitre 1:
Introduction et généralités

1. Introduction générale

L'histoire du paludisme est vieille. Cette affection est signalée dans les écrits les plus anciens. Le paludisme est considéré comme le fléau des terres humides (*palus* signifie *marais*) et des régions à l'air vicié (*mal aria*). Au XVII^e siècle s'ouvre l'ère des soins avec la plante quinquina dont on extraira plus tard la quinine. Ce n'est qu'en 1880 que l'agent de la maladie sera découvert par Alphonse Laveran, un médecin militaire français, prix Nobel de médecine en 1907 (Mouchet *et al.*, 2004). Depuis la découverte de la transmission de l'agent pathogène par la femelle d'anophèle en 1898 par Ronald Ross, la lutte contre le paludisme connut des périodes difficiles (Mouchet *et al.*, 2004). Le premier combat contre le paludisme fut dirigé vers l'assainissement de l'environnement qui consista 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 à la faveur 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 (Cavalié & 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. Il constitue aujourd'hui un fléau lourd de conséquences non seulement pour la santé, mais aussi pour le développement socio-économique. 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. 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 *P. falciparum* est responsable de 1 million de décès par an, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Près de 91 % des cas de décès touchent les pays de l'Afrique sub-saharienne où le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur (WHO, 2011). Au Bénin, l'incidence cumulée du paludisme simple et grave est de 16,2% en 2010. La maladie représente 32,2% des causes de recours aux soins dans les formations sanitaires et se situe au premier rang des principales affections dont

souffrent les communautés en 2010. Durant cette même année, l'incidence palustre a été estimée à 11,2% et 12,6% respectivement dans les départements du Plateau et de l'Ouémé (MS, 2011).

En 1992, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait considéré que le moment était venu de « relancer l'offensive contre le paludisme » et a développé une stratégie qui a été adoptée par la conférence internationale sur le paludisme organisée à Amsterdam la même année (OMS, 1999). En 1999, l'OMS a relancé une nouvelle initiative mondiale contre le paludisme : « Roll Back Malaria » (Faire Reculer le Paludisme), dont l'objectif premier était de diminuer, voire de supprimer la mortalité due au paludisme en appliquant les directives du Programme mondial de Lutte contre le Paludisme.

Malgré les efforts consentis, son incidence demeure toujours plus élevée. Afin de renforcer la lutte et de mieux contrôler cette affection, les chefs d'Etat et de Gouvernement de l'Afrique sub-saharienne ont proposé, comme objectifs à Abuja en 2000, de réduire de 50% la mortalité et la morbidité palustres en 2010 et de 75% en 2015 (Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin, 2005). Quant aux Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD), de nombreux programmes de lutte sont mis en place pour vaincre cette maladie afin de réduire la mortalité infantile de deux tiers d'ici 2015 (OMS, 2005b).

Même si quelques avancées ont été réalisées en ce qui concerne l'accès effectif au traitement et aux services de prévention, l'ampleur des progrès réalisés est plutôt limitée (Watkins *et al.*, 2005). Au cours des dernières années, la visibilité de la lutte contre le paludisme et l'appui politique dont celle-ci a bénéficié ont considérablement augmenté. De nouveaux outils ont été mis à la disposition des programmes nationaux de lutte contre le paludisme, tels que les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA), les tests de diagnostic rapide (TDR), le traitement préventif intermittent (TPI) et la lutte antivectorielle (WHO, 2004). Cette dernière reste aujourd'hui l'une des principales méthodes de protection des populations pour réduire la transmission du paludisme par le moustique vecteur. Dans le cadre de la lutte anti-vectorielle, les deux principales méthodes actuellement utilisées sont les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides à effet rémanent et les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides (Kelly-Hope *et al.*, 2008). 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 l'efficacité observée et démontrée des MII dans le cadre de la

lutte contre le paludisme, on a noté 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). La pulvérisation intradomiciliaire à effet rémanent (PID) autrefois pratiquée et suspendue compte tenu de la forte toxicité du DDT a fait sa réapparition avec tous les progrès en Afrique de l'Est, du Sud et de l'Ouest (WHO, 2004; Sharp *et al.*, 2007; WHO, 2007a).

Malheureusement des problèmes importants subsistent mettant en danger les objectifs et la pérennité de ces outils de lutte. Au nombre de ces problèmes, on peut citer la résistance des vecteurs aux insecticides qui constitue un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés. La résistance des moustiques aux insecticides est apparue en Afrique depuis les années 60. Les premiers cas ont été notés au Burkina avec l'apparition de la résistance de *Anopheles gambiae* à la Dieldrine, puis un an plus tard au DDT (Hamon & Mouchet, 1961). Concernant les pyréthréinoïdes, 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). En 1993, la résistance aux pyréthréinoïdes a été mise en évidence en Côte d'Ivoire dans des populations naturelles de *An. gambiae* (Elissa *et al.*, 1993). De nombreux autres cas sont décrits en Afrique de l'Est (Vulule *et al.*, 1994 ; Stump *et al.*, 2004), en Afrique de l'Ouest (Akogbeto & Yacoubou, 1999; Chandre *et al.*, 1999a; Diabaté *et al.*, 2002a; Awolola *et al.*, 2003; Fanello *et al.*, 2003a; Corbel *et al.*, 2007; N'Guessan *et al.*, 2007; Djènontin *et al.*, 2009; Yadouleton *et*

al., 2010), en Afrique centrale (Etang *et al.*, 2003, 2006) et en Afrique du Sud (Hargreaves *et al.*, 2000, 2003).

L'apparition et le développement de la résistance sont des processus complexes et dynamiques qui dépendent de plusieurs facteurs. A l'heure actuelle, de nombreuses questions demeurent sur l'impact opérationnel de ces résistances sur le contrôle du paludisme en Afrique et sur l'impact des interventions de lutte antivectorielle sur l'évolution des résistances chez les vecteurs du paludisme (Sharp *et al.*, 2007). La gestion de la résistance est donc un problème majeur auquel doivent faire face les différents programmes nationaux de lutte contre les vecteurs.

Dans ce contexte, la recherche de méthodes de lutte autres que celles utilisant des pyréthrinoïdes (utilisation d'autres familles d'insecticides seules ou en combinaison) devient une nécessité (Zaim *et al.*, 2002). Une solution possible consiste à utiliser des insecticides déjà disponibles mais ayant des cibles différentes des pyréthrinoïdes. Des études en cases expérimentales ont montré que certains organophosphorés et carbamates étaient particulièrement efficaces sur des populations naturelles de vecteurs fortement résistantes aux pyréthrinoïdes (Kolaczinski *et al.*, 2000). Malgré le coût élevé de ces insecticides, des carbamates (propoxur et bendiocarb) furent utilisés en aspersions intradomiciliaires pour lutter contre les vecteurs du paludisme (Carnevale & Mouchet, 1990). Depuis quelques années, ils font l'objet d'un regain d'intérêt en santé publique étant donné les forts taux de résistance aux pyréthrinoïdes enregistrés chez les vecteurs en Afrique subsaharienne.

Depuis 2008, le Programme National de Lutte contre le paludisme (PNLP) a décidé l'utilisation des non-pyréthrinoïdes en pulvérisation intra-domiciliaire dans les zones de résistance des vecteurs aux insecticides au Bénin (Akogbéto *et al.*, 2010). C'est pour cette raison qu'au cours de la campagne PID lancée par le PNLN en 2008 dans le département de l'Ouémé, le bendiocarb (Carbamate) a été utilisé. Le choix du bendiocarb a été fait après une évaluation en phase II de plusieurs insecticides (Akogbéto *et al.*, 2010). De plus, il a été rapporté une bonne efficacité du bendiocarb en PID pour le contrôle du paludisme dans plusieurs contrées à savoir la Namibie, la Guinée Equatoriale, le Mozambique (Sharp *et al.*, 2007; WHO, 2007b).

De juillet 2008 à août 2010, quatre tours de PID ont été mis en œuvre dans le département de l'Ouémé. Le traitement des maisons a été fait par une Organisation Non Gouvernementale Internationale, le "Research Triangle Institute" (RTI), avec la participation communautaire.

Selon Akogbéto *et al.* (2011) et Ossè *et al.* (2012), les trois premiers tours de pulvérisation ont été un grand succès avec une forte réduction de la transmission du paludisme.

Mais à partir de 2011, la PID a été arrêtée dans le département de l'Ouémé-Plateau et transférée dans l'Atacora, la partie nord du Bénin. La raison principale de ce transfert est due au fait que, le département de l'Ouémé est caractérisé par une longue période de transmission du paludisme (avril-novembre), ce qui nécessite au moins deux tours de pulvérisation intradomiciliaire par an en raison de l'effet résiduel court du bendiocarb. Mais dans le département de l'Atacora, la période de transmission du paludisme est relativement plus courte (juin-novembre); un tour de PID devrait suffire par an. En termes de coût-efficacité, les zones caractérisées par une courte durée de transmission du paludisme devraient être considérées comme prioritaires dans le choix de la PID par rapport aux zones où la transmission est longue.

Le transfert de la PID dans l'Atacora n'a pas été apprécié des populations de l'Ouémé-Plateau. Mais, pour les apaiser, deux mesures ont été prises : (i) mettre à la disposition des populations des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (accès universel) en remplacement de la PID, (ii) continuer la surveillance entomologique du paludisme dans les 4 communes du département après l'arrêt de la PID afin de détecter rapidement toute reprise de la transmission du paludisme et prendre les mesures qui s'imposent.

C'est dans cette optique que nous avons entrepris les travaux de cette thèse qui s'intitule « **Evolution des indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme après l'arrêt de la pulvérisation intradomiciliaire dans le département de l'Ouémé, au Bénin** ».

Quatre hypothèses justifient ce travail :

- i) la PID au bendiocarb est efficace pour réduire la transmission du paludisme en zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes ;
- ii) l'accès à la couverture universelle des MIILD est aussi efficace que la PID en terme de réduction de la transmission du paludisme;
- iii) l'arrêt de la PID favorise l'augmentation de l'agressivité des moustiques et du taux d'inoculation entomologique (TIE);
- iv) les *Anopheles gambiae* porteurs de gènes *Kdr* et *Ace-1* sont potentiellement plus infectés vis-à-vis du *Plasmodium falciparum* que les non porteurs.

Le principal objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de l'arrêt de la pulvérisation intradomiciliaire sur la transmission du paludisme dans le département de l'Ouémé.

De façon spécifique, notre étude vise à :

- i) déterminer le niveau de la transmission du paludisme dans l'Ouémé lors du dernier tour de la PID;
- ii) étudier le degré de mise en œuvre de la promotion des MIILD proposées par le PNLP et leur taux d'utilisation par les populations après l'arrêt de la PID et le comportement des populations de *An. gambiae* résistantes aux pyréthrinoïdes au contact de ces MIILD;
- iii) étudier la dynamique des populations de *An. gambiae* et de leur infectivité pendant la période MIILD après l'arrêt de la PID;
- iv) étudier la relation entre le portage des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* et la présence de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* chez *An. gambiae* s.s en vue de mettre en évidence l'impact opérationnel de la présence du gène *Kdr* sur l'efficacité des MIILD et celle du gène *Ace-1* sur l'efficacité des murs traités aux carbamates (bendiocarb).

La présente thèse est scindée en sept chapitres articulés autour des articles publiés et soumis pour publication dans le cadre de ce travail. Ces chapitres sont retenus sur la base de leur contenu qui doit être 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.

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 les particularités biologiques et écologiques des espèces vectrices majeures du paludisme en Afrique sub-saharienne. Ensuite, nous avons fait un état des lieux des méthodes utilisées contre les principaux anophèles vecteurs et des molécules insecticides et insectifuges disponibles en santé publique. Nous avons discuté enfin des différents types de résistance aux insecticides susceptibles de compromettre les programmes de lutte et les stratégies de gestion de cette résistance.

Le chapitre 2 regroupe l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés dans la thèse, les différents types d'échantillonnage des populations de moustiques en fonction des types d'étude, les différentes techniques de traitement du matériel biologique selon les objectifs fixés et les méthodes d'analyse des données. Toutefois, dans chaque chapitre un bref résumé du chapitre précédent permet de rafraîchir la mémoire au lecteur.

Dans un troisième temps, nous avons conduit des recherches entomologiques au cours desquelles nous avons évalué le niveau de la transmission du paludisme avant l'arrêt de la PID en calculant certains indicateurs entomologiques et étudié le comportement des vecteurs dans les zones traitées.

Nous avons entrepris dans le quatrième chapitre une étude pour déterminer le taux de couverture et d'utilisation des MIILD, et la biodisponibilité de la perméthrine sur les Olyset distribués par le PNLP. Le but du chapitre est de vérifier si les populations ont accepté la mesure proposée et mise en œuvre par les autorités sanitaires à savoir, la mise à disposition de toutes les familles des moustiquaires imprégnées en remplacement de la PID.

Dans le cinquième chapitre, nous avons comparé les indicateurs entomologiques observés au cours du dernier tour de la PID à ceux obtenus après l'arrêt de cette intervention en nous focalisant sur la dynamique des populations de moustiques, le comportement et le taux d'inoculation entomologique (TIE) des vecteurs dans un contexte de couverture universelle des MIILD. L'étude de la biodisponibilité du bendiocarb sur les supports traités après une accumulation des particules d'insecticide sur les murs suite à 4 tours successifs de PID a été réalisée dans cette période pour s'assurer que la rémanence du bendiocarb est terminée pour éviter tout biais avec l'action des MIILD.

Dans le sixième chapitre, nous avons étudié la résistance des vecteurs aux insecticides et les mécanismes de résistance après 4 ans d'utilisation de grande quantité de bendiocarb dans l'Ouéme pour vérifier une éventuelle évolution de la résistance des populations de *An. gambiae* mises sous pression insecticide de 2008 à 2010. Par ailleurs, nous avons étudié la signification opérationnelle de l'impact de cette résistance en déterminant la relation qui existe entre le portage des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* et la présence de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* chez *An. gambiae* s.s.

Enfin, les différents résultats obtenus sont discutés dans leur ensemble, suivis d'une conclusion et de perspectives de recherche concernant l'avenir de la lutte antipaludique en Afrique.

2. Généralités

2.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire endémo-épidémique à manifestation infectieuse 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 *Plasmodia*, 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 1 million par an, essentiellement comptées parmi les enfants de moins de 5 ans (Greenwood *et al.*, 2005).

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. Enfin, 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).

Les 4 espèces du genre *Plasmodium* responsables des paludismes humains sont: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. *P. falciparum* est l'espèce la plus virulente causant les formes mortelles de la pathologie et la plus répandue en Afrique subsaharienne (Burkot *et al.*, 1987).

La transmission du paludisme implique trois facteurs : l'homme, le parasite et le vecteur. Les facteurs « homme » et « parasites » ne sont pas limitants, l'homme étant présent sur toute la planète et le parasite pouvant infecter l'homme partout où le climat est favorable au développement de son cycle sporogonique.

L'homme est infecté lors d'une piqûre par l'anophèle femelle qui lui transmet le parasite sous forme de « sporozoïte ». Celui-ci reste dans la circulation sanguine pendant une demi-heure et migre rapidement vers le foie. Il pénètre dans l'hépatocyte où il se divise très activement pour donner un corps bleu ou schizonte mûr qui contient près de 400 000 noyaux chez *P. falciparum* et de 10-15 000 pour les autres espèces. Chaque noyau du schizonte s'entoure du cytoplasme et devient mérozoïte. Cette phase de division cellulaire dure 10 à 15 jours environ et constitue la durée d'incubation du paludisme : c'est la phase exo-érythrocytaire. Le schizonte mûr s'éclate et libère la première génération de mérozoïtes qui parasitent certaines hématies pendant que d'autres vont dans la circulation sanguine puis le cycle asexué recommence. Le temps qui s'écoule entre la pénétration d'un parasite dans une hématie et son éclatement est de 48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*, et 72 heures pour *P. malariae* : c'est la phase érythrocytaire. La formation des gamétocytes dans la rate et la moelle suivie de leur expulsion dans le sang du porteur permettra l'infestation de l'anophèle femelle pendant son repas sanguin (Malvy *et al.*, 2000). Le vecteur absorbe différents stades du parasite. Les éléments asexués, les trophozoïtes et schizontes sont tous digérés. Seuls les gamétocytes poursuivent leur développement. La transformation des gamétocytes en gamontes survient dans le quart d'heure qui suit leur ingestion par l'anophèle femelle lors du repas sanguin. Une trentaine de minutes après la prise de sang, ceux-ci évoluent rapidement en micro et macrogamètes sexués. Le cas marquant de ce cycle réside du fait que la fécondation des *Plasmodia* (fusion des gamètes) qui permet la pérennisation du parasite se déroule chez le vecteur et non chez l'hôte vertébré. La fusion des gamètes donne un zygote mobile ou ookinète qui quitte la lumière de l'estomac juste avant la formation de la membrane péritrophique, processus d'invasion qui déclenche les réponses immunitaires du moustique (Dimopoulos, 2003). L'ookinète localisé dans la paroi externe de l'estomac du moustique s'accroît et se transforme en oocyste renfermant plusieurs sporoblastes qui évoluent en sporozoïtes immatures. Ces derniers, par les mouvements, fragilisent la membrane de l'oocyste qui cède et les libère dans l'hémolymph (Wang *et al.*, 2005).

Les sporozoïtes immatures migrent dans divers tissus du moustique mais préférentiellement dans les glandes salivaires où ils s'accumulent et acquièrent leur stade infectieux. Ils seront injectés lors de la prochaine piqûre du moustique, faisant ainsi démarrer le cycle sporogamogonique chez l'homme. La phase sporogonique du *Plasmodium* chez l'anophèle a une durée de 10 à 25 jours environ, et variable selon la température et l'espèce plasmodiale (Mouchet *et al.*, 2004) (Figure 1).

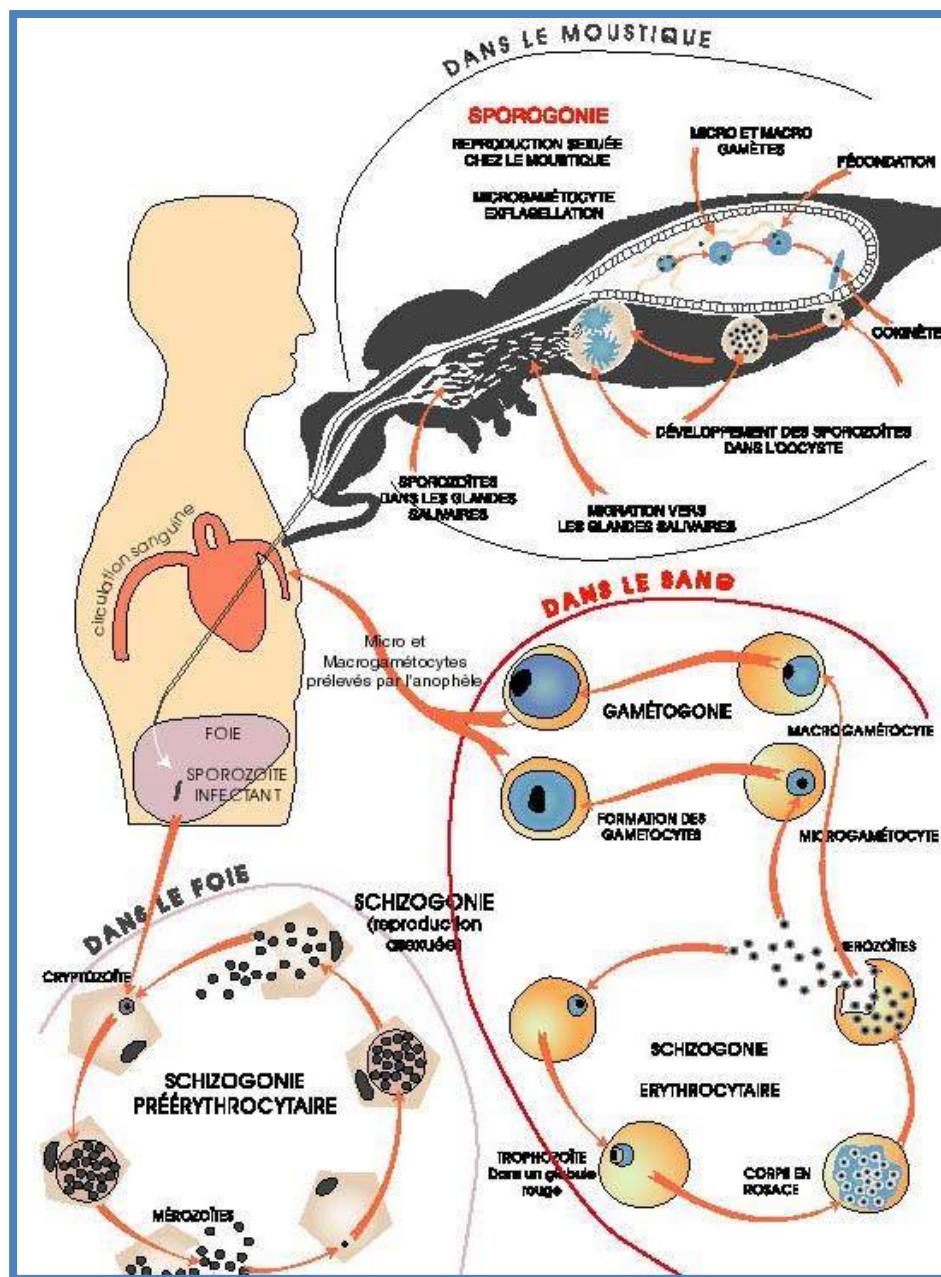


Figure 1 : Cycle du paludisme (Carnaval, 2000).

2.2. Anophèles vecteurs du paludisme

Les vecteurs du paludisme sont des moustiques appartenant à la sous-famille des *Anophelinae* (Diptera: Culicidae) et tous regroupés dans le genre *Anopheles*. Ce genre comprend environ 500 espèces réparties sur l'ensemble de la planète à l'exception du continent Antarctique, de la Polynésie centrale et orientale et de certaines îles dont le

Groenland, l'Islande et quelques terres isolées (Harbach, 2004 ; Mouchet *et al.*, 2004). Seules soixante dix à quatre vingt espèces sont considérées comme vectrices pour les *Plasmodia* humains, avec des implications variées (Mouchet *et al.*, 2004) (Figure 2). On dit que ces espèces sont “compétentes”.

Dans la plupart des endroits d'Afrique, plusieurs espèces de vecteur transmettent la malaria simultanément, ou se remplacent de façon saisonnière. Ces vecteurs diffèrent largement dans leur densité et leur capacité vectorielle. L'identification précise des anophèles est donc un préalable pour la mise en place de mesures de contrôle appropriées, spécifiquement et sélectivement orientées sur les cibles adéquates. La plupart des traits phénotypiques de moustique relatifs à l'épidémiologie de la maladie ou son contrôle (préférence trophique, compétence vectorielle ou la résistance aux insecticides) sont susceptibles d'être génétiquement codés, la structure intra spécifique de la population doit être connue et les flux de gènes entre populations être évalués (Fontenille & Simard, 2004). Parmi les espèces rencontrées en Afrique subsaharienne, cinq sont qualifiées de «vecteurs majeurs» car assurant la transmission du paludisme et responsables de plus de 95% de la transmission totale du paludisme sur le continent: *An. gambiae* s.s. (avec deux formes moléculaires M et S), *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* (Coetzee *et al.*, 2000; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002; Mouchet *et al.*, 2004). Certains vecteurs dits secondaires assurent localement la transmission du paludisme aux côtés des vecteurs majeurs surtout sur le littoral et en milieu insulaire: *An. melas* sur les côtes lagunaires d'Afrique de l'Ouest, *An. merus* et *An. mascarensis* à Madagascar (Fontenille & Campbell, 1992; Pock Tsy *et al.*, 2003). Cette diversité en Afrique intertropicale où la plupart des vecteurs vivent en sympatrie, donne lieu à une certaine complexité dans la plupart des faciès de transmission de paludisme tant dans son intensité que dans sa dynamique. Ceci rend ainsi plus spécifique l'approche de la réduction du contact homme-vecteur (Mouchet *et al.*, 1993; Fontenille & Lochouart, 1999).

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.

La répartition géographique des espèces du complexe *An. gambiae* est liée à des contraintes climatiques et écologiques. Le complexe *An. gambiae* constitue un système vectoriel complexe par rapport à la multitude d'espèces et de formes adaptées aux diverses conditions de l'habitat. Deux paramètres sont déterminants pour qualifier un moustique de bon vecteur de parasites. Il s'agit de la compétence vectorielle, déterminée essentiellement par la compatibilité vecteur/parasite, et de la capacité vectorielle, déterminée par l'anthropophilie et la longévité du vecteur (Mouchet *et al.*, 2004).

An. gambiae s.s. est l'une des espèces les plus répandues du complexe *An. gambiae* (qui en comprend 7). Elle 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 présent au Sahel et sur les plateaux d'Afrique méridionale. Il s'enfonce assez profondément dans les savanes humides, englobant la zone de répartition de *An. gambiae* s.s. (Mouchet *et al.*, 2004). La zone de recouvrement en ces deux espèces est d'ailleurs assez large. Ces deux dernières présentent des limites de distribution en Afrique qui semblent être déterminées par les conditions climatiques (Mouchet *et al.*, 2004).

Les femelles de *An. gambiae* s.s. sont hautement anthropophiles, s'alimentant préférentiellement sur des humains (Coluzzi *et al.*, 1979). Toutefois, en Afrique de l'Ouest, elles peuvent être moins sélectives et se nourrir facilement sur d'autres animaux comme les chevaux et le bétail (Diatta *et al.*, 1998). A la différence de *An. gambiae*, *An. arabiensis* a un comportement beaucoup plus flexible avec une anthropophilie et une endophilie partielles en présence d'hôtes alternatifs (Gillies & Coetzee, 1987; Costantini *et al.*, 1998). Il est capable de se développer dans des zones totalement sauvages, adoptant alors un comportement exclusivement zoophile (Duchemin *et al.*, 2001). En général *An. gambiae* s.s., à cause de son anthropophilie préférentielle, a développé une tendance forte pour l'endophagie et l'endophilie, tandis que le plus zoophile *An. arabiensis* a une tendance plus exophage et exophile.

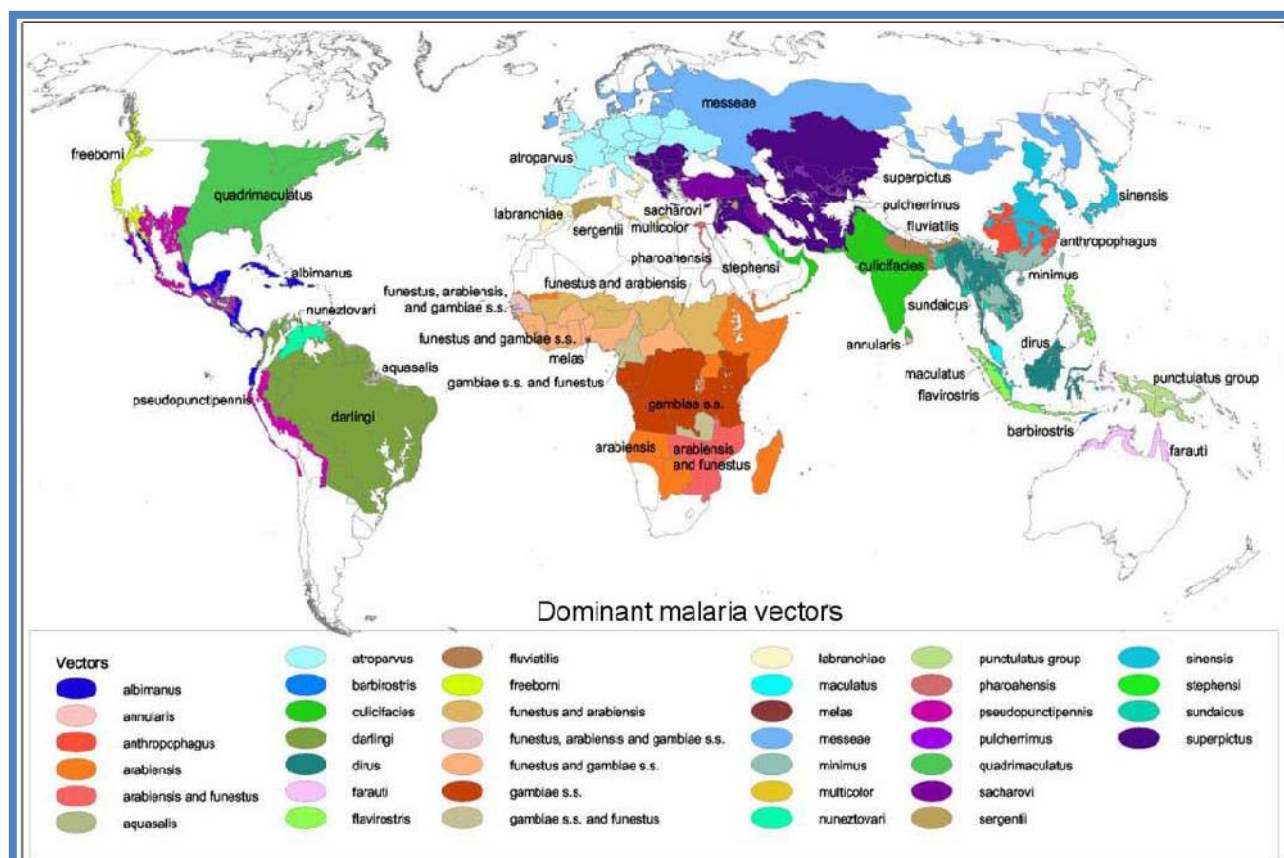


Figure 2 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels (Kiszewski *et al.*, 2004).

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 (Figure 3) (*Gambusia affinis* et *Poecilia reticulata*) ont été observés dans des zones de paludisme instables, où les gîtes larvaires étaient limités et facilement repérables (Louis & Albert, 1988).



Figure 3 : Poissons larvivores culiciphages : *Gambusia affinis* (A) et *Poecilia reticulata* (B)

2.3.2. Lutte contre les adultes

La principale méthode de lutte « imagocide » est l'aspersion intradomiciliaire. 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 (figure 4). Gahan a eu le mérite d'avoir réalisé en 1944 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 (Mouchet, 1994; Coz *et al.*, 1968). 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 toxique 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.



Figure 4 : Appicateurs en tenue et pulvérisation intradomiciliaire

2.3.3. Réduction du contact homme-vecteur

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 piquûres 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-imprégner la moustiquaire (Lines, 1996). C'est pourquoi, depuis quelques années, des moustiquaires à « longue durée d'action» (Long Lasting Nets: LLN) 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).

2.4. Insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle

Il existe des centaines de molécules utilisées comme insecticides en santé publique. Pour la lutte antivectorielle, les produits et formulations insecticides recommandés par l'OMS sont mentionnés dans les tableaux I et II (OMS, 2002). La plupart de ces molécules se regroupent en 6 grandes familles. Cependant, seules quatre familles de produits chimiques représentent chacune plus de 10% de la part de marché et plus de 70% de l'ensemble: les organophosphorés (à partir de 1940), les carbamates (à partir de 1950), les pyréthrinoïdes de synthèse (à partir de 1970) et les néonicotinoïdes (à partir de 1990) (Nauen, 2006).

Tableau I: Produits et formulations recommandés par WHOPES pour le contrôle des larves de moustiques

Insecticides	Formulation (a)	Dosage de produit actif
Huiles		
Huiles minérales	Solution	142-190 L/ha
Huiles minérales + agent dispersant	Solution	19-47 L/ha
Organophosphorés		
Chlorpyrifos	EC	11-25 g/ha
Fenthion	EC	22-112 g/ha
Pirimiphos-méthyl	EC	50-500 g/ha
Temephos	EC, GR	56-112 g/ha
Régulateurs de croissance des insectes		
Diflubenzuron	GR	25-100 g/ha
Methoprene	EC	20-40 g/ha
Pyriproxyfen	GR	5-10 g/ha
Insecticides microbiens		
<i>B. thurigiensis israelensis</i>	Formulations à relargage retardé (b)	
<i>B. sphaericus</i>	Formulations à relargage retardé (b)	

(a) EC= concentré émulsifiable; GR= granulés ; (b) Le dosage dépendra de la formulation utilisée

Tableau II: Insecticides recommandés par WHOPES pour la PID contre les vecteurs du paludisme

Produits Insecticides et formulations ^a	Classe ^b	Dosage (g/m ²)	Mode d'action	Durée d'activité efficace (en mois)
Bendiocarb WP	C	0.1-0.4	Contact & aérien	2-6
Propoxur WP	C	1-2	Contact & aérien	3-6
DDT WP ^c	OC	1-2	Contact	>6
Fénitrothion WP	OP	2	Contact & aérien	3-6
Malathion WP	OP	2	Contact	2-3
Pirimiphos-méthyl WP & EC	OP	1-2	Contact & aérien	2-3
Alpha-cyperméthrin WP & SC	P	0.02-0.03	Contact	4-6
Bifenthrin WP	P	0.025-0.050	Contact	3-6
Cyfluthrin WP	P	0.02-0.05	Contact	3-6
Deltaméthrin WP	P	0.01-0.025	Contact	2-3
Etofenprox WP	P	0.1-0.3	Contact	3-6
Lambda-cyhalothrin WP	P	0.02-0.03	Contact	3-6

^a EC = concentré émulsifiable; WP = poudre mouillable; SC = concentré en suspension;

^b OC = organochloré; OP = organophosphoré; C = carbamate; P = pyréthrianoïde;

^c Pour les conditions d'utilisation du DDT

2.4.1. Organochlorés

Cette famille est subdivisée en 3 sous-familles selon le mode d'action et la structure chimique des molécules. Il s'agit du DDT et ses analogues, du lindane et des cyclodiènes. Le DDT découvert en 1939 par Müller constitua une véritable révolution dans la lutte contre les insectes. Cette molécule fut largement utilisée en agriculture et en santé publique. En santé publique, le DDT a permis de sauver des millions de vies humaines (Mouchet, 1994). Le DDT agit sur le système nerveux périphérique et central des insectes (Hassal, 1990). L'action de cet insecticide est rapide et se traduit par un effet de choc (knock-down) réversible aux doses sub-létales. Le DDT a été abandonné à cause de son accumulation dans les chaînes alimentaires et de l'apparition de la résistance. Le lindane est l'un des isomères de l'hexachlorocyclohexane synthétisé à partir de benzène et de chlore. Le lindane et les cyclodiènes agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui est un neuromédiateur inhibiteur. Ces molécules ont été largement utilisées dans les années 50 mais ont été abandonnées à cause de leur toxicité pour des faunes non-cibles, leur rémanence dans l'environnement et l'apparition rapide de la résistance.

2.4.2. Organophosphorés

Ce sont également des insecticides organiques de synthèse, dérivés de l'acide phosphorique. Ils agissent en inhibant l'acétylcholinestérase nécessaire à la transmission correcte des impulsions nerveuses et au contrôle musculaire. Chez l'insecte, l'inhibition de l'acétylcholinestérase provoque une grande excitation du système nerveux entraînant un tremblement des extrémités et une paralysie suivie de la mort (Darriet, 2007).

Les principaux insecticides organophosphorés en santé publique sont : le Malathion, le Parathion, le Fénitrothion et le Téméphos. Ce dernier, en raison de sa faible toxicité sur la faune non-cible a été fortement utilisé par le Programme OCP/OMS (Onchocerciasis Control Programme/ Organisation Mondiale de la Santé) pour le contrôle des larves de simules dans les rivières en Afrique de l'Ouest. Il est aussi, l'insecticide des eaux claires et même des eaux de boissons.

Le Chlorpyrifos, le Malathion et le Fenthion, insecticides de référence, ont été utilisés avec succès dans le traitement des eaux usées contre les larves de *Culex quinquefasciatus* car ils présentent alors une efficacité immédiate et une persistance d'activité élevée (Bang *et al.*,

1975). Du fait de l'apparition de résistance de *Culex quinquefasciatus* à ces composés et du risque de pollution de l'environnement, leur utilisation a considérablement diminué.

2.4.3. Carbamates

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. Ces composés sont moins toxiques que les précédents qu'ils ont progressivement remplacés. Ils sont toujours utilisés et sont de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, enzyme qui dégrade l'acétylcholine. Cette dernière agit au niveau des synapses cholinergiques localisées dans le système nerveux central comme neuromédiateur. Lorsque les carbamates se fixent sur l'acétylcholinestérase, l'acétylcholine s'accumule dans la fente synaptique et les récepteurs à acétylcholine se bloquent en position ouverte, ce qui entraîne la paralysie puis la mort de l'insecte (Darriet, 2007).

2.4.4. Pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs de chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Les pyréthrinoïdes de première génération sont photolabiles et par conséquent peu rémanents. Ils entrent dans la composition des aérosols et des tortillons fumigènes. L'industrie a fabriqué par la suite des molécules plus stables qui sont utilisées en applications rémanentes (Elliott *et al.*, 1978). Selon que ces insecticides possèdent ou non un groupement cyané en α de la liaison ester, ils sont classés en groupe II (deltaméthrine, lambdacyhalothrine) et en groupe I (perméthrine). Les pyréthrinoïdes ont la même cible que le DDT et induisent rapidement un effet knock-down. Ils possèdent des propriétés excito-répulsives et sont peu toxiques pour les mammifères aux doses opérationnelles. C'est pour cette raison que ces insecticides sont actuellement les seuls utilisables pour imprégner des moustiquaires ou des rideaux destinés à lutter contre les vecteurs piquant la nuit comme ceux du paludisme.

2.4.5. Phényl pyrazole

Les propriétés insecticides de cette molécule ont été mises en évidence en 1987 par les laboratoires Rhône-Poulenc (Anonyme, 1996). Cette nouvelle classe d'insecticide, agit sur le système nerveux central à l'instar des cyclodiènes. Il interfère sur les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui joue un rôle de neuromédiateur

inhibiteur. Il perturbe le système nerveux central et à dose suffisante cause la mort de l'insecte (Anonyme, 1996).

Cet insecticide a engendré de grands espoirs en santé publique, car il a un large spectre d'actions et une très bonne rémanence. Il a été utilisé dans un premier temps d'une manière importante sur les ectoparasites (poux de tête). De nombreux essais sont actuellement en cours pour le tester en imprégnation d'écrans ou de pièges pour la lutte contre les glossines et comme larvicide ou adulticide pour la lutte anticulicidienne. Il existe par contre quelques problèmes de résistance croisée avec les cyclodiènes (Dieldrine), car ces deux familles de molécules ont un même site d'action : le récepteur GABA (Darriet, 2007).

2.4.6. Régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance sont des analogues d'hormones de croissance des insectes. Les juvénoïdes (méthoprène, le pyriproxifen) inhibent la nymphose alors que les ecdysoïdes (diflubenzuron) inhibent la synthèse de la chitine au moment de la mue.

Les inhibiteurs de croissance, en particulier le Flumuron ou l'Hexaflumuron, ont montré de très bons résultats, aussi bien en terme de toxicité que de rémanence, au laboratoire et sur le terrain (Doannio *et al.*, 1986; Darriet *et al.*, 1987). L'utilisation de ces molécules est limitée, car très onéreux par rapport aux organophosphorés et leur formulation présente des problèmes de stabilité. Il est également difficile d'évaluer l'efficacité et la rémanence de ces régulateurs de croissance en conditions opérationnelles. En effet, ces produits ont une action retardée ne permettant pas leur suivi après pulvérisation.

2.4.7. Toxines bactériennes

Deux bactéries entomophages sont utilisées comme larvicides. Il s'agit de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* qui produisent des toxines agissant par ingestion et ayant entre autres, une action cytotoxique sur les cellules du tube digestif des larves de diptères. Ces bactéries forment au cours de leur phase de sporulation, une ou plusieurs inclusions parasporales ou cristaux, toxiques pour les larves aquatiques de plusieurs espèces de moustiques et de simules après ingestion. Ces cristaux contenant les endotoxines constituent le principe actif de ces bio-insecticides (WHO, 1985).

Les larves de moustiques se nourrissent en filtrant l'eau et ingèrent indistinctement toute particule en suspension, de taille inférieure à 100-150 nanomètres (Dadd, 1971). Les spores

des bactéries entomophages ingérées de cette façon s'accumulent dans l'intestin des larves. Les cristaux sont alors digérés, ce qui entraîne la libération des endotoxines provoquant à terme la mort de la larve par une action cyto-toxique sur les cellules du tube digestif. *B. sphaericus* semble avoir peu d'impact sur la densité anophélienne (WHO, 1985).

2.5. Répulsifs

Les répulsifs représentent une large gamme de molécules d'origine végétale ou de synthèse qui présentent des propriétés excito-répulsives contre les insectes piqueurs. L'utilisation des répulsifs pour se protéger des insectes piqueurs est une pratique ancestrale qui mettait en jeu des dérivés de plantes. Actuellement, l'utilisation d'extraits de plantes fraîches, séchées ou brûlées est encore largement pratiquée en Afrique pour se protéger des insectes hématophages (Debboun *et al.*, 2007). Mais l'utilisation des répulsifs a connu un véritable développement avec l'apparition des produits de synthèse à action prolongée, non toxiques, acceptables en applications cutanées et efficaces contre de nombreux insectes, plus particulièrement depuis la découverte du diéthyl-m-toluamide ou DEET en 1953 (McCabe *et al.*, 1954). Présentés sous forme de crèmes ou bombes, ces répulsifs sont considérés comme une mesure de protection individuelle. Les répulsifs développent leur action en se comportant comme des molécules d'eau. Ils provoquent une élévation du taux d'humidité qui fait éloigner les moustiques. Ils sont très efficaces contre les arthropodes piqueurs mais la durée de protection ne dure que quelques heures (OMS, 2002). Récemment, de nouvelles substances actives ont été commercialisées (IR35351, KBR 30232 et PMD3) et ont montré des performances intéressantes sur les insectes nuisant et/ou vecteurs de maladies (Nentwig, 2003; Badolo *et al.*, 2004; Lundwall *et al.*, 2005). Malgré l'augmentation considérable du marché des répulsifs sur le plan mondial (environ 1,7 milliards d'unités vendus en 2004/2005 pour un chiffre d'affaire de 5,6 milliards d'euros), ces composés n'ont jamais été utilisés en santé publique, en l'absence de preuves tangibles sur leur capacité à réduire la transmission de certaines maladies. Deux études menées en Asie (Rowland *et al.*, 2004a; Rowland *et al.*, 2004b) ont démontré que l'utilisation de DEET sur la peau procurait un niveau de protection contre le paludisme comparable à celui conféré par les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides ou des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides. Un autre essai de terrain réalisé au Burkina Faso a également montré que l'application des répulsifs pouvait réduire significativement le nombre de piqûres infectantes à *P. falciparum*, agent responsable de la

forme grave du paludisme (Costantini *et al.*, 2004). Les répulsifs risquent donc de jouer un rôle croissant en santé publique dans les prochaines années, en particulier dans les zones où la biologie et le comportement des vecteurs rendent moins favorables l'utilisation de méthodes conventionnelles (régions où les vecteurs sont exophiles, exophages comme en Asie du Sud Est, Amérique du Sud, ou dans l'Océan indien).

2.6. Résistance de *An. gambiae* s.l aux insecticides

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.

2.6.1. 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 5). Cependant ces mécanismes ne semblent pas être les seuls impliqués dans la résistance des insectes aux insecticides et d'autres restent à étudier.

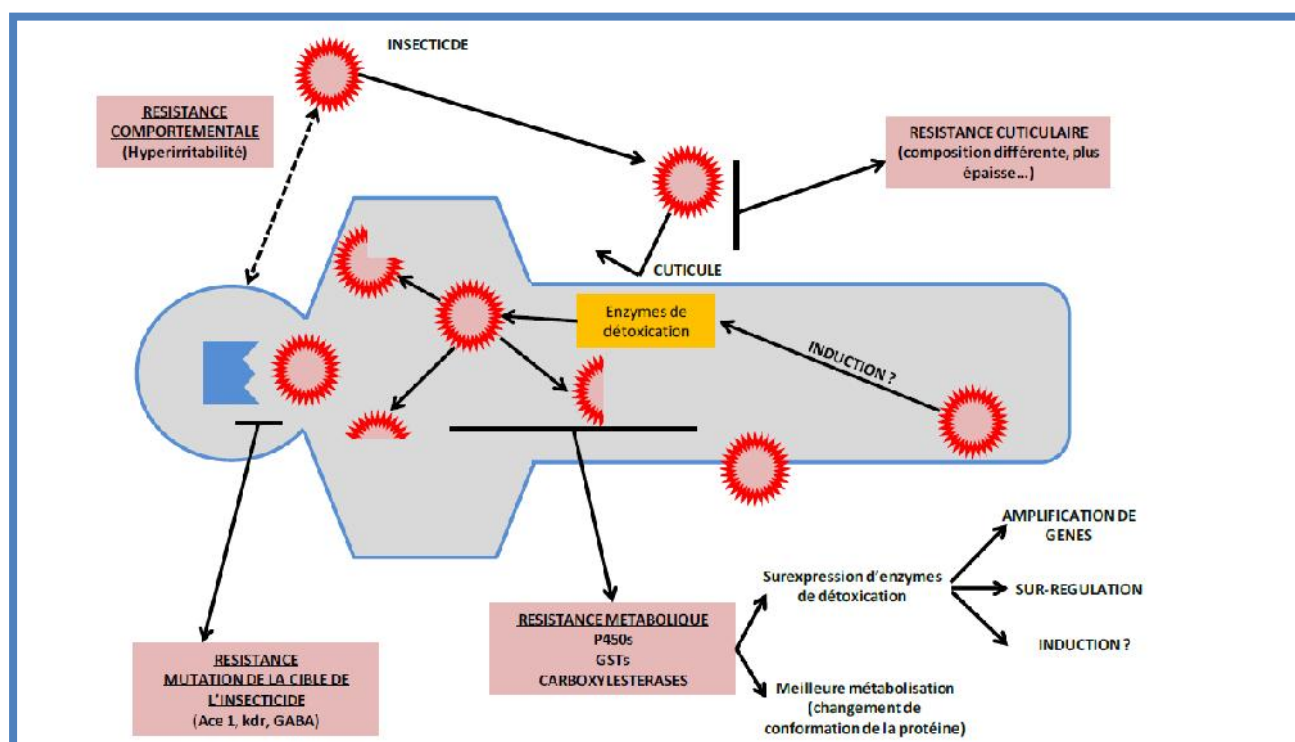


Figure 5 : Principaux mécanismes de résistances aux insecticides chimiques chez les insectes (Poupardin, 2011).

2.6.1.1. 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.

2.6.1.2. 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 détoxification 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 (Devonshire *et al.*, 1991; Wirth *et al.*, 1990).

2.6.1.3. 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.

2.6.1.3.1. Détoxification accrue

La détoxification 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).

- Dégradation 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.

2.6.1.3.2. Résistance par modification de cible

Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux (acétylcholinestérase, canal sodium voltage dépendant, récepteur GABA). Toute modification structurale réduisant leur affinité pour les insecticides peut conduire à une résistance. Ces mécanismes sont généralement très efficaces et confèrent de plus une résistance croisée à tous les insecticides agissant sur la même cible. Cette résistance est associée à une ou plusieurs mutations ponctuelles sur la séquence codant pour les protéines concernées. La résistance aux pyréthriinoïdes de *An. gambiae* résulte principalement d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour le canal sodium (Martinez Torres *et al.*, 1998) et confère aux moustiques le caractère knock-down résistant (*Kdr*). Deux mutations ont été identifiées: l'une en Afrique de l'Ouest où une leucine est remplacée par la phénylalanine (Martinez Torres *et al.*, 1998) et l'autre en Afrique de l'Est où la même leucine est remplacée par la sérine (Ranson *et al.*, 2000a).

La résistance aux organophosphorés et aux carbamates quant à elle résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour acétylcholinestérase (la mutation *Ace1*). Cette mutation se traduit au niveau de l'acétylcholinestérase par une substitution de la glycine par la sérine. La mutation *Rdl* confère aux insectes une résistance aux cyclodiènes. Cette mutation se traduit par une substitution de l'alanine par la sérine au niveau du récepteur GABA (Djogbénou *et al.*, 2008).

2.6.2. Impact de la résistance sur les programmes de lutte contre les vecteurs

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 pyréthriinoïdes (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 lambdacyalothrine dans une région de Sierra Leone où les populations anophéliennes étaient sensibles aux pyréthriinoïdes (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 pyréthriinoïdes, a été beaucoup étudiée. Selon plusieurs auteurs (Chandre *et al.*, 2000; Corbel *et al.*, 2004), les moustiques résistants aux pyréthriinoïdes, 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 pyréthriinoïdes (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 pyréthriinoïdes 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 pyréthriinoïdes.

2.7. Stratégies de gestion de la résistance

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). Les facteurs génétiques englobent les propriétés des gènes de résistance eux-mêmes: nombre de gènes impliqués (monogénique versus polygénique), leur caractère

dominant ou récessif, leurs interactions et leur valeur adaptative en présence ou en absence d'insecticide. Enfin, les facteurs opérationnels se rapportent à tout ce qui concerne les traitements: nature des produits utilisés, rémanence, doses employées, fréquence et mode d'application, ainsi que l'étendue et l'homogénéité des traitements (Leeper *et al.*, 1986).

Il existe diverses stratégies de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes. Il y a l'utilisation des molécules ayant une cible différente de celle des pyréthrinoïdes, l'utilisation en alternance ou en mélange de différents insecticides ayant des modes d'action différents, la recherche de nouvelles molécules etc. (Taylor & Georgiou, 1979; Tabashnik, 1989).

2.7.1. Utilisation d'insecticides ayant une autre cible

Les carbamates et les organophosphorés agissent sur l'acétylcholinestérase alors que les pyréthrinoïdes ont pour cible, le canal sodium voltage dépendant. Plusieurs auteurs ont déjà testé des stratégies de gestion de la résistance de *An. gambiae* aux pyréthrinoïdes en utilisant des carbamates ou des organophosphorés. Ces insecticides se sont révélés efficaces et sont donc potentiellement de bonnes alternatives contre les vecteurs du paludisme résistants aux pyréthrinoïdes (Fanello *et al.*, 1999; Akogbéto *et al.*, 2010). Fanello *et al.* (2003) en faisant une évaluation comparative de l'efficacité des rideaux imprégnés de pyréthrinoïde et de carbosulfan (carbamate) pour empêcher l'entrée des moustiques dans des cases au Burkina Faso ont trouvé que les rideaux imprégnés de carbosulfan (carbamate) donnent le meilleur résultat (Fanello *et al.*, 2003b). Cependant, ces produits agissent à fortes doses, généralement moins rémanents et de profil toxicologique moins favorable pour l'homme. N'ayant pas d'effet irritant, ils confèrent une moindre protection personnelle. C'est pour ces raisons que la recherche s'oriente désormais vers l'association d'un pyréthrinoïde et d'un non pyréthrinoïde.

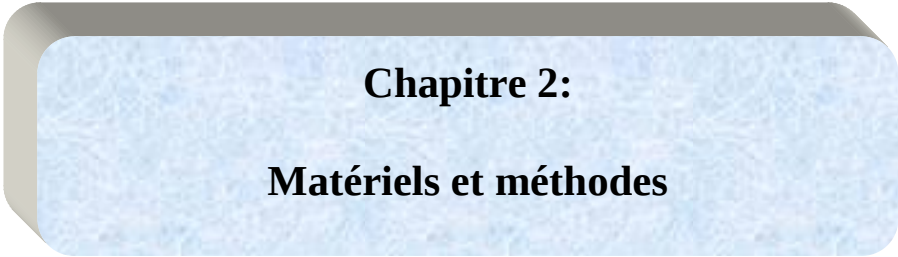
2.7.2. Utilisation de mélanges d'insecticides

Guillet *et al.* (2001b) ont évalué des moustiquaires imprégnées en mosaïque et se sont rendus compte que c'est seulement la moustiquaire imprégnée de carbamate qui a donné le meilleur résultat. Curtis *et al.* (1996) en comparant en Tanzanie, dans des cases expérimentales afférents insecticides (un carbamate et cinq pyréthrinoïdes) et matériaux utilisés comme moustiquaires et rideaux, ont proposé que les carbamates pourraient être utilisés pour la gestion de la résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes. Mais dans ces études, les carbamates ont été utilisés sur des moustiquaires ou des rideaux, il y aura donc en phase

opérationnelle, un contact entre les utilisateurs en l'occurrence les enfants et le carbamate, ce qui pourrait se révéler dangereux compte tenu du profil toxicologique de ces molécules.

2.7.3. Concept d'association des moustiquaires et de la PID (ou bâches murales imprégnées)

Face à la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, une combinaison des 2 principales méthodes de lutte anti vectorielle a été envisagée. Aussi, une association des moustiquaires et des supports plastiques imprégnés a été étudiée. Les plastiques traités avec la perméthrine ont été utilisés au cours d'une étude menée en cases expérimentales dans une zone de résistance aux pyréthrinoïdes au Burkina Faso. Mais l'efficacité de cette stratégie a été faible (44,5% de mortalité) même quand les quatre murs ont été couverts à cause de la forte irritabilité de la perméthrine vis-à-vis des moustiques (Diabaté *et al.*, 2006). Une récente étude menée également en case expérimentale qui a associé des plastiques imprégnés de bendiocarb avec les moustiquaires imprégnées a donné de bons résultats contre des populations sauvages résistantes ayant une fréquence allélique du gène *Kdr* de plus de 90% (Corbel *et al.*, 2007; Djènontin *et al.*, 2009).



Chapitre 2:

Matériels et méthodes

La plupart des études présentées dans ce document ont été entièrement réalisées au Bénin ou en partie à partir d'échantillons collectés dans différents sites (figure 6). C'est pourquoi les paragraphes suivants présentent brièvement le Bénin avant de décrire en détail la zone d'étude proprement dite, c'est-à-dire les sites où les anophèles ont été récoltés.

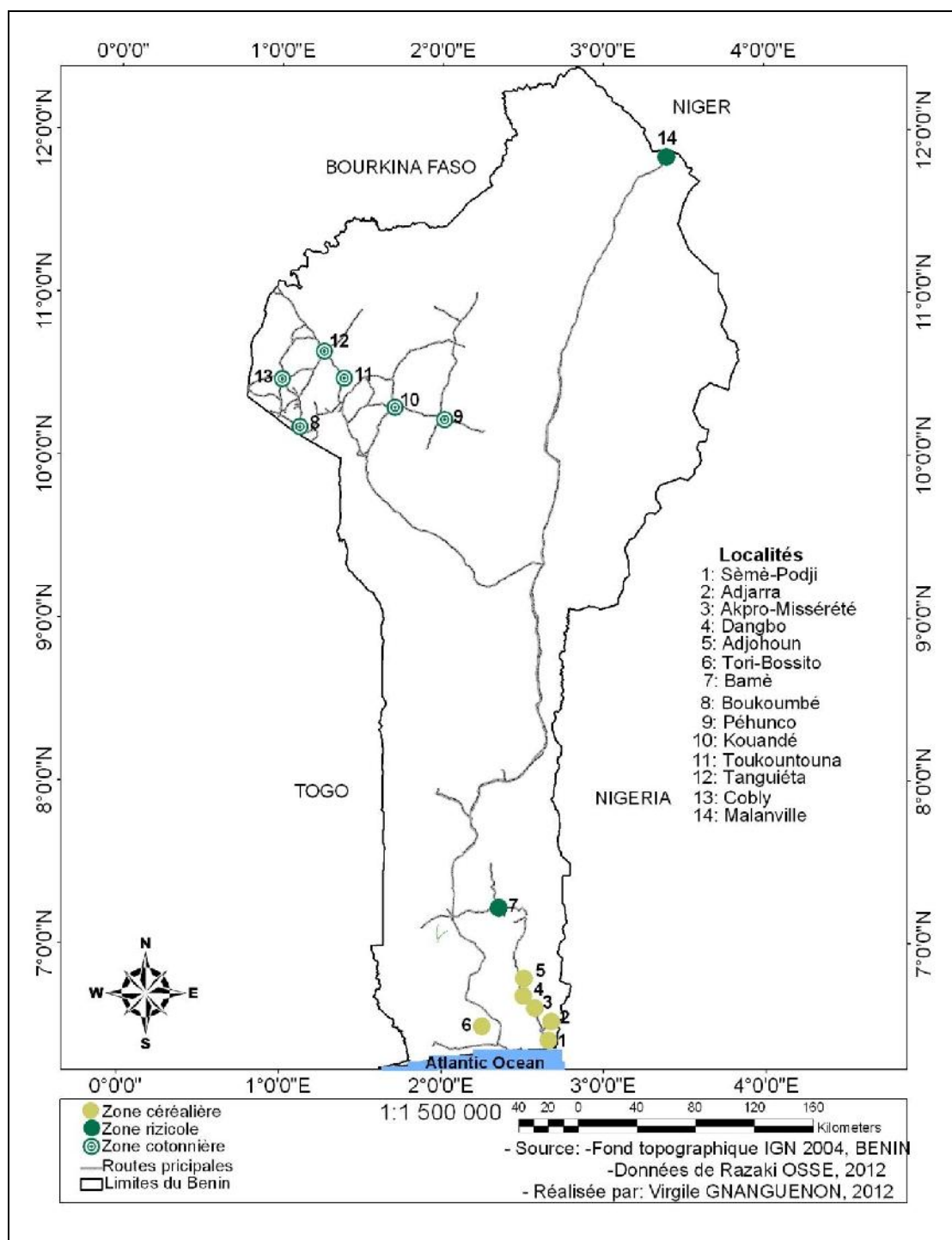


Figure 6 : Répartition géographique des sites d'étude sur le territoire national

1. Cadre de l'étude

Le Bénin est un pays de l'Afrique de l'Ouest situé dans la zone intertropicale entre l'équateur et le tropique du Cancer, plus précisément entre les parallèles 6°30' et 12°30' de latitude Nord, d'une part, et les méridiens 1° et 3°40' de longitude Est, d'autre part. Il est limité au nord par le fleuve Niger qui le sépare de la République du Niger, au nord-ouest par le Burkina Faso, à l'est par le Nigéria, au sud par l'océan Atlantique. Il couvre une superficie de 114 763 Km². Du Nord au Sud, il s'étend sur 700 Km. La largeur varie de 125 Km (le long de la côte) à 325 Km (à la latitude Tanguiéta-Ségbana). Selon les estimations officielles de 2008, sa population était environ de 8,29 millions d'habitants. Le relief du Bénin est peu accidenté comprenant une région côtière, basse et sablonneuse limitée par des lagunes; un plateau d'argile ferrugineux; un plateau silico-argileux, parsemé de quelques sous-bois; au Nord-ouest, le massif de l'Atacora (800 mètres) et au Nord-est, les plaines du Niger silico-argileuses très fertiles. Quoique relativement peu arrosé, le Bénin a un réseau hydrique assez important avec deux grands bassins : le bassin du Niger qui comprend les fleuves affluents du Niger et le bassin Côtier dont les fleuves rejoignent la mer. Chaque bassin est parsemé de petits cours d'eau permanents à semi permanents qui permettent de maintenir les activités agro-pastorales (INSAE, 2004).

1.1. Climat

Par sa situation en latitude (entre 6°30' et 12°30' de latitude nord), le Bénin appartient au domaine des climats chauds et humides de la zone intertropicale. Pour la zone intertropicale où se trouve le Bénin, le soleil passe apparemment deux fois au zénith, mais ses rayons ne sont jamais très éloignés de la verticale, c'est pourquoi les températures sont constamment élevées avec une moyenne de 25°C pour l'ensemble du pays. D'avril à novembre au sud et de juin à octobre au nord, souffle un vent humide venant de l'océan : l'alizé maritime ou mousson. De novembre à début mai dans le nord et de décembre à mars dans le sud souffle un vent sec venant du Sahara : l'alizé continental (Adam & Boko, 1993).

On distingue trois types de climats :

➤ Le climat béninien (subéquatorial)

Il règne au sud jusqu'à la latitude de Savè. Les températures sont élevées mais jamais excessives. Les maxima se situent en mars (26° C à Cotonou) et les minima en août (24° C).

L'amplitude thermique annuelle (température moyenne du mois le plus chaud moins température moyenne du mois le moins chaud) est faible, inférieure à 5°C. Mais l'amplitude thermique journalière (différence entre les deux températures extrêmes enregistrées dans la journée est supérieure à 10°C. L'humidité relative est élevée (70 à 90 %) à cause de la proximité de l'océan (Adam & Boko, 1993). C'est un climat à quatre saisons: une grande saison de pluies d'avril à juillet, une petite saison sèche d'août à septembre, une petite saison pluvieuse d'octobre à novembre et une grande saison sèche de décembre à mars (figure 7). Les données de la figure 7 ont été recueillies par l'ASECNA (Agency for Aerial Navigation Safety in Africa and Madagascar).

➤ Le climat des régions soudaniennes

Il comprend deux nuances :

Le climat sud soudanien

Il couvre la région au nord du domaine subéquatorial jusqu'à la latitude de Bembèrèkè. Les passages du soleil au zénith sont déjà plus rapprochés et la petite saison sèche est à peine sensible. Les températures sont plus élevées avec une amplitude thermique journalière pouvant atteindre 10°C, des minima en août et des maxima en mars. Il y a deux saisons.

Le climat nord soudanien

Les amplitudes thermiques journalières sont plus fortes, surtout pendant l'harmattan. L'année se partage en deux saisons bien tranchées: une saison sèche de novembre à début mai et une saison pluvieuse de mai à octobre. En effet, dans cette région, le soleil ne passe qu'une fois au zénith. La mousson y arrive tardivement et s'en retire très tôt. Par contre, l'harmattan, et plus généralement l'air continental sec, y soufflent de novembre à mai apportant de fortes températures et la sécheresse, lesquelles sont plus marquées au-delà de la latitude de Kandi. Les minima moyens thermiques se situent en août (Adam & Boko, 1993).

➤ Le climat atacorien

Il couvre le nord-ouest du Bénin (chaîne de l'Atacora). Les températures sont plus fraîches à cause de l'altitude, ainsi les orages sont plus en plus fréquents. Les moussons et aux influences orographiques, situent cette région parmi les plus arrosées du Bénin. Il pleut pratiquement d'avril à octobre à Natitingou qui enregistre plus de 1300 mm. A Boukoubé on enregistre aussi 1350 mm par an (Adam & Boko, 1993).

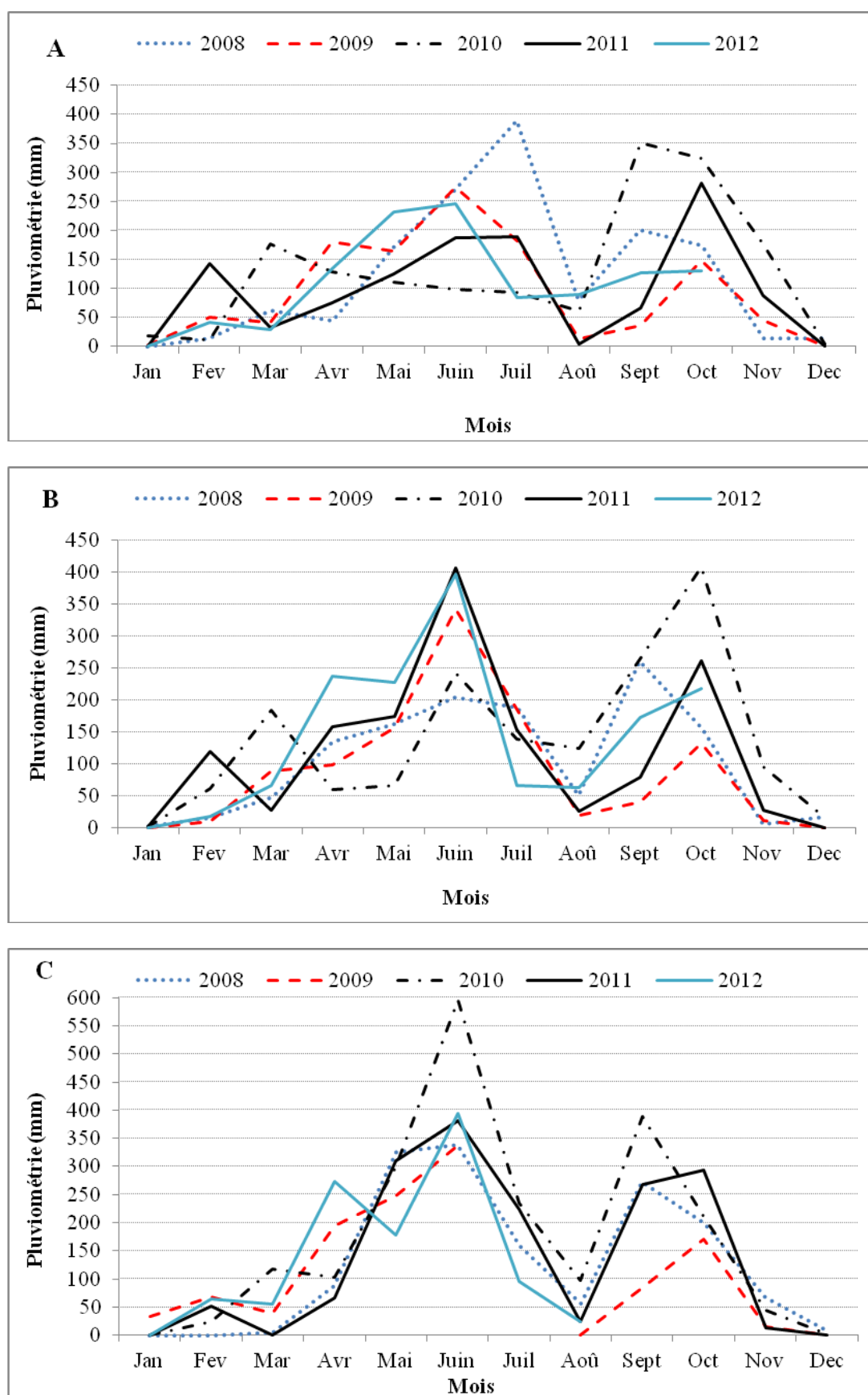


Figure 7 : Données pluviométriques de l'Ouémé des 5 dernières années (2008-2012) : Adjohoun (A), Dangbo (B) et Sèmè (C)

1.2. Végétation

Trois types de végétations caractérisent le pays. Une forêt tropicale humide, très dense, recouvrait autrefois le pays jusqu'aux lagunes. La région méridionale a été largement déboisée et mise en culture, sauf aux abords des fleuves (forêts-galeries). Les palmiers à huile constituent aujourd'hui de grandes plantations. Des cocotiers ont été plantés entre mer et lagunes. La savane au centre du Bénin qui est en grande partie recouverte d'une forêt sèche, a quelques forêts plus anciennes subsistant. La savane arborée et les forêts-galeries dominent dans les régions soudanaises, au climat plus sec (Adam & Boko, 1993).

2. Sites d'étude

Toutes les études sur la transmission du paludisme, le comportement des moustiques et la résistance des vecteurs aux insecticides ont été menées dans quatre communes toutes situées dans le département de l'Ouémé, au sud du Bénin: Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè-Kpodji (Figure 8) ayant au total une population de 310400 habitants (INSAE, 2004). L'ensemble des 4 communes couvre une superficie de 977 km² et compte 64799 ménages, 62890 enfants de 0 à 5 ans répartis dans 174 villages (INSAE, 2004). C'est une population très variée constituée d'agriculteurs et de commerçants. La plus importante frange représente les Ouémènou essentiellement à Dangbo et Adjohoun. La deuxième frange est constituée des Torinou à Missérété et des Xwla à Sèmè. Ces populations pratiquent, dans l'ensemble du département de l'Ouémé, le catholicisme (37,1%), le christianisme céleste (12,3%) et l'islam (12,1%) (INSAE, 2004).

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

formations sanitaires est respectivement de 32%, 41%, 20%, et 40% à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè (Ministère de la Santé de la République du Bénin, 2007).

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

Le plateau est caractérisé par un sol en terre de barre, un mélange assez homogène d'argile kaolinique et de sable quartzeux. La végétation est essentiellement anthropique constituée d'arbustes, de palmiers à huile et de graminées avec quelques reliques forestières par endroits. Le relief est assez accidenté et sous forme de pente orientée vers les dépressions marécageuses. Cette situation est très accentuée à Adjohoun, Dangbo et Missérété où l'érosion du sol creuse de nombreux trous, lieux de rétentions d'eaux temporaires durant les saisons pluvieuses. Cela constitue pour les moustiques des gîtes favorables (INSAE, 2004).

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

épidémiologique du paludisme. Pendant la crue, la plupart des gîtes de *An. gambiae* sont lessivés. A la décrue, le retrait des eaux crée de petites poches d'eau çà et là, favorables au développement de *An. gambiae*.

Les données issues de ces quatre communes sous traitement PID ont été comparées à celles d'une zone témoin (commune de Adjara) présentant les mêmes caractéristiques mais où aucune maison n'a été traitée. Les 4 communes d'intervention et la commune témoin sont situées dans le même département, le département de l'Ouémé. Chaque commune dispose d'un centre de santé auquel a accès toute la population de la commune. Grâce aux efforts du Programme National de Lutte contre le Paludisme, l'accès à la couverture ciblée en moustiquaires imprégnées est une réalité dans les 5 communes. Toutefois, les communes de Adjohoun, Dangbo et Sèmè sont situées au bord de cours d'eau permanents. Cependant, le choix des localités de capture a tenu compte de la répartition des gîtes, étant entendu que toute disparité dans la distribution des gîtes sur le terrain, surtout dans les communes d'intervention et témoin pourrait avoir une influence sur les résultats en terme d'impact sur la densité des moustiques. C'est pourquoi le choix des localités de capture a respecté, dans les 5 communes, la position des maisons par rapport aux gîtes permanents et semi permanents.

Dans le contexte actuel de promotion des moustiquaires imprégnées dans tous les pays de l'Afrique au sud du Sahara , il est difficile de comparer une zone "PID" et une zone "non PID" et "non MIILD" . Les 4 communes sous PID (Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè) et la commune témoin (Adjara) appartiennent au même département (Ouémé). Toutes les 5 communes bénéficient de la couverture ciblée en MIILD. Jusqu'en 2010, les 5 communes avaient en commun l'utilisation des MIILD par les deux couches vulnérables (enfants de moins de 5 ans et femmes enceintes). La seule différence en termes d'intervention de lutte est la PID à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè. Dans ces conditions, nous considérons que toute réduction de la transmission du paludisme dans ces 4 communes par rapport à la commune témoin est imputable à la PID.

Par ailleurs, les études menées sur la relation entre le portage d'un gène de résistance et l'infectivité au *P. falciparum* ont été réalisées dans 14 localités choisies suivant un transect sud-nord de manière à prendre en compte toutes les zones écologiques: Sèmè, Dangbo, Adjohoun, Adjara, Missérété et Tori-Bossito en zone céréalière au sud du Bénin, Bamè en zone rizicole au centre, Pehunco, Kouandé, Cobly, Boukoumbé, Tanguiéta et Toukountouna en zone cotonnière et céréalière et d'altitude au nord-ouest et Malanville en zone rizicole au

nord (figure 6). Nous avons tenu compte de la diversité des milieux écologiques pour avoir la possibilité de rencontrer les formes de *An. gambiae* espérées et une fréquence des génotypes RR, RS et SS permettant les comparaisons. Par ailleurs, il n'était pas évident au départ de trouver un nombre élevé de *An. gambiae* infectés au *P. falciparum* dans un contexte d'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées par les populations. Mais, nous avons pensé qu'en variant les zones écologiques, on augmente la possibilité de découvrir un milieu où le taux d'infection de *An. gambiae* est relativement élevé.

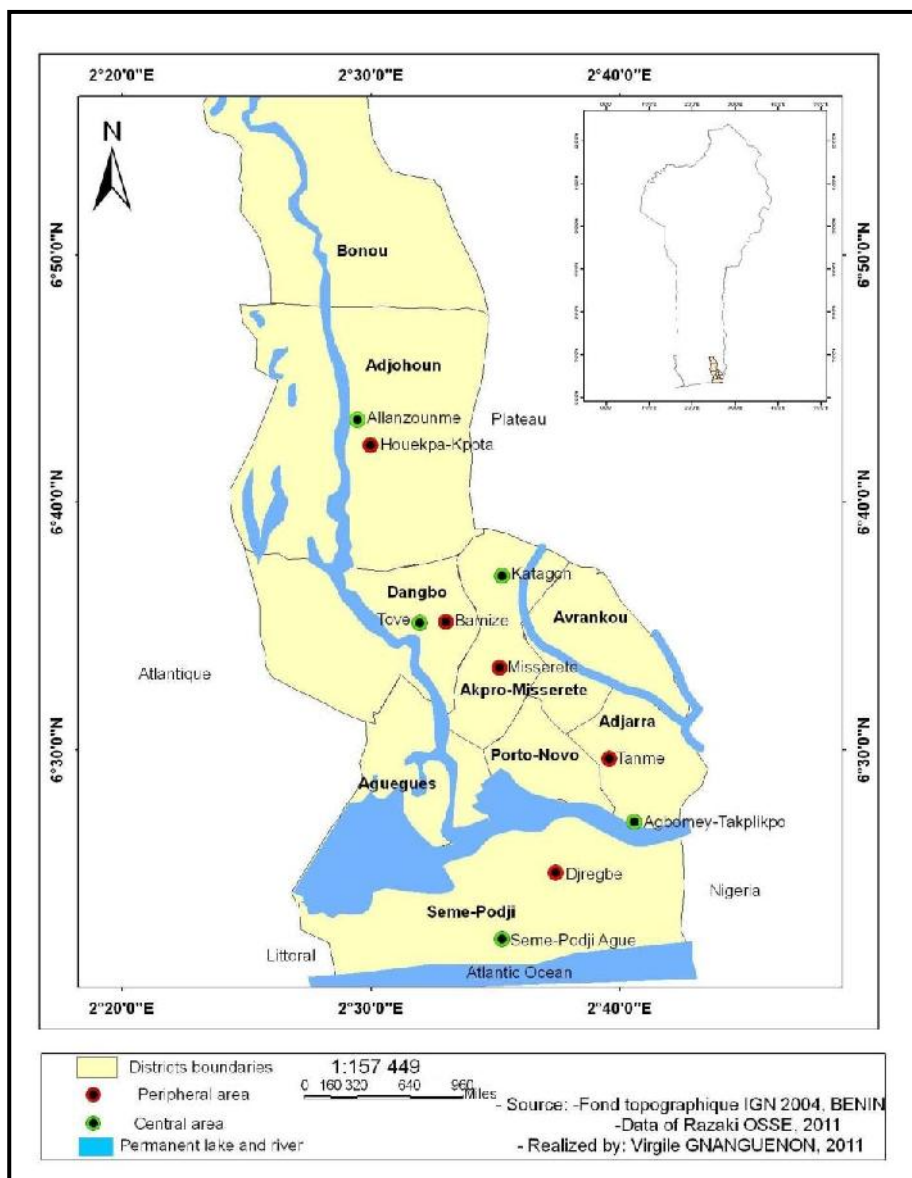


Figure 8: Carte de la zone d'étude montrant les localités choisies dans la zone centrale et la zone périphérique pour l'échantillonnage des anophèles.

3. Mise en place du 3^{ème} et du 4^{ème} tour de la PID

Avant la PID, le choix d'un insecticide a été nécessaire. Divers insecticides ont été évalués pendant 4 mois dans des cases expérimentales. Trois d'entre eux (Sumithion 40 WP [Fénitrothion]; Master Quick ZC [mélange de chlorpyrifos 250 g/L plus deltaméthrin 12 g/L] et Ficam M [bendiocarb, 800 g/kg]) se sont révélés efficaces contre les anophèles résistants aux pyréthrinoïdes. Parmi les trois insecticides, le bendiocarb était le produit choisi par le PNLP pour la mise en œuvre de la PID (Akogbéto *et al.*, 2010).

La pulvérisation intradomiciliaire (PID) avec du bendiocarb à la dose de 400mg/m² a été effectuée dans les habitations des communes d'Adjohoun, de Dangbo, de Missérété et de Sèmè. La formulation FicamTM WP du bendiocarb sous forme de poudre soluble dans l'eau conditionnée dans des sachets de 125 g a été utilisée. Plus de 90% des ménages ont été traités.

Les deux premiers tours de la PID avaient été effectués respectivement en juillet 2008 et mars 2009. En 2010, le troisième et le quatrième tour ont eu lieu respectivement au cours de mars-avril et du mois d'Août. Les quatre tours ont été effectués par des volontaires choisis dans la communauté locale et formés par l'équipe du Research Triangle Institute (RTI), le partenaire d'exécution de l'USAID. Le traitement des murs a été effectué avec un pulvérisateur manuel à pression préalable du type HUDSON XPERT (figure 9). Avant chaque traitement, les agents pulvérisateurs sont protégés avec une blouse, des gants, des bottes et un casque de sécurité. Les habitants ont été sensibilisés par les autorités locales et les agents de santé et invités à ranger leurs effets et à sortir tous leurs aliments et leurs ustensiles de cuisines.



Figure 9 : Pulvérisateur manuel à pression préalable du type HUDSON XPERT

4. Mise en place des MIILD: campagne de distribution des Olyset après l'arrêt de la PID

La distribution des moustiquaires a ciblé les ménages des communes de Dangbo, Adjohoun, Missérété et Sèmè. Elle a été faite par le PNLP en collaboration avec les agents de santé et les autorités locales des communes bénéficiaires (figure 10). Des postes de distribution ont été installés dans les centres de santé, de loisirs, les écoles et sur les places publiques. Les chefs de ménage ou leurs représentants se sont présentés à ces postes munis des coupons reçus lors de la campagne de vaccination contre la poliomyélite. Dans ces postes, 4 personnes attendent pour accueillir les populations, les orienter et leur montrer comment utiliser les moustiquaires. Les moustiquaires qui ont été distribuées sont de type Olyset de forme rectangulaire de 150 cm de hauteur, 180 cm de longueur et de 160 cm de largeur. Ces Olyset sont des moustiquaires faites de polyéthylène et imprégnées avec la perméthrine à 2%. Elles ne nécessitent pas de réimprégnation pendant toute la durée d'utilisation de 4 à 5 ans. Ces moustiquaires ont été distribuées avec un taux de couverture de 90,02% en juillet 2011 (PNLP, 2012).



Figure 10 : Campagne de distribution des MIILD

5. Evaluation des indicateurs entomologiques dans les zones d'étude

5.1. Méthodes d'échantillonnage des moustiques

Cet échantillonnage a été fait suivant différentes techniques et en fonction du type d'étude.

5.1.1. Capture de nuit sur homme

Dans chacune des communes, une zone centrale et une zone périphérique ont été choisies. Des captures mensuelles de moustiques agressifs ont été réalisées dans les deux zones à l'aide des aspirateurs à bouche de 21h à 05h du matin, sur des sujets humains volontaires qui, au préalable, ont donné leur consentement favorable pour le déroulement de l'activité (figure 11). Deux nuits de collecte des moustiques ont été organisées par mois avant, pendant et après l'arrêt de la PID. Ces captures ont été effectuées d'avril à juillet 2008 (avant intervention), d'avril à décembre 2010 (après le troisième et le quatrième tour de la PID) et d'avril à décembre 2011 (après l'arrêt de l'intervention). Dans chaque commune, deux cases ont été choisies par zone pour la collecte des moustiques. Les données enregistrées ont permis

d'évaluer la densité agressive (PHN), l'âge physiologique et le taux d'inoculation entomologique des vecteurs (TIE).



Figure 11 : Capture de nuit sur appât humain

5.1.2. Capture par piège fenêtre

Pour évaluer l'impact des interventions sur le comportement des moustiques, en particulier leur exophilie, des captures de moustiques adultes ont été réalisées à partir des pièges fenêtres de sortie et par aspersion intradomiciliaire de bombes insecticides non rémanentes à l'intérieur des cases.

Huit (08) pièges fenêtres de sortie sont placés dans chaque commune. Ces pièges ont été placés sur les fenêtres des cases vers l'extérieur pendant 2 nuits tous les mois de 18h à 6h le lendemain (figure 12). Les habitations où sont installés les pièges ont été sélectionnées en fonction du nombre de personnes qui y dorment (une personne par case). Les habitations utilisées sont construites avec des murs de terre sèche et un toit en tôle. De plus, il n'y a pas d'ouverture entre le haut des murs et le toit de ces habitations. Les fenêtres pièges de sortie utilisées sont constituées d'un tulle de térylène montée sur un cadre en fer de forme cubique, de 30 cm d'arrête. L'entrée est dessinée dans un cône tronqué de 2,5 cm de diamètre de trou et dont le sommet est à 2,5 cm de la face opposée du piège. Sur chaque fenêtre est placé un

contre plaqué de 1m de côté qui porte en son centre une ouverture de 30 cm de côté. Les moustiques récoltés dans les pièges sont transférés dans des gobelets couverts de voile. Ensuite, l'aspersion d'une bombe aérosol dans les mêmes habitations permet de récolter les autres moustiques.

Ces deux méthodes d'échantillonnage nous ont permis d'avoir une estimation de la densité totale des espèces de moustiques dans les maisons traitées et la proportion de moustiques femelles qui ressortent des maisons. Les anophèles vecteurs collectés sont classés en fonction de l'état physiologique de leur abdomen.



Figure 12 : Capture à l'aide d'un piège fenêtre

5.1.3. Collecte des larves

Nous avons réalisé des tests de sensibilité pour suivre l'évolution de la résistance des vecteurs aux insecticides dans les zones sous PID et des tests d'efficacité sur les matériaux traités. De tels tests exigent des spécimens de moustiques âgés de 2-5 jours qu'on ne peut obtenir qu'à partir des larves. Ainsi, les larves de *An. gambiae* ont été collectées au cours des années 2010 (juin- juillet) et 2011 (juin-juillet et octobre-novembre) après des visites de terrain organisées dans les quatre communes sous PID et dans le témoin (Adjara) à la recherche de gîtes de *An. gambiae*. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau

avec une louche, puis acheminées vers l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) pour l'élevage (figure 13).

Des prospections larvaires ont été aussi faites à Ladji pour les tests d'efficacité entomologiques des moustiquaires. L'échantillon de *Anopheles gambiae* locale de Ladji est une population hautement résistante aux pyréthrinoïdes. Elle est actuellement disponible dans les laboratoires du CREC où elle sert de population locale résistante de référence. Elle a été sélectionnée dans la localité de Ladji située à 7 Km du centre de la ville de Cotonou, au sud du Bénin. Dans cette localité, la fréquence allélique du gène de résistance *Kdr* (gène qui confère la résistance aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'Ouest) est très élevée et les anophèles présents dans cette localité portent ce gène sous la forme homozygote (Corbel *et al.*, 2007).

5.1.4. Elevage des moustiques

A l'insectarium, les larves sont triées puis séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs étiquetés contenant de l'eau. Elles sont réparties en moyenne par lot de 100 par bac pour optimiser non seulement leur croissance mais aussi pour éviter le cannibalisme (Koenrardt *et al.*, 2004). Les larves sont nourries avec des croquettes pour chat (5 grammes mélangés dans un bac de 500 ml d'eau de gîte larvaire pour 80 larves d'anophèles) qui sont des aliments riches en protéine et en sels minéraux. Chaque bac est recouvert de toile moustiquaire et entreposé dans une salle dont l'humidité relative varie entre 70 à 80% et la température entre 25 à 30°C (figure 13). La photopériode est assurée par des lampes fluorescentes éclairant de 6:00 heures du matin à 6:00 heures du lendemain. A l'apparition des nymphes, elles sont prélevées et mises dans une cage cubique de 30cm de côté pour émergence des adultes. Les adultes issus de l'émergence des larves collectées sur le terrain et mis en cage sont nourris au jus de miel (10%). Les femelles adultes de 2 à 5 jours sont isolées pour être soumises aux tests de l'effet résiduel du bendiocarb sur les supports traités, d'efficacité des moustiquaires et de sensibilité/résistance aux différents insecticides.



Figure 13 : Récolte, tri (A et B) et élevage (C) des larves d'anophèles

5.2. Identification et traitement des moustiques

Après chaque nuit de capture, les moustiques collectés sont comptés et séparés en *Culicinae* et *Anophelinae* à l'aide de la loupe binoculaire. Les anophèles sont mis dans des gobelets pour identification selon la clé de Gillies et de Meillon (1968) et de Gillies & Coetzee (1987). Les ovaires d'une partie des femelles de *An. gambiae* s.l. capturés sur appât humain sont disséqués pour déterminer le taux de parturité, en observant le degré d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). Les spécimens de *An. gambiae* sont conservés séparément selon le lieu de capture dans des tubes eppendorf étiquetés contenant du silicagel à -20°C avant leur analyse.

Tout moustique destiné au test d'ELISA–CSP et à la PCR est divisé en deux parties: la tête-thorax pour la première analyse et le reste du corps pour la seconde. La recherche de l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum* a été faite par la méthode de titrage immunoenzymatique (Elisa CSP) décrite par Wirtz *et al.* (1987) (voir annexe). Les carcasses (abdomen, pattes et ailes) de chaque moustique ont été utilisées pour la caractérisation moléculaire (figure 14).

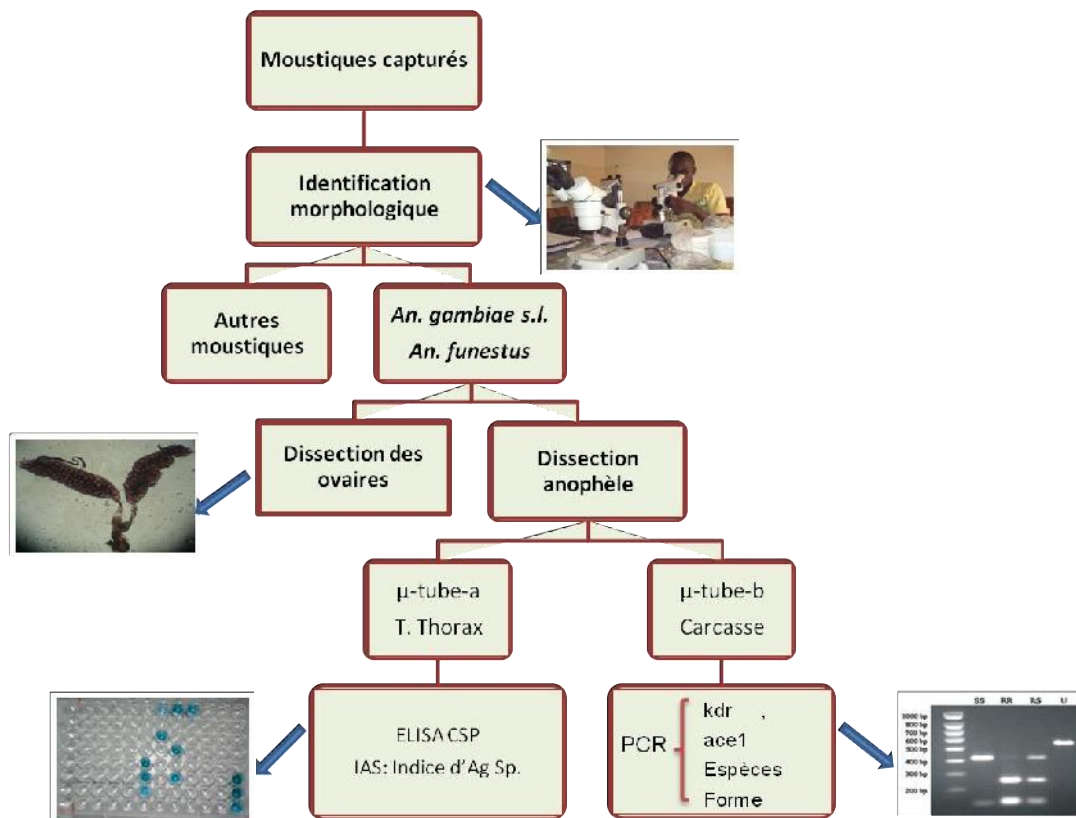


Figure 14 : Diagramme montrant le processus d'identification et de traitement des vecteurs

5.3. Bioessais

5.3.1. Test de sensibilité

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiés comme *An. gambiae* s.l. ont été exposés à des doses diagnostiques de divers insecticides pour les tests de sensibilité en utilisant les papiers imprégnés d'insecticides comme le décrit le protocole standard des tests OMS (OMS, 1998). Les insecticides suivants ont été testés: la deltaméthrine (0,05%), la perméthrine (0,75%), le DDT (4%) et le bendiocarb (0,1%). Pour chaque insecticide, cinq tubes à essai ont été utilisés: un papier non traité comme un contrôle et quatre papiers traités pour l'exposition des moustiques. Une moyenne de 20-25 moustiques a été introduite dans chaque tube. Les femelles de *Anopheles gambiae* utilisées dans cette étude ont été exposées pendant une heure aux papiers imprégnés d'insecticide. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous le choc de l'insecticide (effet knock-down) au bout de différents intervalles de temps (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes)

d'exposition a été enregistré. Après 60 minutes d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes contenant des papiers non traités et mis en observation (25°C et 80% d'humidité) avec un accès libre au jus sucré (jus de miel à 10%). La mortalité au bout de 24 heures a été déterminée selon le protocole de l'OMS.

Le statut de résistance des moustiques testés a été déterminé selon les critères de l'OMS (OMS, 1998). Toute population de *An. gambiae* dont le taux de mortalité des moustiques testés est compris entre 98-100% est considérée comme sensible. Quand la mortalité est située entre 80-97%, les spécimens de ce groupe sont considérés comme appartenant à une population de suspicion de résistance à confirmer. Lorsque la mortalité est inférieure à 80%, la population est considérée comme résistante.

5.3.2. Bioessai sur les supports traités

Nous avons réalisé des bioessais avec des cônes OMS pour évaluer l'effet résiduel du bendiocarb sur les supports traités avec une souche de *An. gambiae* sensible (Kisumu) et l'efficacité du produit sur les populations sauvages de *An. gambiae* récoltées dans les 4 communes.

Divers supports traités (murs en ciment crépi et ciment non crépi, en banco crépi et non crépi, en bouse de vache, porte en métal et en bois) au cours du quatrième tour de la PID ont été testés en utilisant le protocole standard des tests en cône de l'OMS (OMS, 1998) avec les deux souches de *An. gambiae* mentionnées ci-dessus. Pour sa réalisation, 15 jeunes moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours sont prélevés à l'aide d'un aspirateur et introduits dans chacun des 3 cônes transparents fixés à des hauteurs différentes sur le support traité (haut, milieu et bas) (figure 15). Ces moustiques restent en contact du support pendant 30 minutes et sont ensuite retirés avec précaution des cônes et transférés à l'aide d'un autre aspirateur dans des gobelets stériles différents étiquetés et voilés sur lesquels sont posés des tampons de coton imbibés du jus de miel (solution de sucre à 10%) (Figure 15). Après 24 heures de mise en observation, les taux de mortalité sont déterminés pour chaque souche de moustiques par rapport aux divers supports traités. Pour chaque bioessai, 45 moustiques sont utilisés par support.

La réalisation des bioessais sur les supports traités a été échelonnée dans le temps suivant des périodes T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 et T_7 définies comme suit :

- T_0 : 0 à 30 jours après la date de pulvérisation ;
- T_1 : 31 à 60 jours après la date de pulvérisation ;
- T_2 : 61 à 90 jours après la date de pulvérisation ;
- T_3 : 91 à 120 jours après la date de pulvérisation ;
- T_4 : 121 à 150 jours après la date de pulvérisation ;
- T_5 : 6 mois après la date de pulvérisation ;
- T_6 : 7 mois après la date de pulvérisation ;
- T_8 : 8 mois après la date de pulvérisation.



A

B

Figure 15: Test en cône sur les supports traités (A) et mise en observation des moustiques pour une lecture après 24 heures (B).

Les épreuves nécessitent des lots de moustiques uniformes du point de vue du sexe, de l'âge, du développement ovarien et du contenu stomacal. Pour cela, l'opération se fait sur des femelles de *An. gambiae s.l.* à jeun, c'est-à-dire non nourries au sang, âgées de 2 à 5 jours à partir de la date d'émergence. Deux populations de *An. gambiae* ont été utilisées :

- Une population de femelles de *An. gambiae* sauvages issues d'un élevage de larves et de nymphes d'anophèles récoltées sur le terrain afin d'évaluer l'efficacité du bendiocarb dans les conditions naturelles;
- Une souche de femelles de *An. gambiae* Kisumu (souche sensible de référence), afin d'évaluer la rémanence du bendiocarb selon les recommandations de l'OMS. *An. gambiae* Kisumu est isolé dans la localité de Kisumu au Kenya, en Afrique de l'Est. Elle est de nos jours précieusement préservée dans plusieurs laboratoires d'entomologie médicale où elle est fortement sollicitée comme une souche sensible de référence.

5.3.3. Tests d'efficacité des moustiquaires

Vingt moustiquaires (10 Olyset distribués en juillet 2011 et 10 Permanets qui sont en utilisation depuis 1-2 ans (2009-2010) provenant de la zone d'étude ont été choisies au hasard et soumises au test d'efficacité (test en cône) pour vérifier la présence éventuelle des résidus d'insecticide sur les fibres. Nous n'avons pas testé plus de vingt moustiquaires compte tenu du nombre important de moustiques à utiliser pour les tests. Quatre autres moustiquaires (2 non traités, 1 nouvelle Olyset et 1 nouvelle Permanet jamais utilisées) ont été également testées et utilisées comme témoins négatifs et positifs.

Des tests en cône ont été réalisés suivant le protocole adapté de l'OMS (OMS, 2005a). Quatre (4) cônes ont été placés sur les diverses faces des MIILD à tester: 08 à 10 jeunes femelles âgées de 2-5 jours de *Anopheles gambiae* Kisumu (souche sensible) et de *Anopheles gambiae* souche sauvage ont été introduites dans chaque cône. Les moustiques (32 à 40 en moyenne par moustiquaire) ont été mis en contact des différentes faces pendant 3 minutes (figure 16) puis ils ont été retirés des cônes et transférés à l'aide d'un autre aspirateur dans des gobelets stériles voilés sur lesquels a été posé du coton imbibé de jus sucré (solution de sucre à 10%). Après 24h de mise en observation, les taux de mortalité ont été déterminés pour chaque souche de moustiques. Les survivants et les morts des spécimens de terrain issus des bioessais ont été conservés dans différents tubes eppendorf et passés à la PCR afin de rechercher les différents mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs aux insecticides.

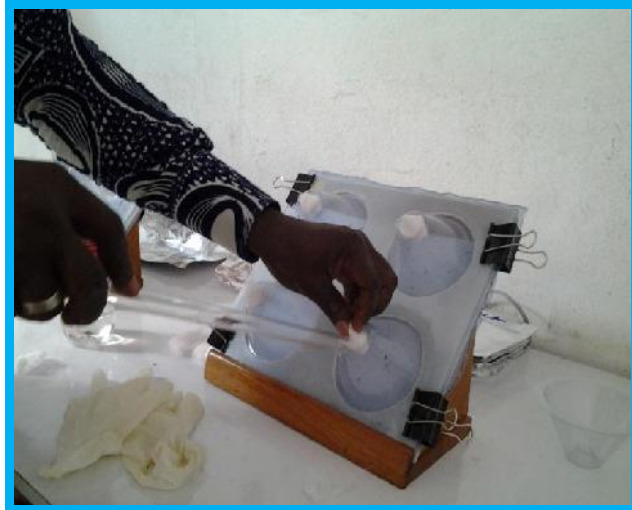


Figure 16: Réalisation des tests en cône sur les MIILD retirées de la zone d'étude

6. Identification des espèces et formes moléculaires au sein du complexe *An. gambiae* s.l. et caractérisation moléculaire des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1*

Après l'identification morphologique, les moustiques issus des captures sur appât humain, des tests de sensibilité et des tests d'efficacité ont été soumis aux tests de biologie moléculaire en fonction des objectifs de chaque étude. Les femelles d'anophèles ont été analysées à la PCR selon le protocole de Scott *et al.* (1993) pour la détermination des différentes espèces de *An. gambiae* s.l, puis selon le protocole de Favia *et al.* (1997) pour l'identification des différentes formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. Les mutations *Kdr* Leu-Phe et *Ace-1* G119S ont été déterminées respectivement suivant les protocoles de Martinez *et al.* (1998) et de Weill *et al.* (2004) (voir protocoles détaillés en annexe). Après le génotypage de ces moustiques, la fréquence allélique des deux mutations au sein des moustiques a été calculée.

7. Enquête sociologique sur l'utilisation des moustiquaires distribuées par le PNLP

L'objectif de cette étude est de donner des informations sur la couverture et l'utilisation des MIILD Olyset distribuées par le PNLP en juillet 2011 et d'évaluer le niveau d'efficacité en insecticide de ces MIILD après 6 mois, 1 an et 2 ans d'utilisation.

➤ **Echantillonnage : choix des sites d'étude**

L'enquête a été réalisée dans les quatre communes précédemment sous PID (Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè). Un plan d'échantillonnage par niveau a été mis en place en associant à chaque commune une pondération uniforme. Dans chaque commune, il a été sélectionné au hasard deux arrondissements et dans chaque arrondissement, un autre niveau de sélection qui prend au hasard deux villages puisque la pondération uniforme a été aussi associée à chaque arrondissement. Ainsi, les arrondissements de Adjohoun et Démè, Dangbo et Késsounou, Katagon et Missérété, et Agblangandan et Djrègbé ont été choisis respectivement dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè. L'objectif de chacune des 2 pondérations est de satisfaire à la condition de représentativité de notre échantillon.

➤ **Taille de l'échantillon**

Vu les objectifs à atteindre et le souci d'avoir une bonne estimation des paramètres à mesurer par l'enquête, nous avons décidé de visiter 96 ménages par village avec une marge de 5% pour compenser les imprévus tels que la non-réponse due aux erreurs d'enregistrement et autres. Ainsi, 100 ménages ont été visités par village, 400 ménages par commune et au total 1600 ménages pour toute la zone d'étude. Cet échantillon est représentatif pour la population des 4 communes.

➤ **Principes du sondage**

Dans chaque ménage, toutes les catégories de moustiquaires sous utilisation par les populations (Olyset distribués par le PNLP en 2011, autres moustiquaires comme Permanets, Olyset et autres données par le PNLP et les partenaires) ont été identifiées.

➤ **Evaluation de l'accès à la couverture universelle en moustiquaires Olyset**

Pour évaluer la couverture des Olyset distribués par le PNLP en juillet 2011, dans chaque arrondissement, nous avons déterminé le nombre de personnes ayant déclaré avoir reçu les Olyset PNLP 2011 et le nombre de personnes ne les ayant pas reçues. Selon le principe d'une moustiquaire pour deux personnes, le taux de couverture a été déterminé par le ratio du

nombre de Olyset PNLP 2011 disponibles dans les ménages par le nombre de Olyset qu'il fallait.

➤ **Evaluation du taux d'utilisation des Olyset PNLP 2011**

L'évaluation du taux d'utilisation des Olyset PNLP 2011 nécessite la connaissance du nombre de Olyset PNLP 2011 réellement en utilisation dans les ménages. Les personnes qui les utilisent sont ceux qui ont déclaré avoir dormi sous ces moustiquaires la nuit avant l'enquête. Pour calculer ce taux, nous avons divisé le nombre de répondants ayant déclaré avoir dormi sous Olyset PNLP 2011 par le nombre total de répondants qui ont déclaré les avoir reçus. Une utilisation supérieure ou égale à 80 % a été considérée satisfaisante.

Toute moustiquaire installée ou pliée non rangée et dont les utilisateurs avouent l'avoir utilisée pendant la dernière nuit avant l'enquête dans un ménage, est considérée comme une moustiquaire en utilisation.

➤ **Evaluation du taux d'usure des Olyset**

L'aspect physique de chaque moustiquaire est évalué. Le nombre et la taille des trous dans les moustiquaires ont été enregistrés et classés. Les trous observés et les déchirures ont été classés comme étant (1) des trous de petite taille (trou qui permettrait à un pouce de passer à travers) ; (2) des trous de taille moyenne (supérieure à un trou décrit dans (1) mais pas assez grand pour permettre à un poing de passer à travers) ; (3) trous de grande taille (trou plus gros que le poing).

➤ **Déroulement de l'enquête**

Il s'agit d'une étude transversale, descriptive et analytique basée sur un questionnaire quantitatif et qualitatif. Le questionnaire quantitatif a été administré à 1600 personnes, en particulier aux hommes et femmes chefs de ménage après leur consentement. Le questionnaire (voir annexe) a été administré par des intervieweurs qualifiés. Il a porté sur les connaissances, attitudes et pratiques des enquêtés relatives à la qualité de la mise en place des MIILD et de leur utilisation. Des observations directes sur le terrain nous ont permis de noter les types de moustiquaires utilisées par les communautés dans les quatre communes (les moustiquaires imprégnées, les moustiquaires non imprégnées, les Olyset, les Permanets etc.), leur mise en place, leur utilisation et leur état après 6 mois d'utilisation afin d'évaluer la durabilité physique de ces moustiquaires. Les informations obtenues sont enregistrées sur un

formulaire d'enquête sociologique. L'équipe identifie, compte et étudie les formes de chaque type de moustiquaires que l'on rencontre au cours de l'enquête. Le but de l'enquête sociologique est d'apprécier l'état des moustiquaires en termes d'efficacité et de taux d'utilisation, puis d'évaluer la durabilité physique des moustiquaires échantillonnées.

Les sujets qui ne pouvaient pas comprendre la langue française ont communiqué en langue locale.

8. Analyses statistiques

Dans le troisième chapitre, la densité agressive [nombre de piqûre/ homme /nuit] (ma), l'indice sporozoïtique (Is) et le taux d'inoculation entomologique (TIE) sont déterminés. Les pourcentages de réduction du taux de piqûres (PHN) et du TIE après intervention sont calculés. Les taux de parturité, d'exophilie et de gorgement sont évalués. Les comparaisons de ces taux sont effectuées par le test de Chi².

Les données obtenues dans le quatrième chapitre ont été contrôlées puis enregistrées en utilisant le logiciel Epi info version 3.5.3. et la version du logiciel Microsoft Office 2007 de Windows. Le calcul des fréquences des variables étudiées et le test du Chi² ont été réalisés à l'aide du logiciel R version 2.11.1 afin de comparer la proportion de chacune des variables liées à chaque zone. La procédure Summary des packages de base de ce logiciel a été utilisée pour réaliser la distribution des fréquences des mutations *Kdr*. Ensuite le test exact de Fisher a été mis en œuvre pour comparer les fréquences alléliques des mutations *Kdr* chez les morts et les vivants. Ce même test a été utilisé pour comparer les taux de mortalité observés pour les différents génotypes. Le niveau de signification a été de 0,05.

Concernant le cinquième chapitre, pour calculer les taux de mortalité de chaque bioessai, nous avons divisé le nombre de moustiques morts par le nombre testé. Les proportions de moustiques morts après exposition aux supports traités au bendiocarb ont été analysés par une régression logistique avec le logiciel d'analyse SPSS v16 afin d'étudier les variations de l'efficacité du bendiocarb en fonction du temps.

Ensuite, le nombre total d'anophèles vecteurs capturés dans les différentes zones pendant la PID et après l'arrêt de la PID ont été calculés. Les taux d'agressivité et d'inoculation entomologique ont été estimés avec leur intervalle de confiance à 95%. Ces taux ont été ensuite comparés pour la période d'intervention et après l'arrêt de l'intervention en utilisant un modèle généralisé de Poisson avec analyse de la déviance du logiciel R version 2.11.1 qui prend en compte l'interdépendance des observations faites dans une même zone. La

proportion de femelles pares (femelles ayant pondu au moins une fois) en fonction des périodes a été analysée par régression logistique. La capture des moustiques par les fenêtres pièges et la récolte de la faune résiduelle matinale dans ce chapitre ont permis d'estimer la densité totale de moustiques qui pénètrent dans les cases et la proportion qui en ressort. Ces données ont été utilisées pour calculer le taux d'exophilie des moustiques (proportion de moustiques capturés dans les fenêtres pièges par rapport au nombre total de moustiques capturés) dans chaque zone en 2010 et en 2011. Le taux de gorgement a été également déterminé comme la proportion des moustiques ayant pris leur repas de sang sur le total des moustiques.

Les taux de mortalité des moustiques *An. gambiae* exposées aux différents papiers imprégnés d'insecticides en fonction des différentes périodes ont été comparés avec un test de Chi² du logiciel Epi info version 3.5.3. Le génotype pour la mutation *Kdr* des moustiques *An. gambiae* a été déterminé pendant la mise en œuvre de l'intervention puis après l'arrêt de la PID. Les fréquences pendant les deux périodes ont été comparées par un test exact de Fischer avec le logiciel Minitab. Le degré de signification de ces tests équivaut à une valeur $p < 0,05$.

Enfin dans le sixième chapitre, la différenciation génotypique au niveau des mutations *Kdr* et *Ace-1* entre les vecteurs positifs et négatifs au test d'ELISA-CSP a été testée en utilisant le test exact de Fisher avec le logiciel GENEPOP. Le test du Chi² a été effectué pour tester l'association de la positivité au CSP de *An. gambiae* s.s. avec les génotypes résistants de ces vecteurs pour les mutations *Kdr* et *Ace-1*.

Chapitre 3:

Dynamique de population des Culicidae et de l'infectivité de *Anopheles gambiae* pour *Plasmodium falciparum* à la dernière campagne de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide au bendiocarb au Bénin

La présente étude est consacrée aux résultats du troisième tour de la PID au bendiocarb dans le département de l'Ouémé. Pour le PNLP, si ces résultats confirmaient ceux des deux premiers tours, la PID serait étendue dans toutes les zones éligibles. Nous avons donc suivi la dynamique de transmission du paludisme dans les zones PID. Les données enregistrées ont été comparées à celles de l'année témoin. Le suivi entomologique a porté, non seulement sur le comportement trophique des anophèles, mais aussi sur celui des autres Culicidés, le taux d'inoculation entomologique et l'âge physiologique des anophèles.

Ce travail vise à étudier l'impact de la troisième campagne de la PID au bendiocarb sur la transmission du paludisme dans un contexte de forte résistance des vecteurs aux insecticides dans le département de l'Ouémé.

Pour répondre à cet objectif général, il a été question de :

- évaluer l'impact de la PID au bendiocarb sur la dynamique des populations de moustiques ;
- déterminer l'impact de la PID sur le taux d'inoculation entomologique (TIE) des vecteurs dans les zones d'étude ;
- étudier le changement de comportement induit par la PID au bendiocarb sur les anophèles vecteurs dans les zones traitées.

Des enquêtes entomologiques ont été réalisées dans les 4 communes après la pulvérisation intradomiciliaire en vue de collecter les moustiques à l'intérieur et à l'extérieur des habitations. A cet effet, des captures de moustiques sur appât humain et par des pièges fenêtres associés à la récolte de la faune résiduelle ont été organisées. Les moustiques issus de ces captures ont été identifiés et traités comme décrit au chapitre précédent.

Les données relatives à ce chapitre sont présentées en détails dans l'**article 1**, mais nous reprenons ici les points essentiels relatifs aux résultats et à la discussion.

Article 1: Ossè R, Aikpon R, Padonou G, Oussou O, Yadouléon A, Akogbéto M: Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasit Vectors* 2012, **5**:163.

1. Résultats

1.1. Variation de l'agressivité de *An. gambiae* sur homme (ma) avant et après intervention PID et dans la zone témoin

Les résultats de nos travaux de recherche montrent une baisse du taux de piqûre par homme au 3^{ème} tour de PID dans les communes de Adjohoun, de Dangbo et de Missérété où chaque habitant vivant dans la zone reçoit moins de 2 piqûres de *An. gambiae* par nuit. En effet, dans ces communes, la réduction du taux de piqûre a été de 89,78% (0,33 piqûre/homme/nuit après PID contre 3,23 avant l'intervention), de 56,8% (1,89 piqûres contre 4,375) et de 93,22% (1 piqûre contre 14,75) respectivement à Adjohoun, Dangbo et Missérété. Cependant, dans la quatrième commune sous intervention PID (Sèmè), la réduction observée a été faible, 12,93 piqûres de *An. gambiae* par homme par nuit après le 3^{ème} tour contre 24,88 avant l'intervention (48,03% de réduction) (tableau III).

Dans la zone témoin, le taux de piqûre est élevé : 20 piqûres par homme par nuit pendant la même période (avril-juillet 2010).

Tableau III: Taux de piqûre (PHN) et taux d'inoculation entomologique (TIE) observés avant et après intervention de la PID

	Variables	Avant intervention Avril-Juillet 2008	Après intervention Avril-Juillet 2010	% Réduction
Adjohoun	Total ano	207	19	
	Homme nuit	64	56	
	PHN	3,23	0,33	89,783
	%S	5,71	10,52	
	TIE (pi/h/n)	0,18	0,034	81,111
	TIE/mois	5,4	1,02	
	TIE/période	21,6	4,08	
Dangbo	Total ano	280	106	
	Homme nuit	64	56	
	PHN	4,375	1,89	56,8
	%S	4,49	2,83	
	TIE (pi/h/n)	0,19	0,053	72,105
	TIE/mois	5,7	1,59	
	TIE/période	22,8	6,36	
Misséréte	Total ano	944	56	
	Homme nuit	64	56	
	PHN	14,75	1	93,22
	%S	1,07	1,78	
	TIE (pi/h/n)	0,15	0,0178	88,133
	TIE/mois	4,5	0,534	
	TIE/période	18	2,136	
Sèmè	Total ano	1592	724	
	Homme nuit	64	56	
	PHN	24,88	12,93	48,031
	%S	3,5	1,96	
	TIE (pi/h/n)	0,87	0,253	70,92
	TIE/mois	26,1	7,59	
	TIE/période	104,4	30,36	
Adjara (Témoin)	Total ano		1117	
	Homme nuit		56	
	PHN		19,95	
	%S		10,36	
	TIE (pi/h/n)		2,067	
	TIE/mois		62,01	
	TIE/période		248,04	

Total ano: total anophèle; PHN: nombre de piqûre par homme et par nuit; %S: Indice sporozoïtique; TIE (pi/h/n): Taux d'inoculation entomologique (piqûres infectées/homme/nuit)

1.2. Variation de l'agressivité des *Mansonia spp* et *Culex spp* sur homme avant et après intervention PID et dans la zone témoin

La réduction du taux de piqûre observée chez *Mansonia spp* et *Culex spp* a été faible comparativement à celle de *An. gambiae*. Chez les *Mansonia spp*, la réduction a été de 43,23%, 50,36%, 34,43% et 35% respectivement à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè (tableau IV). Le taux de réduction observé après intervention chez les *Culex spp* a été très faible dans les communes de Adjohoun (4,65%), Dangbo (1,36%) et Missérété (8,95%). Cependant, dans la commune de Sèmè, il a été de 32% (tableau IV).

Tableau IV: Taux de piqûre (PHN) de *Mansonia spp.* et de *Culex spp* observés avant et après intervention de la PID

		<i>Mansonia spp.</i>			<i>Culex spp.</i>		
		Avant intervention	Après intervention	% Réduction	Avant intervention	Après intervention	% Réduction
		Avril-Juillet 2008	Avril-Juillet 2010		Avril-Juillet 2008	Avril-Juillet 2010	
Adjohoun	Total	2160	1073		1539	1284	
	Homme nuit	64	56		64	56	
	PHN	33,75	19,16	43,23	24,05	22,93	4,651
Dangbo	Total	2984	1296		2790	2408	
	Homme nuit	64	56		64	56	
	PHN	46,63	23,14	50,36	43,59	43	1,362
Missérété	Total	936	537		236	188	
	Homme nuit	64	56		64	56	
	PHN	14,63	9,589	34,43	3,688	3,357	8,959
Sèmè	Total	2750	1564		1054	630	
	Homme nuit	64	56		64	56	
	PHN	42,97	27,93	35	16,47	11,25	31,69
Adjara (Témoin)	Total		397			433	
	Homme nuit		56			56	
	PHN		7,089			7,732	

1.3. Efficacité du 3^{ème} tour de la PID sur le taux d'inoculation entomologique (TIE) dans les zones traitées

Avant l'intervention (avril-juillet 2008), chaque habitant recevait une moyenne de 21,6 ; 22,9 ; 18 et 104,4 piqûres infectantes sur une période de 4 mois, respectivement dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè. Par contre, après le 3^{ème} tour de la PID, ce taux a chuté à 4,08 à Adjohoun, 6,36 à Dangbo, 2,14 à Missérété et 30,36 à Sèmè (tableau III).

La comparaison du TIE observé avant et après intervention dans chaque commune révèle une baisse de 81,1% ; 72,11% ; 88,13% et 70,92% respectivement à Adjohoun, Dangbo, Missérété et à Sèmè (tableau I). Dans la zone témoin, ce taux a été très élevé (248 piqûres infestées/homme/4mois) (tableau III).

1.4. Diminution spectaculaire de la longévité de *An. gambiae* dans les communes sous intervention PID

Pour les deux périodes, 1083 ovaires de *An. gambiae* ont été disséqués. Avant intervention (avril-juillet 2008), le taux de parturité de *An. gambiae* était de 68,54% à Missérété et 79,94% à Adjohoun. Mais, après le 3^{ème} tour de la PID, on note une baisse spectaculaire de ce taux dans toutes les zones sous intervention ($p < 0,05$). Il passe de 79,94% à 30% à Adjohoun et de 68,34% à 32,14% à Missérété (Figure 17).

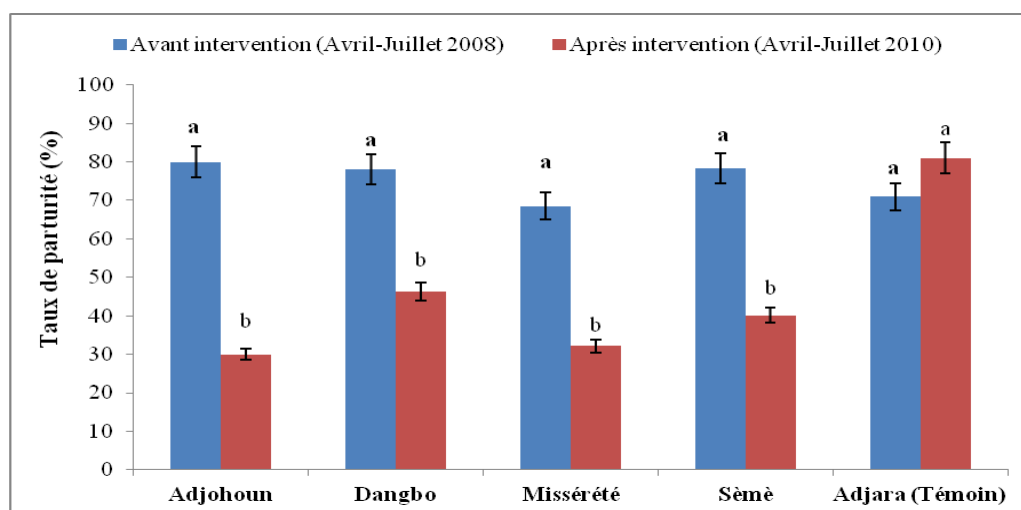


Figure 17 : Variation du taux de parturité de *Anopheles gambiae* s.l. collecté pendant la longue saison pluvieuse en 2008 avant intervention et pendant la même période après PID (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p > 0,05$)

1.5. Exophilie induite sur les moustiques dans les communes sous intervention PID

a) Chez *An. gambiae*

Avant intervention, seuls 30,95%, 36,90%, 27,08% et 35,57% des populations de *An. gambiae* sortent des habitations (Figure 18) respectivement à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè. Après intervention, le taux d'exophilie a été très élevé: 81,82% à Dangbo, 80% à Missérété et 75,68% à Sèmè. Comparativement à l'exophilie naturelle, la différence a été significative dans toutes les communes traitées ($p < 0,05$). A Adjohoun, aucun *An. gambiae* n'a été récolté dans les pièges fenêtres et au cours de la récolte de la faune résiduelle matinale après intervention.

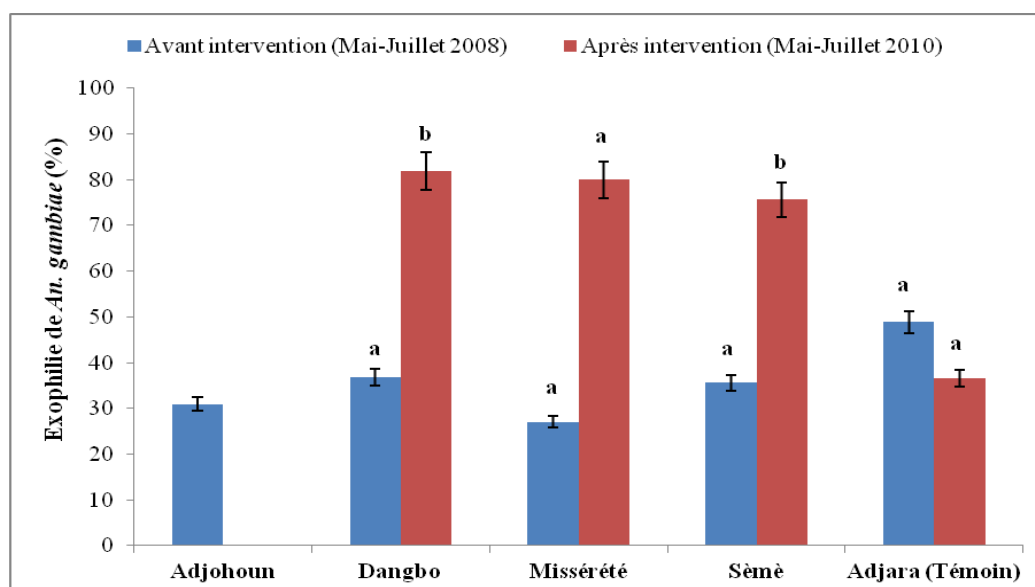


Figure 18 : Exophilie de *Anopheles gambiae s.l* collecté pendant la longue saison pluvieuse en 2008 avant intervention et pendant la même période après PID (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p > 0,05$)

b) Chez *Mansonia spp* et *Culex spp*

Le taux d'exophilie observé chez *Mansonia spp* dans les communes de Adjohoun (59,20%) et Sèmè (51,43%) a été significativement différent de celui observé avant intervention ($p < 0,05$). Dans la commune de Dangbo, il n'y a pas eu une différence significative entre ces deux taux ($p = 0,196$) (tableau V).

Chez *Culex spp*, c'est seulement à Adjohoun qu'une différence significative a été observée entre les taux d'exophilie avant et après intervention ($p < 0,05$). Par contre, dans les communes

de Dangbo et de Sèmè, le taux d'exophilie après PID n'a pas été significativement différent de celui avant intervention ($p=0,79$ et $p=0,54$ respectivement) (tableau V).

1.6. Impact du 3^{ème} tour de la PID sur le taux de gorgement des moustiques dans les zones traitées

Le taux de gorgement observé après PID dans les zones traitées a été faible (Figure 19). Comparativement à celui observé avant intervention, la différence entre les deux est significative ($p<0,05$) dans toutes les communes (Figure 19). Ce taux a été de 9,09% après PID contre 54,76% avant PID à Dangbo, 20% contre 62,5% à Missérété et 35,14% contre 54,90% à Sèmè.

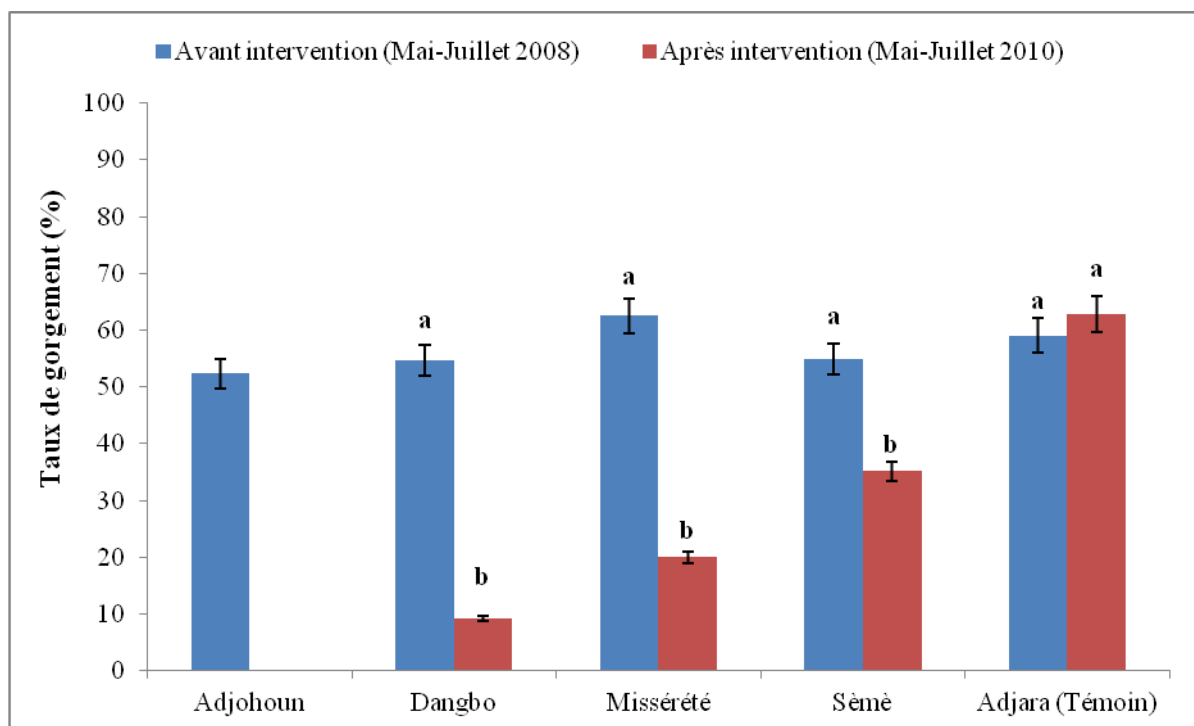


Figure 19: Taux de gorgement de *Anopheles gambiae s.l.* collecté par aspersion matinale de bombe aérosol et par piège fenêtre de sortie avant (mai- juillet 2008) et après intervention (mai- juillet 2010) (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p>0,05$)

Tableau V: Exophilie de *Mansonia spp* et de *Culex spp* induite par les murs traités au bendiocarb avant et après intervention de la PID

	<i>Mansonia spp.</i>							<i>Culex spp.</i>						
	Avant intervention (Mai -Juillet 2008)			Après intervention (Mai -Juillet 2010)			Comparaison exophilie avant et après intervention	Avant intervention (Mai -Juillet 2008)			Avant intervention (Mai -Juillet 2010)			Comparaison exophilie avant et après intervention
	Total	Nbre sortis des fenêtres pièges	Exophilie (%)	Total	Nbre sortis des fenêtres pièges	Exophilie (%)		Total	Nbre sortis des fenêtres pièges	Exophilie (%)	Total	Nbre sortis des fenêtres pièges	Exophilie (%)	
Adjohoun	128	20	15,63	27	16	59,26	p< 0,05	132	20	15,15	67	46	68,66	p< 0,05
Dangbo	20	8	40	139	77	55,4	p= 0,196	56	20	35,71	198	67	33,84	p=0,79
Misséréte		-	-	37	29	78,38	-	-	-	-	11	2	18,18	-
Sèmè	92	12	13,04	70	36	51,43	p< 0,05	177	49	27,68	83	26	31,33	p=0,54
Adjara (Témoin)				228	37	16,23	-				52	33	63,46	-

2. Discussion

La stratégie de la pulvérisation intradomiciliaire (PID) à effet rémanent mise en œuvre par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) dans le département de l'Ouémé avec le soutien du PMI a eu un grand impact sur la transmission du paludisme. Dans toutes les communes sous intervention, la densité de *An. gambiae* (taux d'agressivité par homme) et le taux d'inoculation entomologique (TIE) ont considérablement baissé. A Adjohoun, Dangbo et Misséré, les taux de piqûres ont été en dessous de 2 piqûres de *An. gambiae* par homme et par nuit pendant toute la période de pulvérisation. Cette chute drastique est due à l'effet létal du bendiocarb sur les anophèles résistants aux pyréthrinoïdes (Akogbéto *et al.*, 2010). En effet, en comparant le nombre de piqûres de *An. gambiae* qu'une personne reçoit en une nuit entre avril-juillet 2008 et avril-juillet 2010, les taux ont été significativement plus bas. Ces résultats concordent avec ceux de Akogbéto *et al.* (2011) lors du premier et du second tour dans les mêmes zones.

Le principal objectif de l'étude est de déterminer l'impact de la pulvérisation intradomiciliaire sur la transmission du paludisme et sur le comportement des anophèles, en particulier de *An. gambiae*. Mais étant donné la forte pullulation d'autres moustiques dans la zone d'étude en particulier de *Mansonia spp.* et *Culex spp.*, c'était une opportunité de déterminer l'impact de la PID sur le comportement de ces moustiques. Ne pas profiter de l'occasion pour vérifier un éventuel changement du comportement des Culicinae dans la zone PID reviendrait à perdre des informations qu'on aurait pu avoir sans trop d'effort.

Dans la zone d'étude, *Culex quinquefasciatus* est très résistant aux pyréthrinoïdes. Si, malgré cette résistance, la PID réduit significativement la densité de ce moustique ou augmente son exophilie, le bendiocarb serait donc un produit d'avenir. Certes, comme nous l'avons montré dans ce chapitre, *Mansonia spp* et *Culex spp* sont des moustiques qui piquent plus à l'extérieur qu'à l'intérieur, mais une bonne partie de ces moustiques entre dans les maisons et se gorge sur homme dans les chambres à coucher avant de sortir d'où une augmentation de l'exophilie de *Mansonia spp* dans la zone PID comparativement à la zone témoin. Mais l'impact du 3^{ème} tour de la PID est très faible sur les Culicinae.

Chez *Mansonia spp*, une baisse du taux de piqûre a été observée dans toutes les communes après la mise en place du 3^{ème} tour de la PID. Mais chez *Culex spp*, la réduction observée a été très faible. Ceci serait dû aux multiples mécanismes de résistance aux insecticides présents chez ces *Culex* (Corbel *et al.*, 2007).

Les performances notées dans cette étude sont également liées à la couverture plus élevée de la PID (le taux de couverture est plus de 90% pour chaque tour).

Au cours de la période de avril-juillet 2008 (avant l'intervention), le taux d'inoculation entomologique (TIE) est estimé à 64,8 ; 68,4 et 54 piqûres infectantes pour *An. gambiae* par an respectivement à Adjohoun, Dangbo et Misséréte. Ces données sont semblables aux valeurs indiquées pour des zones similaires dans le sud du Bénin en 1990 (Akogbéto, 1992; Akogbéto *et al.*, 1992), dans la ville de Bouaké en Côte d'Ivoire (67,3 piqûres infectantes par an) (Dossou-Yovo *et al.*, 1998). Toutefois, elles sont faibles par rapport aux données enregistrées à Bancoumana au Mali (245 piqûres infectantes par personne entre juin et octobre) (Dolo *et al.*, 2003). Cependant à Sèmè et dans la zone témoin (Adjara), les valeurs sont élevées (tableau III). Ces forts taux de TIE se justifient par l'insuffisance de MIILD dans ces milieux.

Le TIE a été faible sur toute la période d'étude dans les zones sous intervention. Ceci montre que les pulvérisations intradomiciliaires effectuées dans les quatre communes ont été un grand succès. En effet, nous avons eu une réduction de 74,26% du TIE au troisième tour de la PID. Or, dans les travaux de Akogbéto *et al.* (2011), cette réduction a été plus de 94%. L'efficacité du bendiocarb en PID à grande échelle a été récemment démontrée également en Guinée équatoriale pour *An. gambiae*, où aucun moustique infectieux n'a été identifié au troisième tour (Sharp *et al.*, 2007). La différence entre les deux études pourrait s'expliquer par le temps qui a séparé le deuxième tour (mars 2009) du troisième tour (avril 2010) dans le cas du Bénin. En effet, compte tenu de la faible rémanence du bendiocarb sur les murs (3 à 4 mois), après un an d'arrêt de PID, les habitants recevaient des piqûres infectées de *An. gambiae* avant la troisième campagne de PID. Il est normal qu'après 12 mois d'arrêt de PID, la transmission reprenne. C'est ce qui explique que 40% des moustiques positifs à l'ELISA CSP ont été collectés en avril 2010 au début du troisième traitement PID.

La forte réduction du TIE est due non seulement à la grande superficie couverte par la PID et la grande population protégée (500 000 habitants), à l'effet létal du bendiocarb sur les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes (Djogbénou, 2008 ; Akogbéto *et al.*, 2010 ; Yadouleton *et al.*, 2010), mais aussi à l'utilisation des moustiquaires imprégnées par les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. La zone PID est devenue invivable pour les anophèles qui mourraient probablement avant l'achèvement du cycle sporogonique du *Plasmodium* en raison d'une longévité plus réduite dans les zones d'intervention. L'atmosphère désagréable causée par la présence du bendiocarb sur les murs à l'intérieur des habitations est nocive pour les moustiques. Ce qui pourrait expliquer la forte exophilie induite

observée chez *An. gambiae* et *Mansonia spp* (figure 18 et tableau V). Cette forte exophilie induite par le bendiocarb n'est pas favorable à une longue survie des anophèles car cela les empêche de s'alimenter normalement. Cette affirmation rappelle les travaux en cases expérimentales de Darriet *et al.* (2002), Asidi *et al.* (2005) et N'Guessan *et al.* (2010). En effet, certains des anophèles qui ont réussi à entrer dans les maisons n'ont pas pu prendre leur repas de sang avant de sortir ; ce qui explique le très faible taux de gorgement observé au cours de l'étude (figure 19). Néanmoins, certains rares moustiques arrivent à prendre leur repas sanguin sur leurs hôtes dans les maisons. La pulvérisation intradomiciliaire ne doit donc pas exclure l'utilisation des MIILD chez les enfants et les femmes enceintes.

3. Conclusion

Le but de ce chapitre est de connaître le niveau de la transmission du paludisme dans les communes de l'Ouémé sous pulvérisation intradomiciliaire à la veille de l'arrêt de cette intervention. Après un an d'étude, il ressort que le but est atteint. Les paramètres entomologiques de la transmission du paludisme, à savoir le taux de piqûre des anophèles, l'infectivité de ces anophèles pour le *P. falciparum*, le degré d'exophilie induite par le bendiocarb, le taux de parturité des anophèles et leur taux de gorgement, sont déterminés et précisés dans le chapitre. De façon globale, ces données indiquent un niveau de transmission beaucoup plus bas que ce qui est observé dans la zone témoin et ce qui est enregistré avant la mise en œuvre de la PID. Le souhait du PNLIP est de réussir à maintenir ces paramètres à leur niveau actuel lorsque la PID sera remplacée par la couverture totale en moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action. Ce défi sera examiné dans le chapitre 5. La deuxième information issue du chapitre 3 est la nécessité de combiner la PID et les MIILD. En effet, la fraction de moustiques qui réussit à entrer dans les chambres sous traitement PID, se gorge sur son hôte avant de se reposer sur des murs traités si l'hôte n'est pas protégé par une moustiquaire. Mais dans le chapitre suivant, il ne s'agit pas de l'action combinée des deux méthodes de lutte, mais de l'étude du taux de couverture et d'utilisation de ces moustiquaires imprégnées à longue durée d'action et leur efficacité sur les populations d'*An gambiae* résistantes aux pyréthrinoïdes.

Chapitre 4:

Etude du taux de couverture et d'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action et leur efficacité sur les populations de *Anopheles gambiae* résistantes aux pyréthriinoïdes

De nombreux programmes de lutte sont mis en place pour vaincre le paludisme et atteindre les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD), en particulier pour réduire la mortalité infantile de deux tiers d'ici 2015. Ces programmes reposent surtout sur des stratégies de prévention contre les piqûres de moustiques, en particulier l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MIILD) et les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides (PID). L'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD) a été généralisée dans tous les pays en Afrique au sud du Sahara et à cela s'ajoute un effort particulier pour sa promotion et sa vulgarisation.

Beaucoup d'efforts ont été consentis pour augmenter l'accessibilité des populations aux moustiquaires imprégnées en particulier aux enfants de moins de cinq ans et aux femmes enceintes. Si les résultats obtenus sont en deçà de ceux escomptés, c'est dû à plusieurs facteurs. Outre l'extension des résistances aux pyréthrianoïdes chez les vecteurs du paludisme qui représente un obstacle sérieux à la mise en place et à l'utilisation des MIILD en Afrique (Akogbéto & Yacoubou, 1999; Corbel *et al.*, 2007), des problèmes importants subsistent mettant en danger les objectifs et la pérennité des réalisations. En effet, depuis quelques années, les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) des pays africains investissent beaucoup dans l'acquisition et la distribution des MIILD pour le contrôle du paludisme. Toutefois, le suivi de l'utilisation de ces matériaux est souvent négligé.

L'utilisation de la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée (MIILD) est une composante majeure de la prévention du paludisme. Une méta-analyse réalisée par le groupe Cochrane de 22 études qui ont utilisé un échantillonnage aléatoire a révélé que le fait de dormir sous une MIILD peut réduire de 50% la morbidité due au paludisme et de 17% la mortalité due au paludisme chez les enfants de moins de cinq ans (Lengeler, 2004). Dans les communautés ayant une couverture en MIILD de plus de 60%, un effet de groupe se produit et les personnes qui n'utilisent pas les MIILD bénéficient d'une protection similaire à celles qui les utilisent (Hawley *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 2010). Les campagnes de distribution de masse des MIILD, suivies d'un système de distribution de routine aux enfants nés après la distribution et également aux personnes souhaitant disposer de plus de moustiquaires, mais qui n'étaient pas touchées par les campagnes de distribution, constituent une méthode efficace pour atteindre et maintenir un niveau élevé de couverture (Kilian *et al.*, 2010). La mise en œuvre de ces stratégies a permis à des pays de constater une diminution de la prévalence parasitaire chez les enfants de moins de cinq ans et une diminution du taux de mortalité juvéno-infantile liée à la diminution du fardeau du paludisme (OMS, 2009).

Après la dernière campagne effectuée en août 2010, la PID a été arrêtée dans le département de l'Ouémé-Plateau et déplacée vers l'Atacora. Cependant, le transfert de la PID dans l'Atacora n'a pas été apprécié des populations de l'Ouémé-Plateau. Mais, pour apaiser ces populations, des mesures d'accompagnement ont été suggérées. C'est ainsi que le PNLN, avec l'aide de l'USAID, a distribué en Juillet 2011 des MIILN à tous les habitants de ces zones précédemment sous PID afin de limiter la reprise de la transmission. Mais la distribution gratuite des MIILN aux populations n'est qu'un pas pour la résolution des problèmes sociaux créés par l'arrêt de la PID. Le deuxième pas attendu des communautés est l'acceptation et l'utilisation de ces MIILN. C'est pourquoi cette étude a été réalisée pour déterminer le taux d'utilisation des moustiquaires distribuées. En effet, si malgré l'accès à la couverture universelle, les moustiquaires ne sont pas utilisées pour la protection contre les piqûres de moustiques, l'alternative mise en œuvre en remplacement de la PID ne pourrait faire preuve de son efficacité. Par ailleurs, les moustiquaires distribuées sont celles du type Olyset imprégnées avec la perméthrine. Or, les anophèles ont développé une forte résistance vis-à-vis de ce produit. C'est pour cette raison que, après 6 mois d'utilisation des moustiquaires, nous avons trouvé important de déterminer l'efficacité des Olyset sur les populations locales de *An. gambiae*, identifier les transactions qui se font autour de ces moustiquaires et leur état physique, c'est-à-dire le degré d'usure (**Article 3**).

Pour répondre aux questionnements de ce chapitre, des enquêtes sociologiques ont été réalisées dans les ménages des communes précédemment sous PID. Ensuite, des tests d'efficacité ont été effectués sur les Olyset après 6 mois d'utilisation comme décrit au chapitre 2. Enfin, les moustiques morts et vivants issus de ces tests ont été soumis au test de biologie moléculaire.

Article 3: Ossè RA, Aïkpon R, Padonou GG, Oké-Agbo F, Gnanguenon V, Akogbéto M. Long-Lasting Insecticidal Nets use, efficacy and physical integrity in a high vector resistance to pyrethroids area six months after a nationwide campaign in southern Benin, West Africa (soumis dans *Journal of Public Health and Epidemiology*).

1. Résultats

1.1. Nature des moustiquaires imprégnées rencontrées et taux de distribution des Olyset par commune

Pour cette étude, un plan d'échantillonnage par niveau a été mis en place en associant à chaque commune une pondération uniforme. Dans chaque commune, il a été sélectionné au hasard 2 arrondissements et dans chaque arrondissement, un autre niveau de sélection qui prend au hasard 2 villages. Au total, 1600 ménages ont été visités pour toute la zone d'étude et dans chaque ménage, toutes les catégories de moustiquaires sous utilisation par les populations ont été identifiées.

Au cours de notre enquête dans les 4 communes, divers types de moustiquaires ont été trouvées. La majorité des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action rencontrées étaient des Olyset distribués en Juillet 2011 par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (59,3%: 998 Olyset sur un total de 1682 inscrits) (figure 20) et d'autres Olyset (2%). D'autres MIILD ont été trouvées: PermaNet (20,9%) et 17,8% de moustiquaires non identifiées (AmaNet, SafiNet, BedNet, Interceptor, moustiquaire naturelle). Dans la commune de Sèmè, le taux de distribution des 998 Olyset PNLP déclarées avoir reçu est faible: 15,6% (156/998) contre 29,6% (296/998) à Adjohoun, 26,1% (261/998) à Dangbo et 28,5% (285/998) dans la commune de Missérété (figure 20).

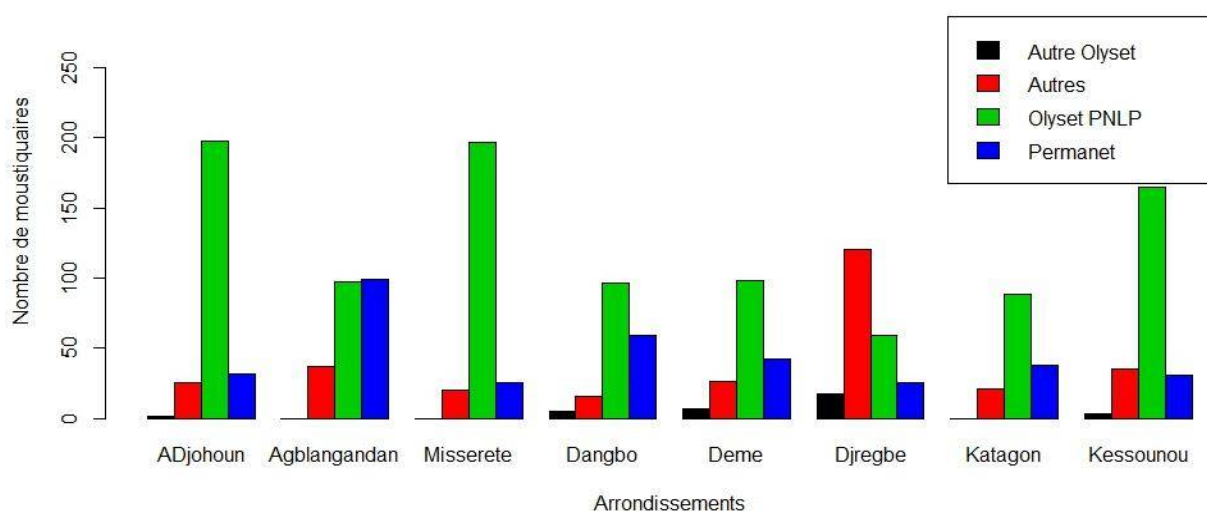


Figure 20 : Les types de moustiquaires rencontrées par arrondissement

1.2. Taux de couverture des moustiquaires par commune

Le tableau VI montre le taux de couverture des Olyset distribués en juillet 2011 dans les 4 communes. Au total, 1996 Olyset ont été distribués pour 3924 personnes (enfants et adultes). Ainsi, 50,87% de cette population ont globalement reçu les nouvelles moustiquaires Olyset, soit une moustiquaire Olyset pour 1,9 personne. Quand on prend en compte les autres moustiquaires disponibles avant la campagne de distribution, le taux de couverture devient 85,73% (1 moustiquaire pour 1,17 personne). A Adjohoun et Missérété, le taux de couverture des Olyset PNLP est supérieur à 1 Olyset pour 1,9 personne, respectivement, 70,14% (1 Olyset pour 1,4 personne) et 60,90% (1 Olyset pour 1,6 personne). En dépit de cette bonne note, le taux de couverture des moustiquaires Olyset distribués en juillet 2011 est faible dans la commune de Dangbo (47,93%: 1 Olyset pour 2,1 personnes) et très faible à Sèmè (29,57%: 1 Olyset pour 3,4 personnes). Mais dans ces 2 communes, si l'on prend en compte les autres moustiquaires disponibles avant la campagne de distribution de juillet 2011, le taux de couverture est amélioré: 1 moustiquaire pour 1,16 personne à Sèmè (86,06%) et 1 moustiquaire pour 1,33 personne à Dangbo (75,30%).

Tableau VI : Taux de couverture des Olyset PNLP 2011 par commune

Communes	Arrondissements	Autre Olyset	Olyset PNLP	Autres	Permanet	Total	N personnes Visités	N Olyset PNLP qui devrait être distribué	Taux couverture (%)&95% IC	Taux couverture (%) / commune
ADJOHOUN	Adjohoun	1	198	25	32	256	568	396	69,72 [66 73]	70,14
	Démè	7	98	26	42	173	276	196	71,01 [65 76]	
DANGBO	Dangbo Centre	5	96	16	59	176	499	192	38,48 [34 42]	47,93
	Kessounou	3	165	35	31	234	590	330	55,93 [52 60]	
MISSERETE	Katagon	0	88	21	38	147	405	176	43,46 [39 48]	60,90
	Missérété	0	197	20	25	242	531	394	74,20 [70 77]	
SEME	Djrègbé	17	59	120	25	221	497	118	23,74 [20 27]	29,57
	Agblangandan	0	97	37	99	233	558	194	34,77 [31 38]	
Total		33	998	300	351	1682	3924	1996	50,87 [49 52]	

N : nombre

IC : Intervalle de confiance

1.3. Taux d'utilisation des moustiquaires dans les communes visitées

Toute moustiquaire installée ou pliée non rangée et dont les utilisateurs avouent l'avoir utilisée pendant la dernière nuit avant l'enquête dans un ménage, est considérée comme une moustiquaire en utilisation.

Parmi 998 Olyset distribués, 816 ont été régulièrement utilisés. Le taux d'utilisation est de 81,76% (figure 21). Ce taux est élevé dans toutes les localités visitées, sauf à Missérété où il est inférieur à 80% (figure 21). Quand nous prenons en compte toutes les moustiquaires (Olyset 2011 et autres moustiquaires), le taux d'utilisation générale est de 81,63% (1373/1682). A Missérété, même si nous considérons toutes les moustiquaires en utilisation, ce taux (69,15%) reste toujours inférieur à 80%.

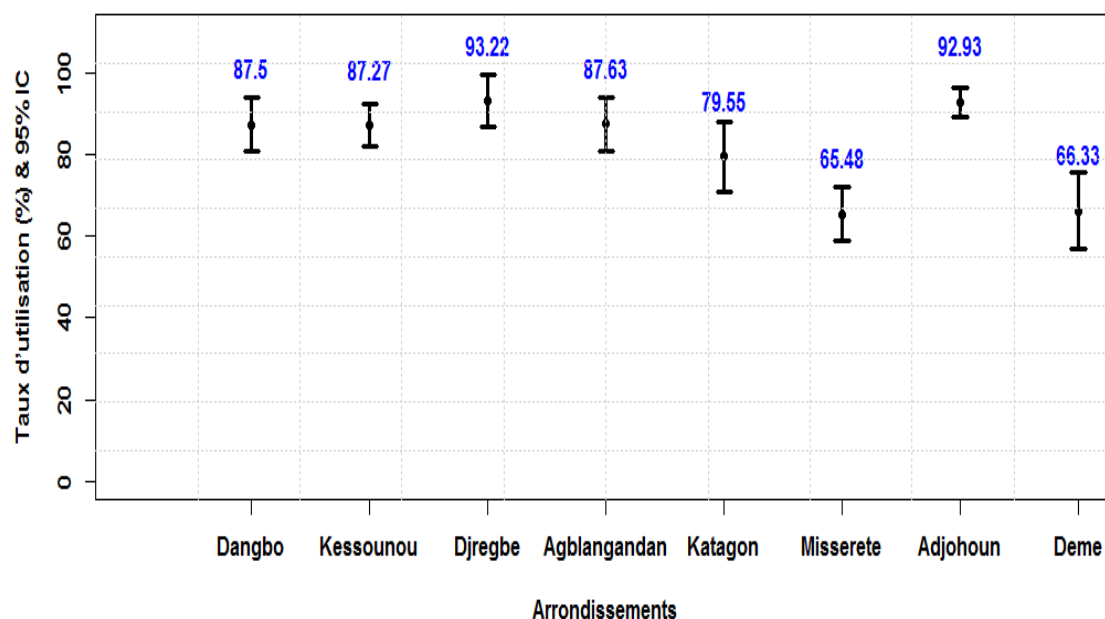


Figure 21 : Taux d'utilisation des Olyset PNLP 2011 par arrondissement.

1.4. Position et emplacement des moustiquaires dans les ménages par commune

Dans les communes de Adjohoun, Dangbo et Sèmè, plus de 82% des Olyset PNLP reçus par les populations sont trouvés suspendus. Mais à Missérété, le pourcentage des Olyset suspendus est plus faible (en dessous de 70%) (tableau VII). De plus, 92,35% des Olyset PNLP non suspendus ont été conservés dans les valises.

Par ailleurs, dans ces communes, environs 80% des Permanets et autres Olyset rencontrés sont trouvés suspendus.

Tableau VII : Position et emplacement des moustiquaires dans les ménages par commune
(Janvier 2012)

Types de moustiquaires	Localités	Position des MIILD				Emplacement des MIILD non suspendues	
		Nb suspendu	% suspendu+ IC 95%	Nb non suspendu	% non suspendu +IC 95%	Valise	Sur corde
Olyset PNLP	Adjohoun	245	82,77 [77,98-86,90]	51	17,23 [13,10-22,02]	47	4
	Dangbo	225	86,54 [81,78-90,44]	35	13,46 [09,56-18,22]	32	3
	Missérété	194	68,07 [62,31-73,45]	91	31,93 [26,55-37,69]	86	5
	Sèmè	137	87,82 [81,63-92,51]	19	12,18 [07,49-18,37]	16	3
Autre Olyset	Adjohoun	8	100 [63,00-100,0]	0	0 [00,00-37,00]	0	0
	Dangbo	8	100 [63,00-100,0]	0	0 [00,00-37,00]	0	0
	Missérété	0	0	0	0	0	0
	Sèmè	14	82,35 [56,57-96,20]	3	17,65 [03,80-43,43]	3	0
Permanet	Adjohoun	59	79,73 [68,78-88,19]	15	20,27 [11,81-31,22]	13	2
	Dangbo	81	90 [81,86-95,33]	9	10 [04,68-18,14]	9	0
	Missérété	50	79,37 [67,30-88,53]	13	20,63 [11,47-32,70]	12	1
	Sèmè	107	86,29 [78,96-91,81]	17	13,71 [08,19-21,04]	17	0
Autres	Adjohoun	47	92,16 [81,12-97,82]	4	7,84 [02,18-18,88]	2	2
	Dangbo	48	94,12 [83,76-98,77]	3	5,88 [01,23-16,24]	3	0
	Missérété	25	60,98 [44,50-75,80]	16	39,02 [24,20-55,50]	16	0
	Sèmè	125	79,62 [72,46-85,62]	32	20,38 [14,38-27,54]	30	2
Total		1373	81,68 [79,74-83,50]	308	18,32 [16,50-20,26]	286	22
Nb : nombre		IC : Intervalle de confiance					

1.5. Etat physique des Olyset après 6 mois d'utilisation

1.5.1. Etat de propreté

La plupart des Olyset observés étaient trouvés propres à notre passage (80,6%), mais 19,4% d'entre eux doivent être considérés comme sales et certains très sales avec des résidus d'huile, de sang, de poussière et d'urine (figure 22). A Adjohoun et Sèmè, les moustiquaires sales étaient moins fréquentes, respectivement 9,46% et 6,41%. C'est le contraire à Dangbo (36,78%) et à Missérété (20,70%) (figure 22).

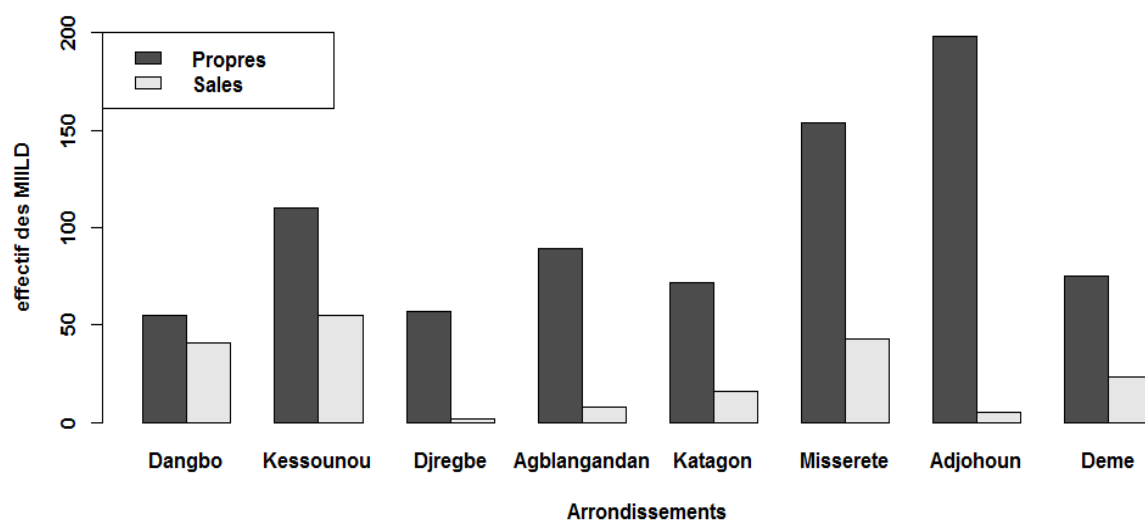


Figure 22 : Etat de propreté des moustiquaires par arrondissement

1.5.2. Degré d'usure

Au bout de 6 mois d'utilisation, 14% des Olyset PNLP sont trouvés avec des déchirures et des trous (figure 23). La fréquence des moustiquaires trouées est variable d'une commune à l'autre : 4,91% à Missérété, 10,81% à Adjohoun, 18,59% à Sèmè et 24,52% à Dangbo (figure 23).

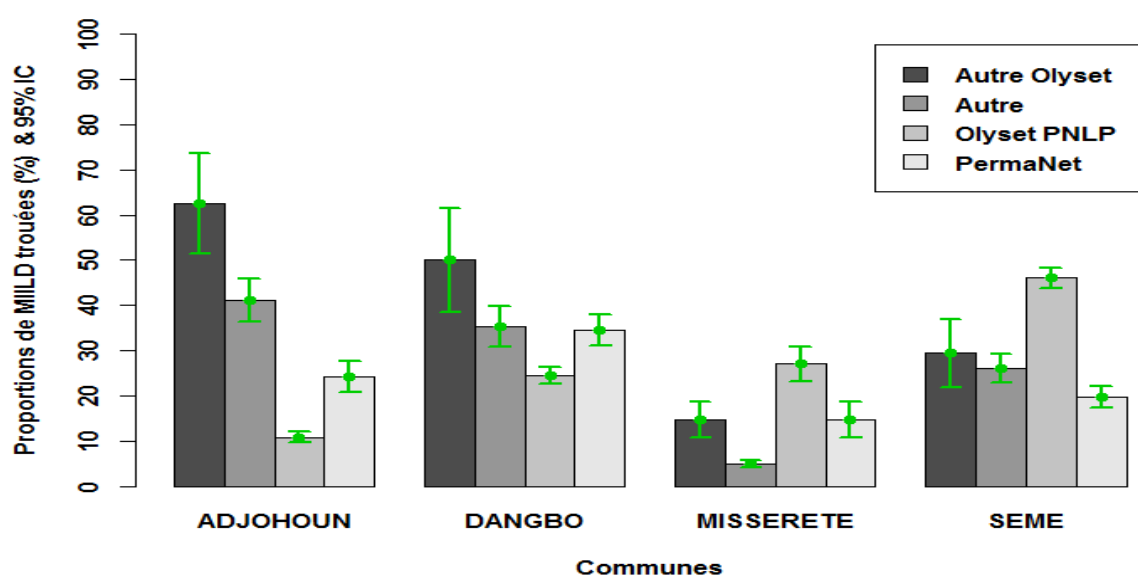


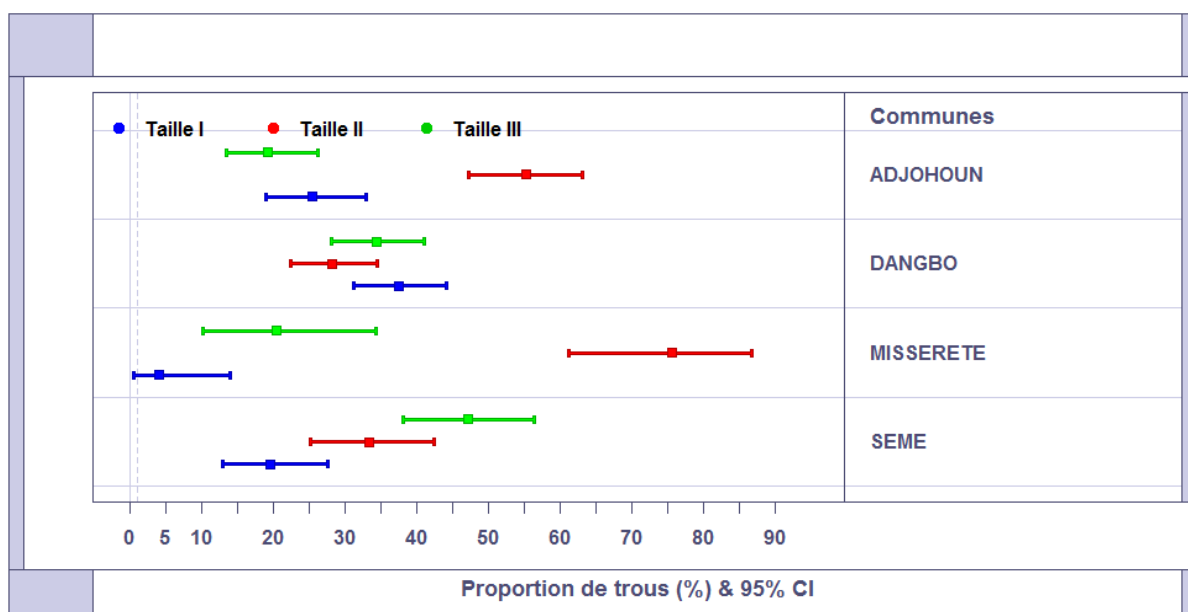
Figure 23: Fréquences de moustiquaires trouées dans les différentes communes

Sur les 139 Olyset trouvés troués, 557 trous ont été enregistrés (4 trous en moyenne par Olyset). Les trous sont comptés selon leur taille. Rappelons ici que les trous de taille I sont les trous de petite taille qui permettraient à un pouce de passer à travers, les trous de taille II sont les trous de taille moyenne (supérieure à un trou de taille I) mais pas assez grand pour permettre à un poing de passer à travers et les trous de taille III sont les trous de grande taille (trou plus gros que le poing). Les trous de taille I, II et III représentent respectivement 27,11% ; 41,29% et 31,60% de l'ensemble des trous des 4 communes.

Dans les communes de Adjohoun et de Missérété, les trous de taille II sont majoritaires et représentent respectivement 55,23% (89/161) et 75,51% (37/49) des trous observés sur les Olyset PNLP (figure 24A). Il y a eu une différence significative entre la fréquence des trous de taille II et celles des trous de taille I et III dans les deux communes ($p < 0,05$). Par contre à Sèmè, la fréquence des trous de taille III (58/123 soit 47,15% des trous observés) sur les Olyset PNLP est significativement plus élevée que celle des trous de taille II (41/123 soit 33,33%) et de taille I (19,52%) ($p < 0,05$). Mais dans la commune de Dangbo, les fréquences des trous de taille I (37,5%) et de taille III (34,37%) sont presque les mêmes ($p > 0,05$) et sont significativement plus élevées par rapport à la fréquence des trous de taille II ($p < 0,05$) (figure 24A).

Par ailleurs, au niveau des autres types de moustiquaires (autres Olyset, Permanets et autres moustiquaires), les trous de taille II sont plus nombreux que les autres types de trous. Par contre à Sèmè, ce sont les trous de tailles II et III qui dominent (figure 24B, C et D).

A



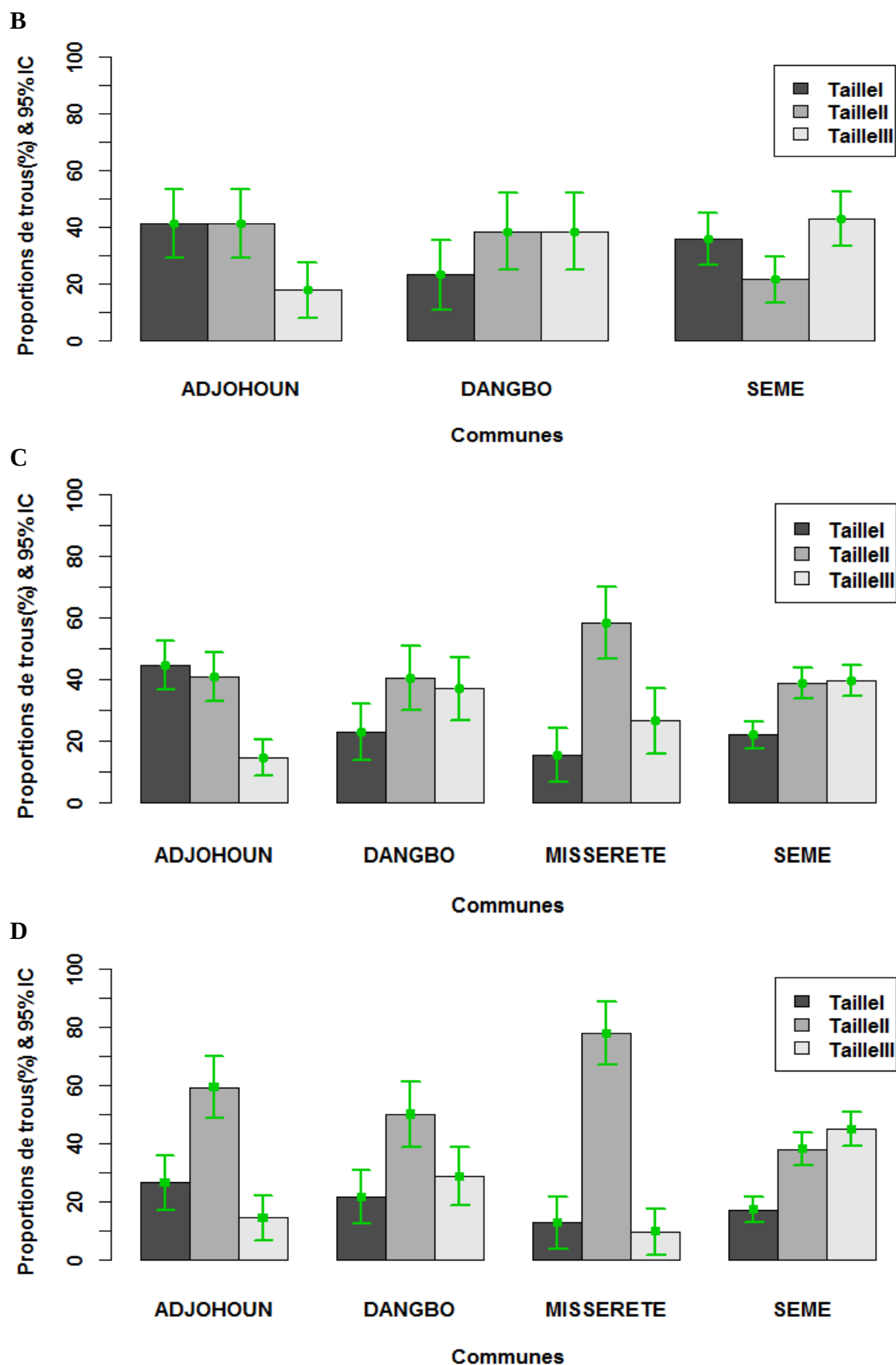


Figure 24: Fréquences des types de trous rencontrés sur les Olysets PNL 2011 (A), autres Olysets (B), Permanets (C) et autres moustiquaires (D) dans les différentes communes.

1.6. Efficacité des Olyset après 6 mois d'utilisation

Vingt Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action ont été choisies au hasard dans la population et testées pour leur bio-efficacité sur la souche sensible de *An. gambiae* (Kisumu). Parmi les 20 moustiquaires, 10 étaient du type Olyset et 10 du type Permanet. Sur les 10 moustiquaires Olyset, une (1/10) a donné un taux de mortalité inférieur à 80%, seuil de bio-efficacité des moustiquaires imprégnées sur les souches de moustiques sensibles (figure 25). En revanche, concernant les moustiquaires Permanet 2.0 qui étaient en utilisation il y a plus de 6 mois, elles se sont révélées en dessous du seuil de bio-efficacité avec des taux de mortalité de *An. gambiae* Kisumu inférieurs à 65,12% (figure 26).

Avec la population résistante (*An. gambiae* Ladji), on note une baisse remarquable de l'efficacité des 2 types de moustiquaires (Olyset PNLP et Permanet). Le taux de mortalité enregistré est compris entre 0 et 36,36% pour les Olyset après 6 mois d'utilisation (figure 25) et entre 0 et 11,76% avec les Permanets en usage depuis 2 ans (figure 26).

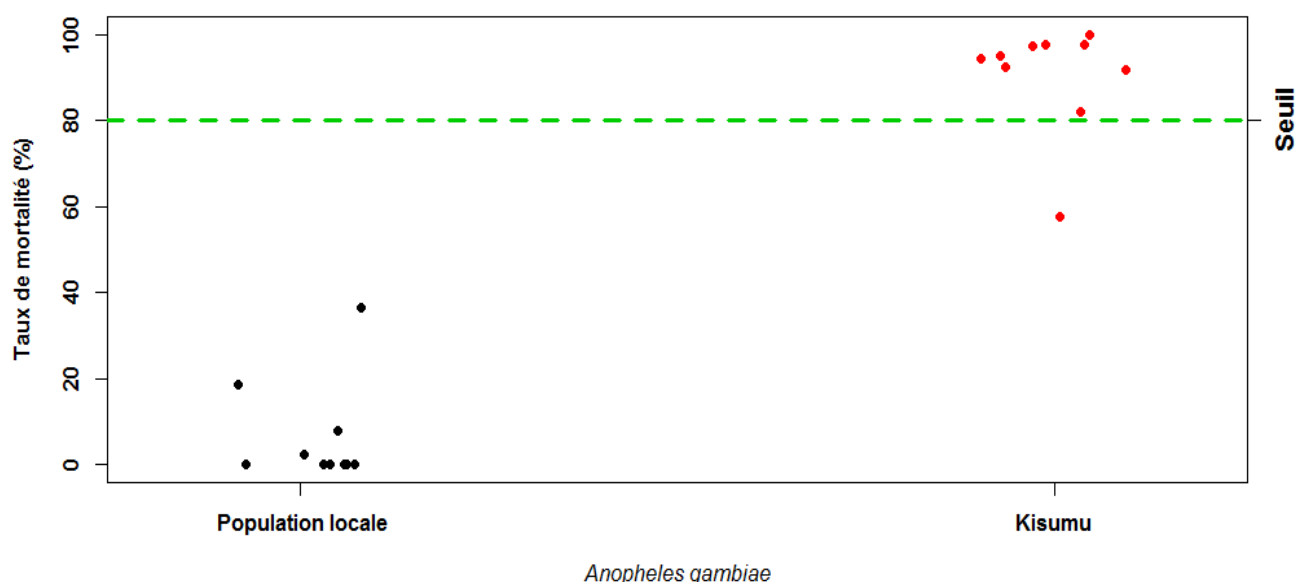


Figure 25 : Taux de mortalité de *An. gambiae* Kisumu (souche sensible) après 3 min d'exposition aux moustiquaires Olyset PNLP retirées dans la population.

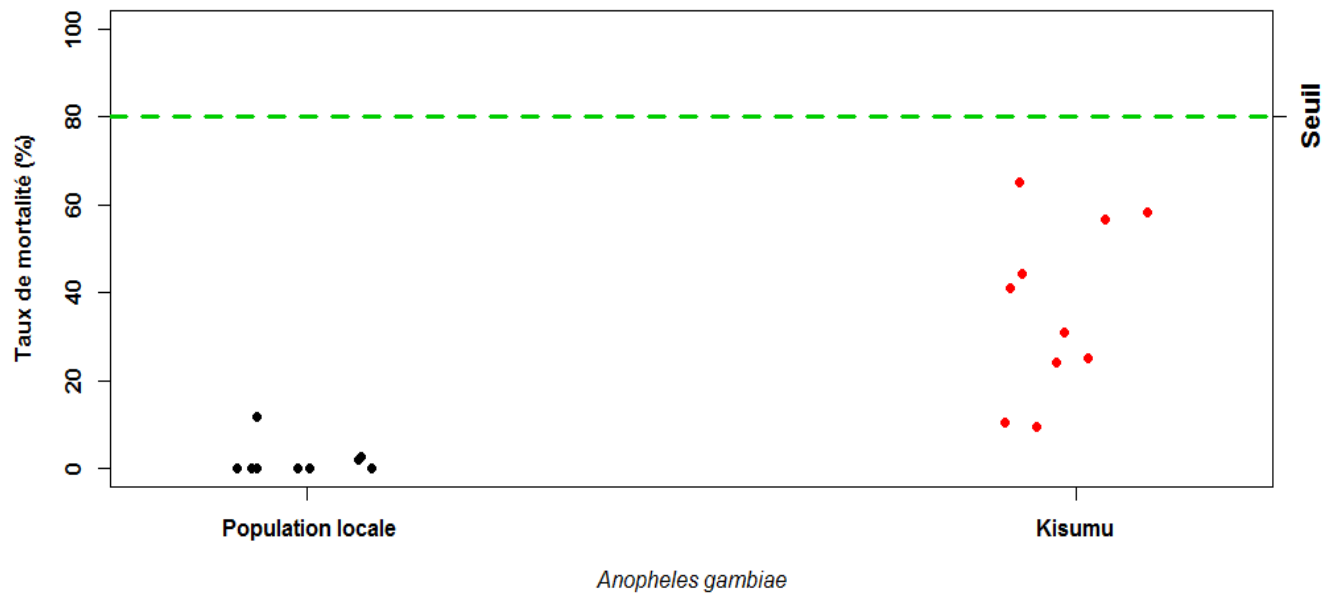


Figure 26: Taux de mortalité de *An. gambiae* Ladj (souche de terrain) après 3 min d'exposition aux moustiquaires Permanet retirées dans la population.

1.7. Fréquences alléliques de la mutation *Kdr* observées chez les morts et survivants de *An. gambiae* issus des tests d'efficacité

La résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes représenterait un handicap potentiel pour le succès des programmes de lutte anti-vectorielle au Bénin. Mais la mutation *Kdr* qui confère aux vecteurs la résistance aux pyréthrinoïdes a été observée au Bénin (Yadouléon *et al.*, 2010). Il importe alors de connaître l'impact de cette mutation sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées en utilisation actuellement au Bénin dans le cadre de la lutte antivectorielle. C'est ce qui justifie cette rubrique qui vise à tester l'efficacité des supports imprégnés d'insecticide sur les vecteurs du paludisme porteurs des mutations *Kdr*.

La fréquence allélique de la mutation *Kdr* au sein de la population testée (154 individus dont 26 morts et 128 vivants) a été de 90,26%. Cette fréquence chez les moustiques morts et vivants ont été respectivement de 94% et 89,53%. Aucune différence significative de la fréquence allélique de cette mutation n'a été observée entre les moustiques morts et vivants ($p=0,4752$) (tableau VIII).

Tableau VIII : Fréquences alléliques de la mutation *Kdr* observées chez *An. gambiae* (morts et vivants) après exposition à la moustiquaire Olyset

Statut du moustique	Mutation <i>Kdr</i>				Freq (%)	p
	Total	RR	RS	SS		
Vivant	129	102	27	0	89,53	0,48
Mort	25	22	3	0	94	
Total	154	124	30	0	90,26	

S : Allèle normal R : Allèle muté

La mutation *Kdr* étant récessive, nous avons regroupé les génotypes RS et SS et nous avons comparé le taux de mortalité observé chez ces individus avec celui observé chez les individus de génotype RR. Le taux de mortalité chez les moustiques de génotype RS et SS a été de 10% et celui chez les moustiques de génotype RR a été de 17,74%. Il n'y a pas de différence significative (p=0,45) (tableau IX).

Tableau IX : Taux de mortalité de *Anopheles gambiae* exposé à la moustiquaire Olyset en fonction des génotypes pour la mutation *Kdr*

Génotypes	N testés	N morts	Taux de mortalité (%)	p
RR	124	22	17,74	0,45
RS+SS	30	3	10,00	

S : Allèle normal R : Allèle muté

2. Discussion

L'introduction à grande échelle des moustiquaires imprégnées d'insecticide est devenue une priorité pour la prévention et le contrôle du paludisme. L'accès à la couverture universelle des MIILD et l'utilisation correcte de ces moustiquaires sont un défi à relever pour une lutte efficace contre le paludisme en Afrique sub-saharienne. De nombreux pays investissent déjà dans la distribution gratuite des moustiquaires. Toutefois, à l'heure actuelle, la couverture globale est en deçà de l'objectif de l'OMS d'atteindre au moins 80% des personnes à risque ou souffrant du paludisme (WHO, 2008). Selon une étude réalisée par le PNUD (United Nations, 2008), le succès dans la réalisation du 6^{ème} objectif OMD et d'autres objectifs mondiaux de

réduction du poids du paludisme dépendra de la sensibilisation des populations sur l'utilisation des moustiquaires et sur la disposition de l'accès aux moustiquaires efficaces.

Dans notre zone d'étude, la couverture moyenne en MIILD des populations cibles a été globalement bonne: 1 moustiquaire Olyset pour 1,9 personne correspond bien aux attentes du PNLP. En 2001, avant les campagnes nationales de distribution des MIILD, dans le sud du Bénin, seulement 4,3% des maisons possédaient une moustiquaire imprégnée et 2,4% des enfants âgés de moins de 5 ans dormaient sous moustiquaires imprégnées (Kindé-Gazard *et al.*, 2004). L'augmentation significative du taux de couverture après les campagnes de distribution des MIILD est tout à fait logique et a déjà été antérieurement constatée (Skarbinski *et al.*, 2007; Thwing *et al.*, 2008; Matovu *et al.*, 2009). Cependant, ce taux de couverture obtenu est inférieur à ceux observés dans les ménages éligibles au Kenya (68%), au Niger (70%) et au Mali (81%) après les campagnes nationales de distribution (Cervinskas *et al.*, 2008; Thwing *et al.*, 2008; Hightower *et al.*, 2010). Si le taux de couverture des moustiquaires Olyset est bon dans la zone d'étude, elle est faible à Dangbo (1 Olyset pour 2,1 personnes) et très faible à Sèmè (1 Olyset pour 3,4 personnes).

L'utilisation des MIILD (tous les types de MIILD) quant à elle, a été meilleure dans la population générale (81,76%). Mais il faut noter qu'à Missérété, le taux d'utilisation des Olyset est inférieur à la normale (74% contre les 80% attendus). Cette forte utilisation des MIILD constatée chez les populations des 4 communes en saison sèche peut s'expliquer par la présence de gîtes permanents et de bas-fonds dans ces zones entraînant ainsi une forte nuisance culicidienne. Ces résultats sont au-delà de ceux enregistrés dans diverses études antérieures en Afrique de l'Ouest pendant la même période (Ahorlu *et al.*, 1997; Toe *et al.*, 2009). En effet, ces études qui ont été réalisées au Ghana et au Burkina Faso ont montré que les populations sont moins motivées pour utiliser les moustiquaires en saison sèche qui se conjugue avec de fortes températures nocturnes au moment où tout le monde est à la recherche de courant d'air.

Les MIILD constituent avant tout une barrière physique. Pour cela, on doit veiller à ce qu'elles conservent leur intégrité physique. Dans certaines zones d'étude (Adjohoun, Dangbo et Sèmè), plus de 10% des moustiquaires Olyset sont déchirées après 6 mois d'utilisation seulement. Il y a donc une dégradation accélérée des fibres moustiquaires au niveau des sites d'étude. La dégradation est plus accrue dans les zones lacustres où l'eau est permanemment disponible (Adjohoun, Dangbo et Sèmè). La proximité avec l'eau et la densité anophélienne élevée sont les raisons de la forte utilisation des moustiquaires et de leur lavage régulier. Les fibres des MIILD s'en trouvent ainsi fragilisées, ce qui réduit leur durabilité. En effet, quand

les enfants urinent ou tachent les moustiquaires d'huile, elles sont systématiquement lavées. De plus, les types de couchages (les claies) que possèdent une bonne partie des habitants et la brûlure par les lampions peuvent aussi contribuer à la déchirure de ces Olyset. La dégradation est moins accentuée à Missérété. En effet, dans cette localité, les moustiquaires subissent moins de pression en raison d'un taux d'utilisation plus faible en comparaison avec les autres communes. Dans une étude sociologique réalisée en 2005 dans le cadre du programme Pal+, les habitants de Kétonou, un arrondissement de forte pullulation de moustiques comme Dangbo et Sèmè, situé en bordure du lac Nokoué, ont déclaré que dans leur zone, les populations mangent et dorment sous moustiquaire. Si cette déclaration est réelle, cela montre le contact fréquent qui pourrait exister entre l'homme et la moustiquaire dans certains environnements. En effet, les résultats de l'enquête sociologique à l'époque ont montré que plus de 95% des populations utilisaient régulièrement leurs moustiquaires. Des moustiquaires supplémentaires étaient même disponibles pour les visiteurs.

La proportion et la taille des trous varient en fonction des communes. La présence de trous de grande taille pose un réel problème de sensibilisation pour la bonne utilisation des moustiquaires par les populations et de leur adaptabilité à la configuration des chambres. On peut par exemple initier des programmes de réparation des moustiquaires déchirées sur place par les communautés en mettant à leur disposition des kits de réparation. Cette opération aura pour but une augmentation de la durée de vie de la moustiquaire dans les conditions d'utilisation communautaire et la diminution des fréquences de remplacement. Des travaux préliminaires ont montré que les moustiquaires imprégnées sont efficaces même si elles sont trouées. En raison du niveau de résistance élevé des moustiques aux insecticides au Bénin, ces données doivent être actualisées.

Bien que l'on ait constaté des anomalies dans plusieurs pays selon lesquelles des MIILD distribuées par les campagnes de masse ont été vendues au marché ou ne sont pas utilisées, dans notre zone d'étude, la majorité des MIILD distribuées par le PNLP sont trouvées dans les ménages et étaient accrochées la nuit précédant l'enquête. 81,3% des Olyset reçus par les habitants ont été suspendues dans les ménages la nuit précédant l'enquête. Les MIILD absentes (non suspendues) ont été majoritairement (92,35%) conservées dans les valises et les autres sont données aux autres membres de la famille absentes lors de la campagne. Ces résultats ont été notés aussi au Niger (Thwing *et al.*, 2008).

Les résultats générés dans cette étude ont révélé une faible efficacité des Olyset vis-à-vis de la population résistante. Les taux de mortalité observés après les tests en cône sur les Olyset ont été très faibles confirmant la résistance des vecteurs du paludisme aux pyrèthrinoïdes

précédemment rapportée par plusieurs auteurs (Akogbéto et Yacoubou, 1999; Etang *et al.*, 2003; Corbel *et al.*, 2007; Yadouléton *et al.*, 2010). Ces faibles taux de mortalité sont dus au fait que les pyréthréinoïdes agissent sur le canal sodium et chez les vecteurs porteurs de la mutation *Kdr*, cette cible est modifiée et l'insecticide n'a plus son récepteur spécifique et donc ne peut plus agir. Des moustiques morts ont été néanmoins enregistrés parmi les individus porteurs de la mutation *Kdr*, ce qui montre que ce n'est probablement pas le seul portage de la mutation *Kdr* qui détermine la résistance des vecteurs. Il a été en effet montré que d'autres mécanismes, notamment des mécanismes enzymatiques sont impliqués dans cette résistance (Djouaka *et al.*, 2008). Si cette baisse d'efficacité est liée à la résistance, il n'est pas exclu que la forte demande des MIILD sous les tropiques occasionne la baisse de rigueur du contrôle de fabrication de ces MIILD avant leur sortie des industries. Par ailleurs, certains échantillons de moustiquaires séjournent longtemps dans les structures de santé dans des conditions inadéquates avant d'être utilisées. Pendant ce long séjour, il est possible que le produit actif contenu dans l'insecticide perde une partie de son efficacité.

L'inefficacité des Permanet observée un à deux ans après leur utilisation peut être due non seulement à leur durée d'utilisation mais aussi aux savons de lavage utilisés par les bénéficiaires au cours de l'utilisation. En effet, la majorité des Permanet retirées (9/10) ont été lavées par des détergents (Kogui et Klin) depuis leur acquisition. Or, des études antérieures ont montré que certains savons de lavage ont un impact négatif sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide (Agossou *et al.*, 2006; Azondékon & Vigninou, 2007).

Les résultats de la présente étude relativisent l'idée du concept de « longue durée d'action » des moustiquaires imprégnées dans les conditions d'utilisation de terrain. En effet, un taux de perforation de 14% des Olyset après seulement 6 mois d'utilisation n'est pas faible. On se demande si c'est le tulle qui a servi à la fabrication de la moustiquaire qui est en cause ou si ces perforations précoces sont dues à un manque de soin et d'entretien dans les ménages. Les moustiquaires étant distribuées gratuitement et régulièrement aux populations pourraient être considérées comme un outil vulgaire et perdre leur valeur. L'usure rapide associée à la faible efficacité pose le problème du choix des matériaux imprégnés dans un contexte de forte résistance des vecteurs aux insecticides. Chaque année, on nous propose une nouvelle formulation d'insecticide comme la solution de contrôle des moustiques résistants ou un type de moustiquaire imprégnée de plus longue durée d'action. Mais sur le terrain, les nouveaux outils se comportent presque de la même manière que les outils précédents.

3. Conclusion

De façon globale, l'accès à la couverture universelle basée sur un Olyset pour deux personnes lors de la distribution des MIILD en juillet 2011 est atteint dans le département de l'Ouémé. En tenant compte des autres moustiquaires autres que les Olyset de 2011, le taux de couverture est supérieur aux attentes. La promesse faite par l'état béninois, à savoir, compenser le remplacement de la PID en distribuant des moustiquaires à tout le monde, est réalisée. Toutefois, dans les communes de Sèmè et de Dangbo, la couverture en Olyset PNLP n'est pas totale. Il serait intéressant que le PNLP revoie sa stratégie de distribution des moustiquaires pour amener tout le pays vers la couverture universelle. Les résultats obtenus révèlent une inefficacité des Olyset vis-à-vis des populations de moustiques de terrain après seulement 6 mois d'utilisation. Le concept des MIILD tel que défini par les concepteurs n'a pas pris en compte certaines réalités liées à la résistance des moustiques aux insecticides et les diverses pressions que peuvent subir les moustiquaires dans les communautés.

Aujourd'hui, les moustiquaires imprégnées d'insecticide sont gratuitement données à la population dans de nombreux pays. Cette gratuité améliore certes leur possession mais ne garantit pas leur utilisation domiciliaire effective. C'est la sensibilisation et l'implication de ce potentiel social humain qui peuvent donner des résultats au-delà de nos attentes et induire la pérennisation de l'utilisation des moustiquaires au niveau communautaire. Dans la présente étude, nous avons noté avec satisfaction que plus de 80% des Olyset sont utilisés par les populations. Cela montre que les populations de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè ont adhéré à la mesure proposée par le PNLP en remplacement de la PID. C'est pourquoi nous avons entrepris dans le prochain chapitre d'étudier l'impact de l'arrêt de la PID sur la transmission du paludisme dans des zones sous couverture universelle des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action.

Chapitre 5 :

**Impact de l'arrêt de la PID sur la transmission du paludisme dans l'Ouémé:
évolution des indicateurs entomologiques dans les zones sous couverture
universelle des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action**

Le chapitre 5 s'est intéressé à l'évolution des indicateurs entomologiques après l'arrêt de la PID. Après cet arrêt, nous avons poursuivi les bioessais sur les murs traités pour s'assurer qu'à la période où les MIILD sont déployées, l'action létale du bendiocarb était en dessous du seuil d'efficacité. Cette précaution a pour but d'éviter tout biais qui pourrait renforcer l'action des MIILD (**Article 8**). Ensuite, nous avons récolté des informations sur la dynamique des populations de moustiques dans les communes sous l'utilisation généralisée des MIILD et l'infectivité de ces moustiques pour le *P. falciparum* (**Article 2**). Ainsi, les paramètres entomologiques enregistrés ont été comparés aux données obtenues lors de la campagne PID.

L'objectif de cette rubrique est d'étudier l'impact du remplacement de la PID par les MIILD sur la transmission du paludisme dans un contexte de forte résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes dans le département de l'Ouémé.

Pour atteindre cet objectif, deux activités ont été réalisées:

- L'étude de la biodisponibilité du bendiocarb sur les murs traités après 4 tours de PID.
- L'étude du niveau de la transmission du paludisme et du comportement des moustiques au contact des moustiquaires Olyset.

Des prospections larvaires ont été faites dans les 4 communes en vue de réaliser les bioessais sur les murs traités. Des captures de moustiques sur appât humain et par des pièges fenêtres associés à la récolte de la faune résiduelle ont été organisées. Les moustiques issus de ces captures ont été traités comme décrit au chapitre 2.

Les données détaillées de cette partie de la thèse sont publiées en détail dans l'**article 2**, mais nous reprenons ici les points essentiels relatifs aux résultats et à la discussion.

Article 2: Ossè RA, Aïkpon R, Gbédjissi GL, Gnanguenon V, Sèzonlin M, Govoétchan R, Sovi A, Oussou O, Oké-Agbo F, Akogbéto M: 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* 2013, **6**:73.

Article 8: Efficacité et rémanence du bendiocarb sur les supports imprégnés après quatre tours de pulvérisation intradomiciliaire dans le département de l'Ouémé (En cours de rédaction).

1. Résultats

1.1. Biodisponibilité du bendiocarb sur les supports traités après 4 tours de PID de 2008 à 2010

Quatre tours de pulvérisations intradomiciliaires de bendiocarb ont été effectués dans le département de l'Ouémé: juillet-août 2008, mars 2009, mars-avril 2010 et août-septembre 2010. La durée de l'effet résiduel a été déterminée pour chaque tour. Nous avons également examiné l'éventuelle existence d'une accumulation de particules d'insecticide sur les supports après 2, 3, 4 tours de pulvérisation, ce qui pourrait allonger la durée d'action du bendiocarb. Différents supports imprégnés ont été testés. Dans cette étude, nous montrons les résultats des supports les plus représentés dans les quatre communes. Ces supports sont les murs en ciment crépis ou non crépis, les murs en banco crépis ou non crépis et les murs en ciment badigeonnés.

Au total, 7920 femelles de *An. gambiae* dont 3960 spécimens de la souche sensible Kisumu et 3960 spécimens sauvages (population Akron) ont été utilisées pour les bioessais.

Les résultats obtenus 2 semaines après traitement

Les premiers tests sont effectués deux semaines après la pulvérisation intradomiciliaire. Pendant les quatre tours de la PID, tous les moustiques exposés sur les murs traités sont morts dans les 24 heures indépendamment de la position du cône sur les murs (en bas, au milieu ou en haut) (100% de mortalité) (Figure 27).

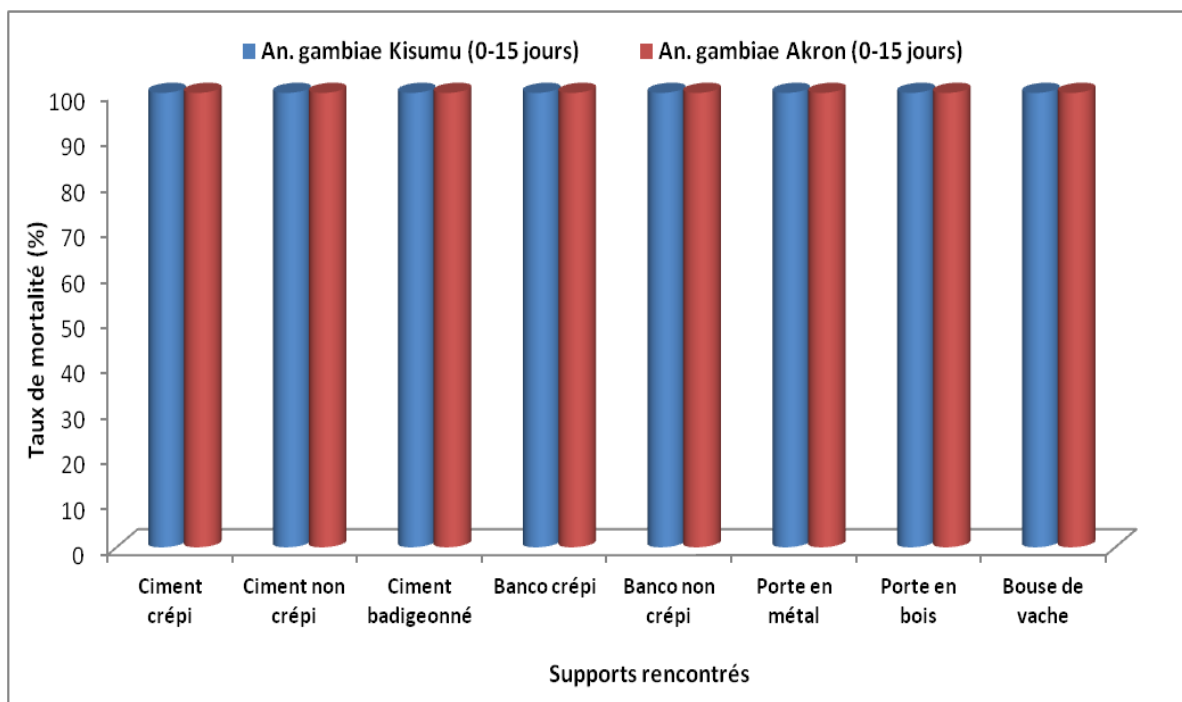


Figure 27 : Taux de mortalité de *Anopheles gambiae* Kisumu (souche sensible) et de *An. gambiae* sauvage (population locale résistante aux insecticides) après 30 minutes d'exposition aux différents matériaux imprégnés, 2 semaines après la PID (3^{ème} et 4^{ème} tours).

Les résultats obtenus 1 mois (T₀), 2 mois (T₁), 3mois (T₂) et 4 mois (T₃) après le traitement

Un mois (T₀) après le premier tour de pulvérisation (en 2008), le taux de mortalité de *An. gambiae* « Akron » sur les supports ciment non crépis et banco non crépis traités avec du bendiocarb a été respectivement de 98,53% et 92,91%. A partir du deuxième mois, ce taux a commencé par diminuer progressivement atteignant respectivement 22,20% et 19,01% au quatrième mois pour les supports ciment non crépi et banco non crépi. Après les traitements de 2009 et 2010 (2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} tours), le taux de mortalité de *An. gambiae* « Akron » a été de 100% du premier au quatrième mois sur tous les supports traités à l'exception du ciment non crépi, du banco crépi, du banco non crépi et du ciment badigeonné. Sur le support ciment non crépi au quatrième mois, la mortalité évolue et passe de 36,7% au 2^{ème} tour à 90,9% et 93,33% respectivement aux 3^{ème} et 4^{ème} tours. Une observation similaire a été faite sur le support banco non crépi avec des taux de mortalité de 29,72%; 72,95% et 90% respectivement aux 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} tours. Quant au support ciment badigeonné, la mortalité passe de 81,57% au 2^{ème} tour à 81,81% et 91,11% respectivement aux 3^{ème} et 4^{ème} tours. Pour

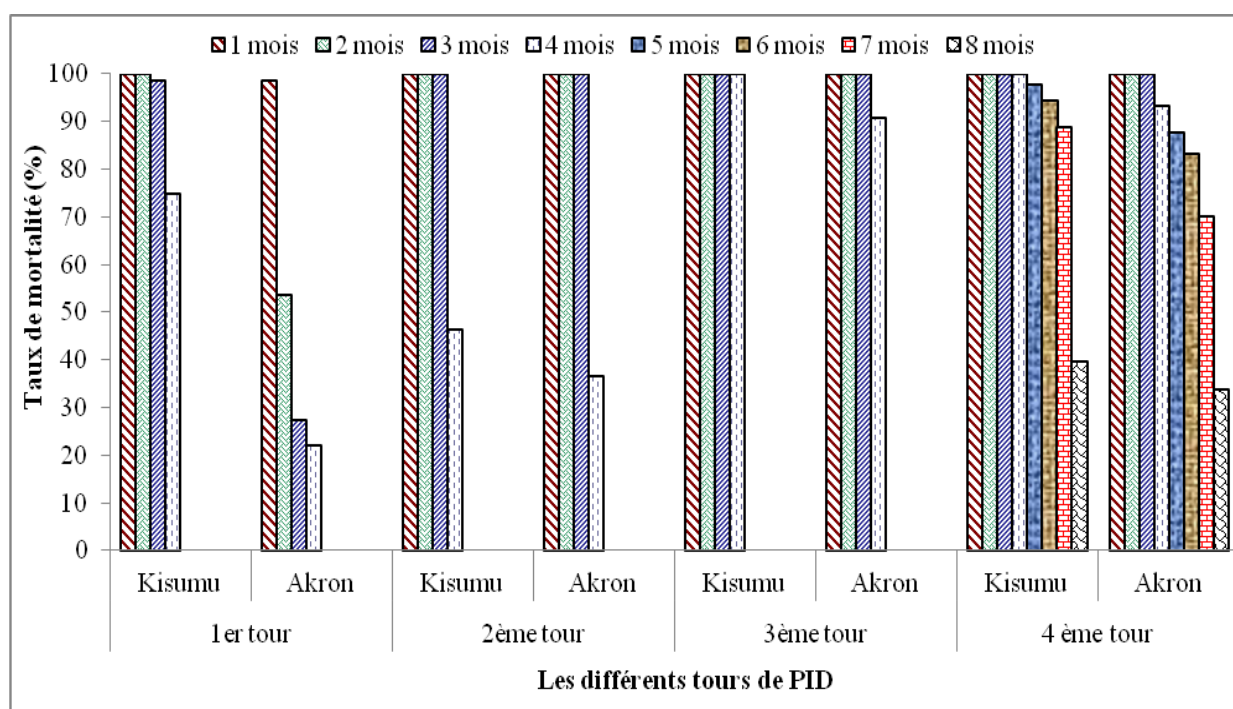
les supports ciment non crépis et banco non crépis, il y a une différence significative entre les mortalités obtenues aux 3^{ème} et 4^{ème} tours ($p<0,05$).

Avec la souche sensible Kisumu, jusqu'au deuxième mois après traitement, le taux de mortalité n'a pas varié, quel que soit le traitement et le support, il a été de 100%. A partir du troisième mois, une légère baisse de ce taux a été observée sur les supports ciment non crépis et banco non crépis (au 1^{er} tour de traitement) et ciment badigeonnés (au 2^{ème} tour de traitement). Par ailleurs, pour la souche sensible Kisumu, une différence significative est observée au deuxième tour avec le support banco non crépi ($p<0,05$) et au quatrième mois avec les supports ciment non crépis et banco non crépis ($p<0,05$) (figure 28A, B, C, D, E).

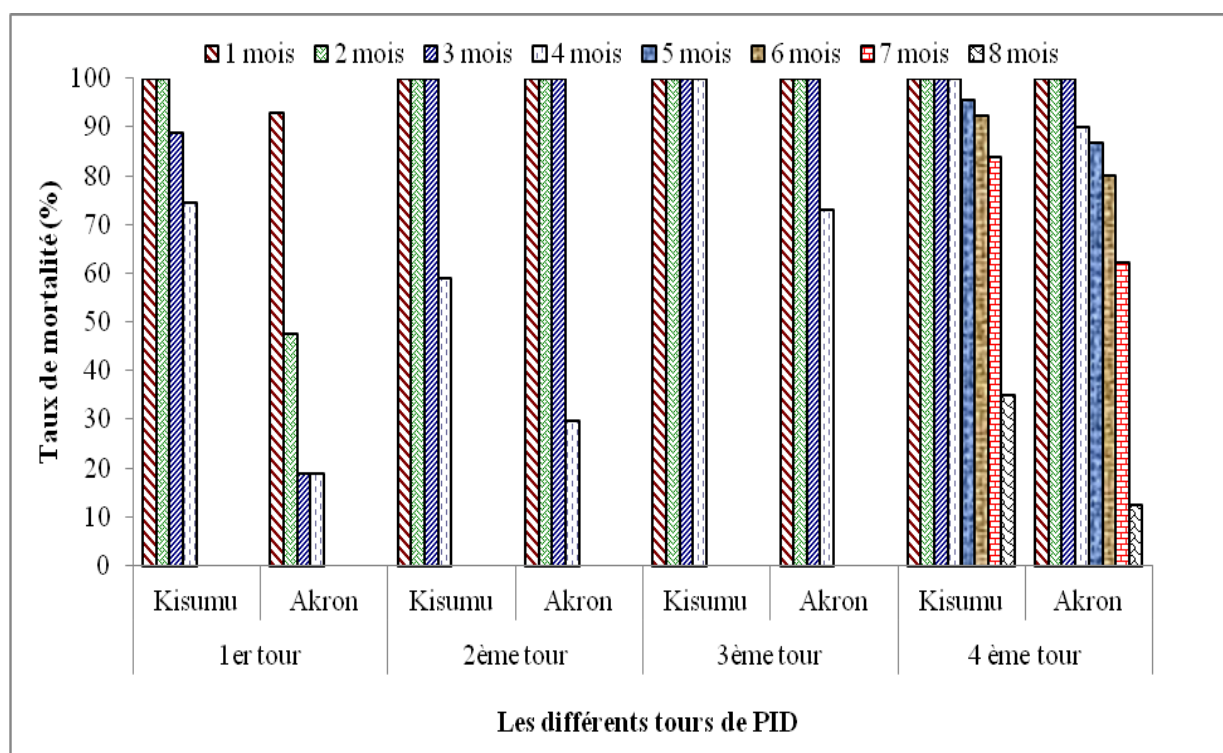
Résultats au-delà des quatre mois d'évaluation

Pour les 3 premiers tours de la pulvérisation, l'évaluation a été arrêtée au 4^{ème} mois. C'est seulement au quatrième tour qu'elle a été poursuivie jusqu'à 8 mois. Au quatrième tour de la PID, l'effet résiduel du bendiocarb a été enregistré jusqu'à sept mois sur la souche sensible Kisumu avec des taux de mortalité allant de 91,1% (murs en ciment crépis) à 83,9% (murs en banco non crépis). Pour *An. gambiae* récoltés sur le terrain (Akron), au-delà du sixième mois, tous les taux de mortalité étaient inférieurs au seuil d'efficacité sur tous les supports (figure 28A, B, C, D, E).

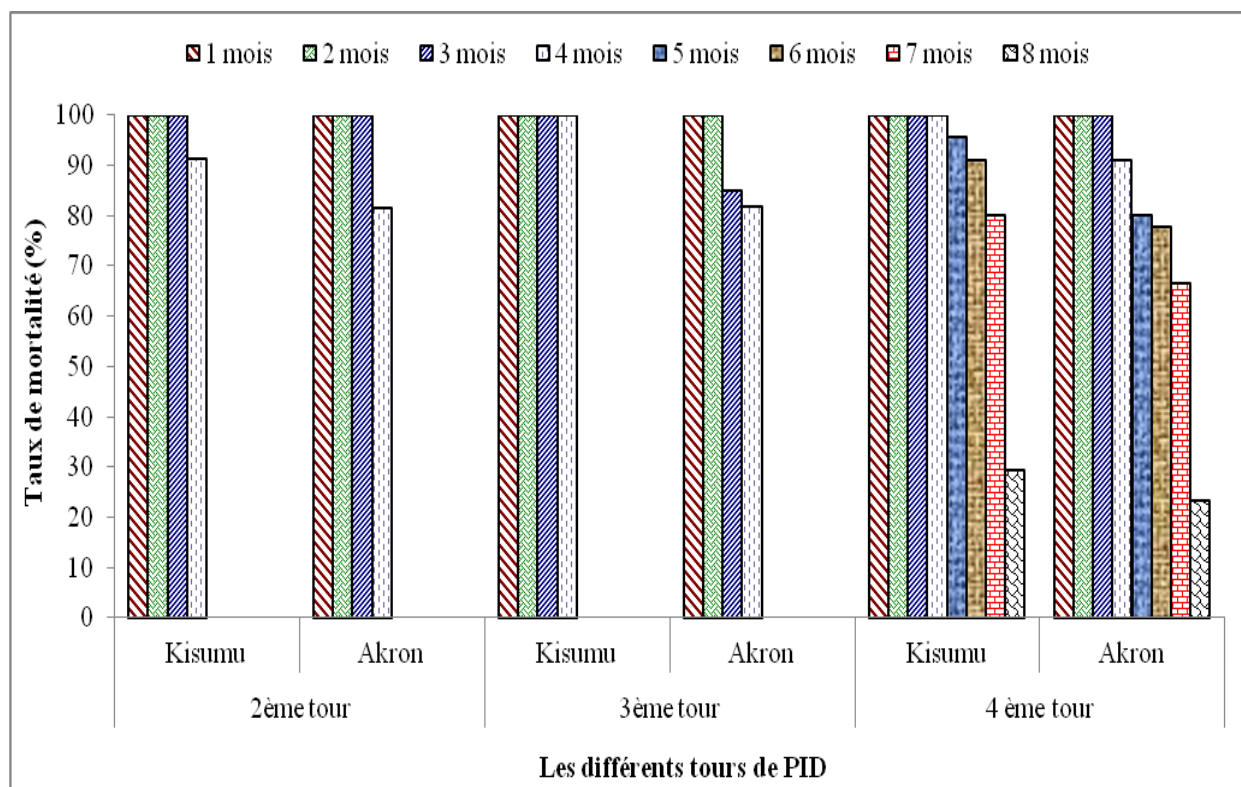
A-



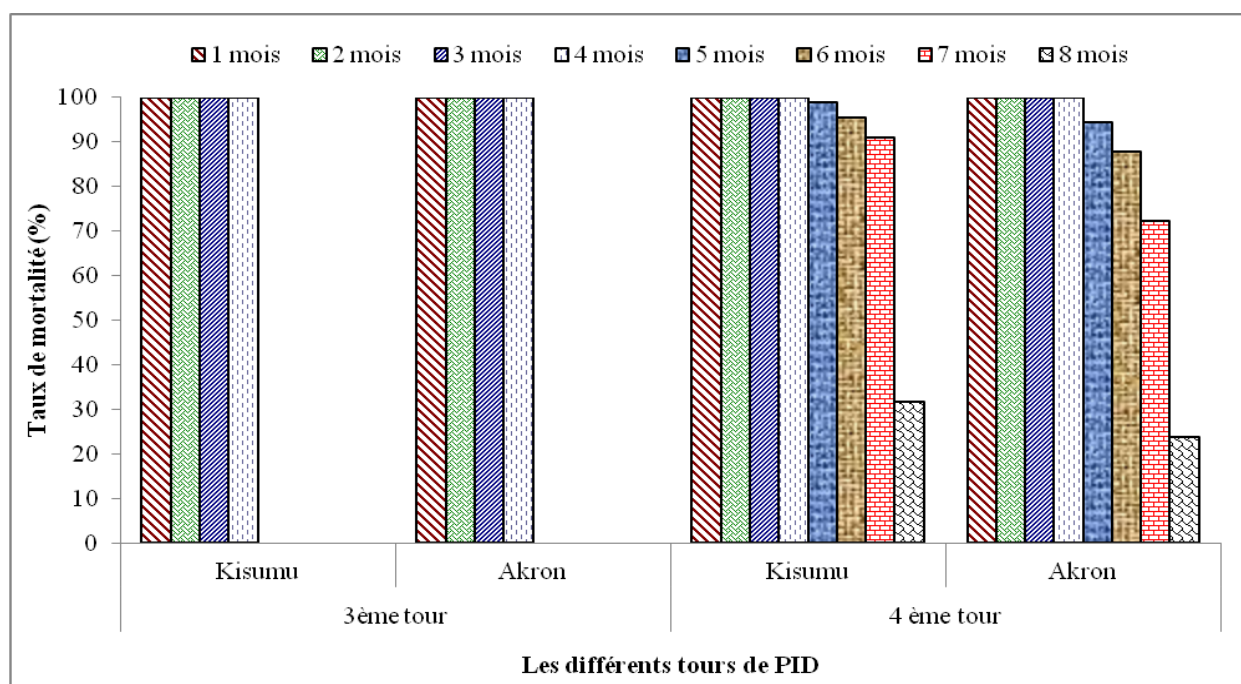
B-



C-



D-



E-

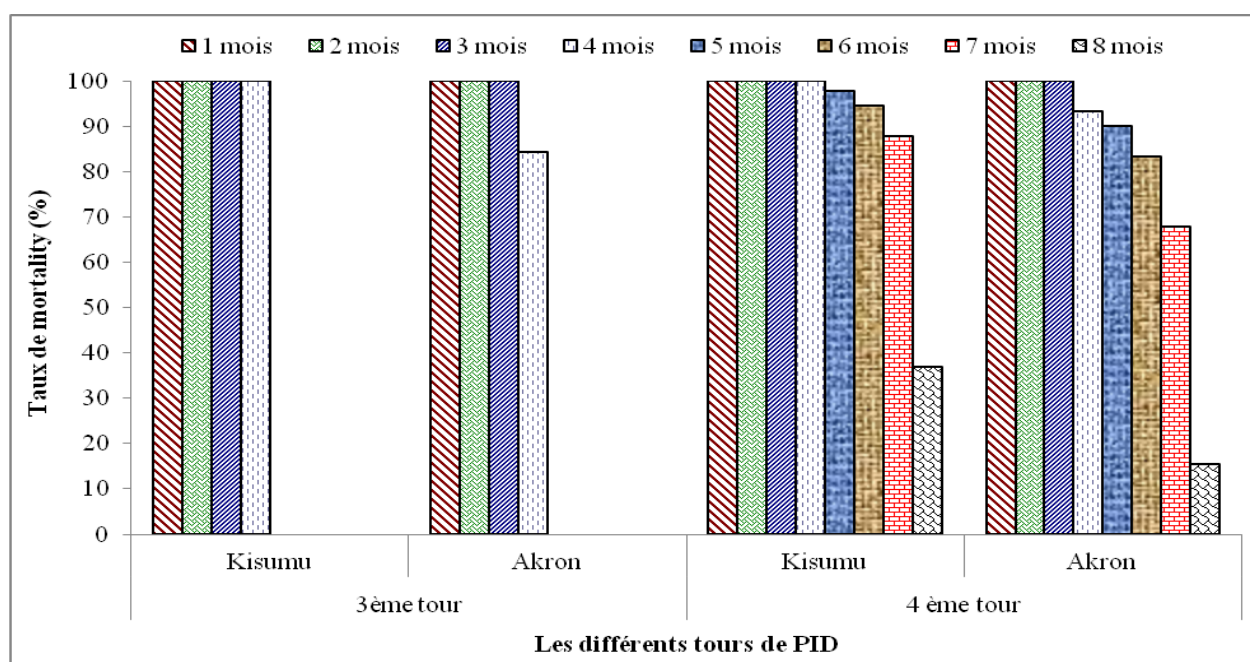


Figure 28 : Taux de mortalité de *Anopheles gambiae* Kisumu (souche sensible) et de *Anopheles gambiae* population sauvage (population résistante) après 30 minutes d'exposition aux murs en **ciment non crépis (A)**, **banco non crépis (B)**, **ciment badigeonné (C)**, **ciment crépi (D)** et en **banco crépi (E)** après 1, 2, 3 et 4 tours de la PID au bendiocarb.

1.2. Comportement de *An. gambiae* après arrêt de la PID

1.2.1. Comparaison des taux de piqûres de moustiques sur homme (PHN) enregistrés pendant la campagne PID et après l'arrêt de la PID

La distribution des moustiquaires imprégnées à tous les ménages n'a pas permis de maintenir le contact homme-vecteur à son niveau initial noté au cours de la campagne PID. En effet, dans 3 des 4 communes, le taux de piqûres des anophèles a augmenté après l'arrêt de la PID. Les résultats suivants indiquent les taux de piqûres de *An. gambiae* enregistrés pour la période d'avril à décembre 2010 lors de l'intervention PID et d'avril à décembre 2011 après la PID (période MIILD) (tableau X).

Dans les communes de Adjohoun, Dangbo et Missérété, une augmentation significative du PHN de *An. gambiae* a été enregistrée après l'arrêt de la PID ($p < 0,001$) (tableau X, figure 29). Dans la commune de Adjohoun, le nombre de piqûres moyen à l'intérieur des maisons a été de 86,78 piqûres/homme/9mois pendant la campagne PID contre 297,79 après l'arrêt de l'intervention (tableau X). A l'extérieur des maisons de cette commune, la densité agressive a été significativement plus élevée pendant la période MIILD (43,39 piqûres/homme en Avril-décembre 2010 contre 190,59 après l'arrêt de la PID). Le même constat a été fait dans la commune de Missérété et à l'intérieur des habitations de Dangbo centrale (tableau X).

Tableau X : Taux de piqûre de *An. gambiae* enregistrés à l'intérieur et à l'extérieur des maisons pendant la campagne PID et après l'arrêt de la PID

		Pendant la PID (avril-décembre 2010)				Après arrêt de la PID (avril-décembre 2011)			
		Total moustiques	N hommes captures	PHN/ nuît	PHN/ période	Total moustiques	N hommes captures	PHN/ nuît	PHN/ période
Adjohoun									
Centrale	Intérieur	4	28	0,14	38,57	31	34	0,91	246,18
	Extérieur	4	28	0,14	38,57	22	34	0,65	174,71
Périphérique	Intérieur	14	28	0,50	135,00	44	34	1,29	349,41
	Extérieur	5	28	0,18	48,21	26	34	0,76	206,47
Dangbo									
Centrale	Intérieur	4	28	0,14	38,57	9	34	0,26	71,47
	Extérieur	11	28	0,39	106,07	11	34	0,32	87,35
Périphérique	Intérieur	70	28	2,50	675,00	58	34	1,71	460,59
	Extérieur	37	28	1,32	356,79	25	34	0,74	198,53
Missérété									
Centrale	Intérieur	3	28	0,11	28,93	14	34	0,41	111,18
	Extérieur	14	28	0,50	135,00	28	34	0,82	222,35
Périphérique	Intérieur	45	28	1,61	433,93	33	34	0,97	262,06
	Extérieur	31	28	1,11	298,93	73	34	2,15	579,71
Sèmè									
Centrale	Intérieur	190	28	6,79	1832,14	51	34	1,50	405,00
	Extérieur	329	28	11,75	3172,50	89	34	2,62	706,76
Périphérique	Intérieur	110	28	3,93	1060,71	58	34	1,71	460,59
	Extérieur	217	28	7,75	2092,50	151	34	4,44	1199,12
Adjara (Témoin)									
Centrale	Intérieur	144	28	5,14	1388,57	6	34	0,18	47,65
	Extérieur	137	28	4,89	1321,07	11	34	0,32	87,35
Périphérique	Intérieur	562	28	20,07	5419,29	349	34	10,26	2771,47
	Extérieur	521	28	18,61	5023,93	426	34	12,53	3382,94

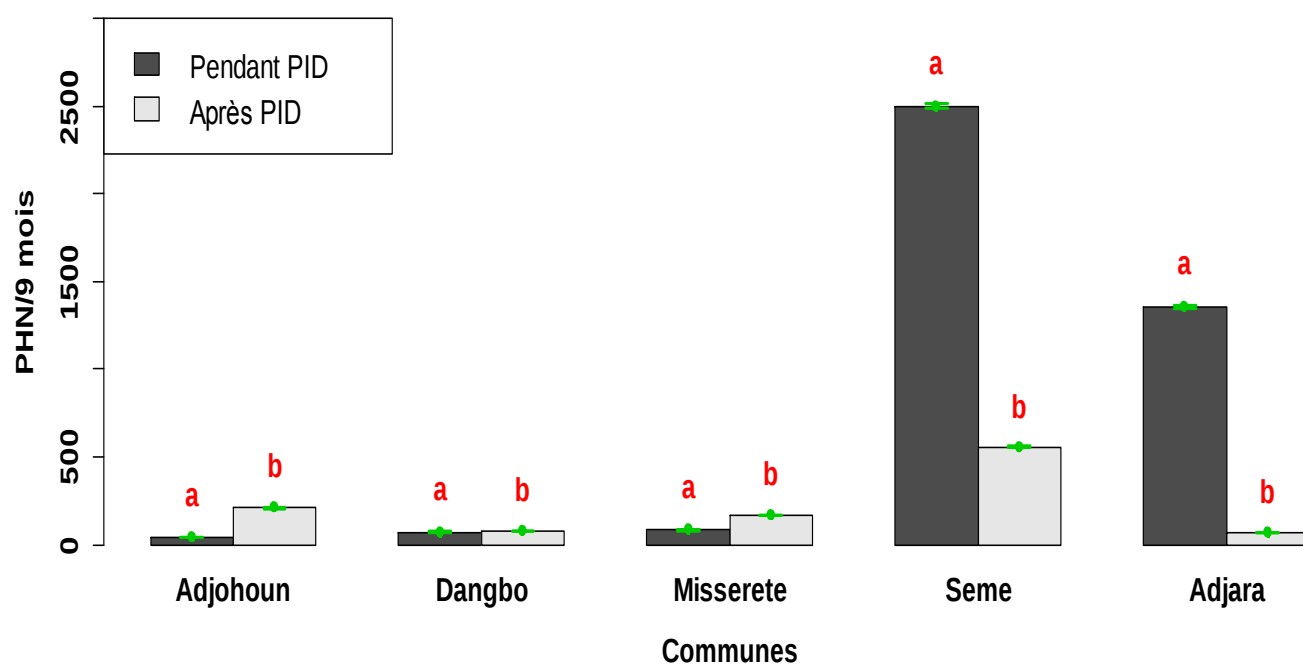
N = nombre

Pour ce qui concerne le taux de piqûre global dans les communes, à Adjohoun, il est passé de 38,57 piqûres de *An. gambiae* / homme pendant la PID à 210,44 après arrêt de la PID dans la zone centrale ($p < 0,001$) et de 91,61 à 277,94 piqûre de *An. gambiae* / homme dans la zone périphérique. A Missérété, la même augmentation du taux de piqûre a été observée dans les

deux zones (81,96 piqûres de *An. gambiae* / homme à 166,76 après arrêt de la PID dans la zone centrale ($p<0,001$) et 366,43 piqûres à 420,88 après arrêt de la PID dans la zone périphérique ($p<0,001$)). Par contre, c'est seulement à Dangbo centre qu'une légère augmentation a été observée ($p<0,001$) (figure 29A).

Mais à Sèmè et à Dangbo périphérique, la situation est différente. Le PHN après arrêt de la PID a diminué de manière significative par rapport à ce qui a été enregistré lors de l'intervention ($p<0,001$) (Figure 29).

A



B

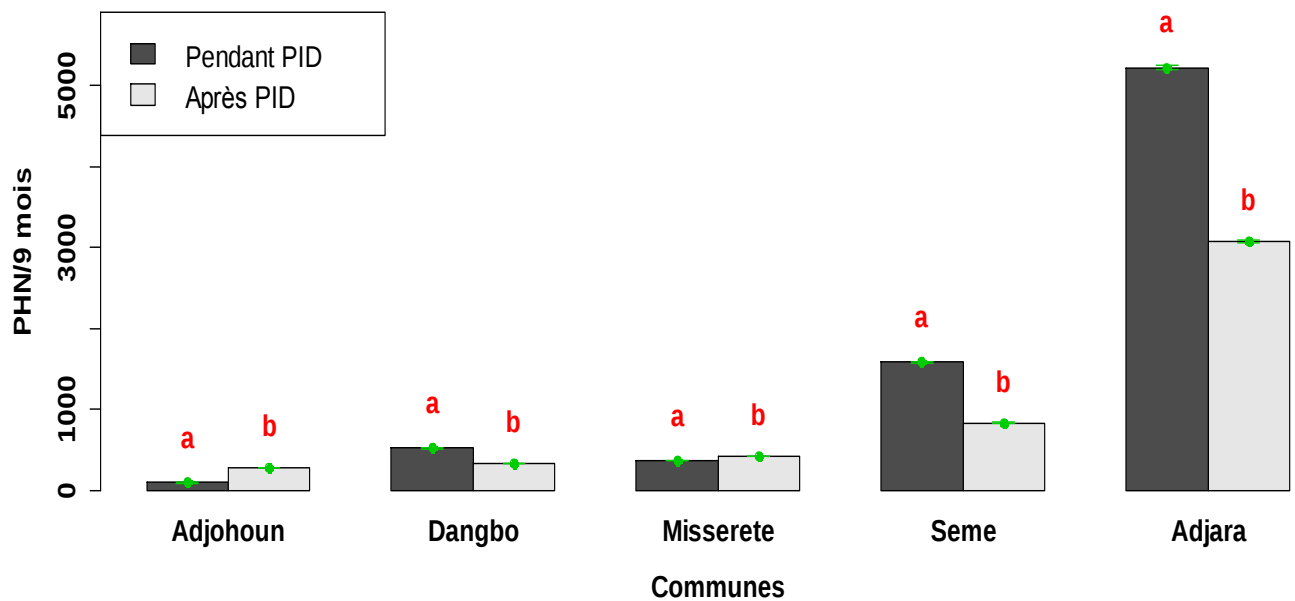
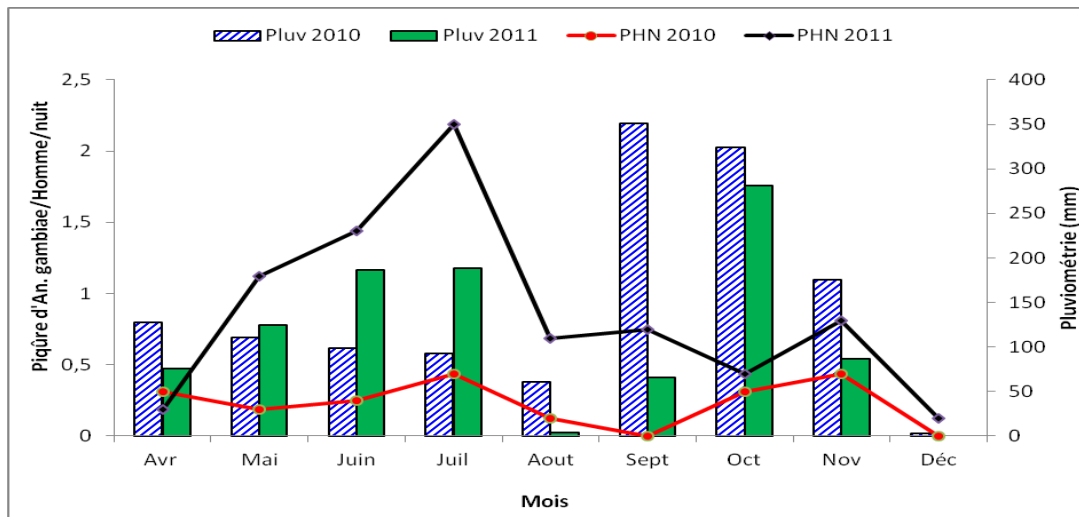


Figure 29 : Taux de piqûre sur homme de *An. gambiae* observé pendant la campagne PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans **les zones centrales (A)** et **les zones périphériques (B)** des différentes communes (Les PHN portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p > 0,05$)

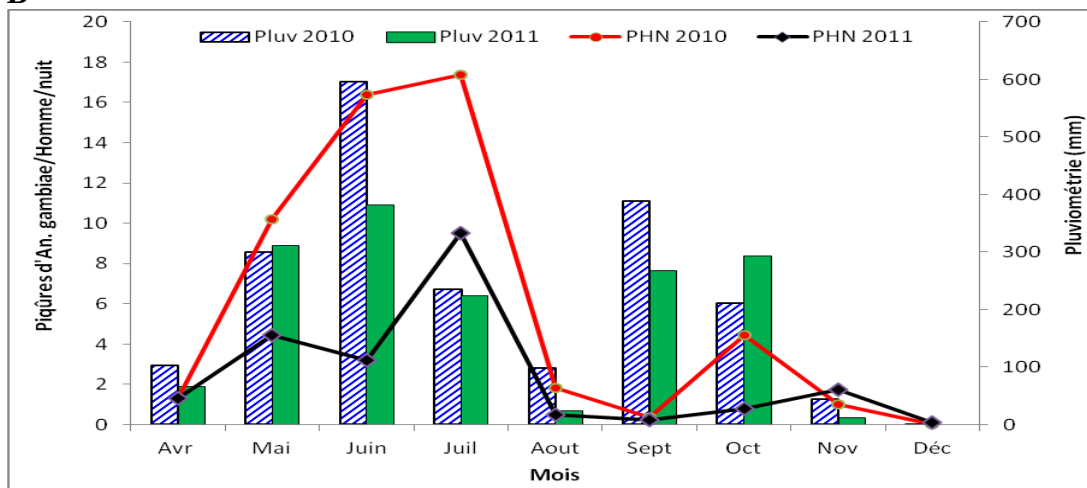
1.2.2. Pluviométrie, un facteur déterminant du contact homme-vecteur

Les résultats de capture sur homme montrent que les fortes densités anophéliennes (figure 30) ont été observées au cours de la grande saison pluvieuse (avril- juillet) et de la petite saison (octobre-novembre) dans les zones d'étude. La diminution du taux de piqûres de *An. gambiae* constaté après l'arrêt de la PID à Sèmè contrairement aux autres communes est due à des hauteurs de pluies plus élevées en 2010 qu'en 2011 (figure 30). C'est ce qui explique la variation du taux de piqûre de *An. gambiae* de 1,31 à 17,38 piqûres/homme/nuit en juillet 2010 contre 1,31 à 9,5 en juillet 2011 (après arrêt de la PID) (figure 30B). Par ailleurs, à Adjohoun pendant la même période, les précipitations enregistrées par l'ASECNA en 2011 sont supérieures à celles de 2010 (figure 30A). En revanche, le PHN obtenu en 2011 (après arrêt de la PID) est supérieur à celui enregistré en 2010 (pendant l'intervention) (0,19 à 2,18 en juillet 2011 contre 0,31 à 0,44 en juillet 2010).

A



B



C

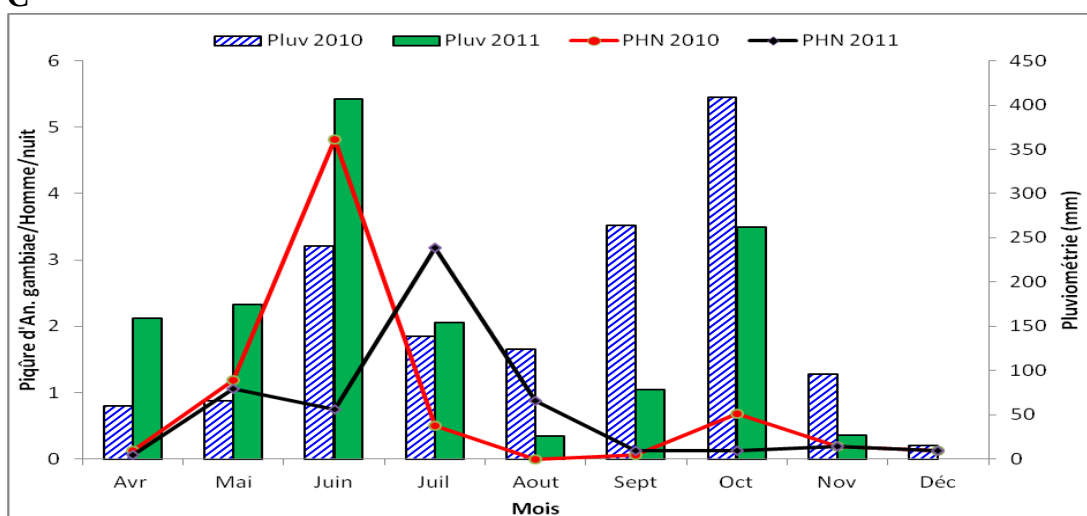


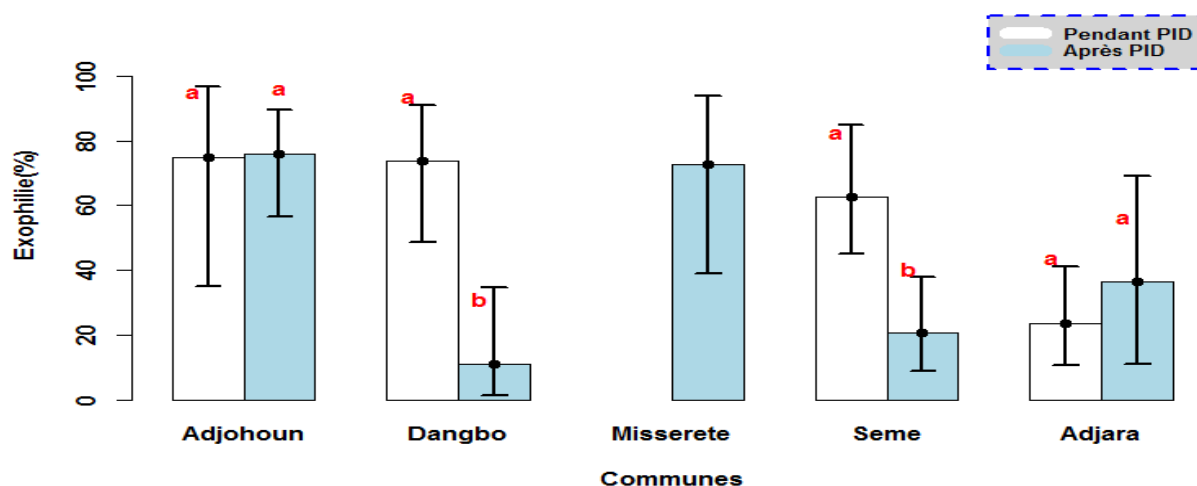
Figure 30: Variation de la densité agressive de *An. gambiae* s.l en fonction de la pluviométrie à Adjohoun (A), Sèmè (B) et à Dangbo (C).

1.2.3. Réduction de l'exophilie après l'arrêt de la PID chez *An. gambiae*

La figure 31 montre l'exophilie de *An. gambiae* pendant la période d'intervention et après l'arrêt de la pulvérisation intradomiciliaire.

Dans la commune de Adjohoun, le degré d'exophilie n'a pas varié après arrêt de la PID. En revanche, à Dangbo, Missérété et Sèmè, une baisse significative a été observée après arrêt de la PID dans toutes les zones ($p < 0,001$) (Figure 31A et B). Le taux d'exophilie est passé de 72,92% pendant la PID à 43,83% après arrêt de la PID à Dangbo. A Missérété, l'exophilie a été de 80% pendant la période d'intervention contre 31,48 % après l'arrêt de l'intervention. De la même façon, à Sèmè, l'exophilie a chuté de 78,72% pendant la PID à 21,74% après arrêt de l'intervention.

A



B

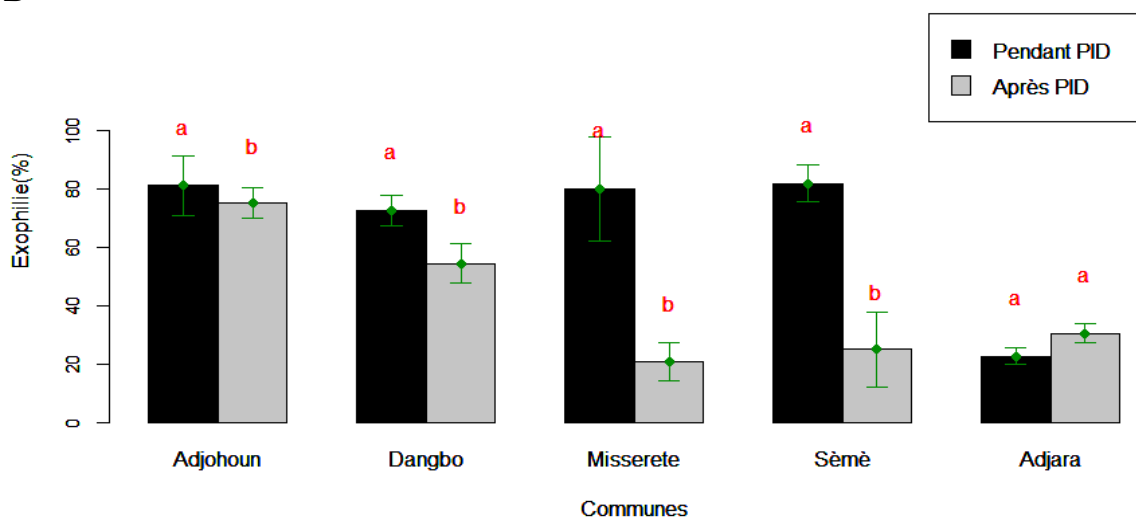


Figure 31 : Taux d'exophilie de *An. gambiae* observé pendant la campagne PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans **les zones centrales (A)** et **les zones périphériques (B)** des différentes communes. (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p > 0,05$)

1.2.4. Augmentation de la longévité des anophèles après l'arrêt de la PID

Au total, 1681 anophèles vecteurs ont été disséqués en vue de la détermination de leur âge physiologique. La proportion de moustiques femelles ayant pondu au moins une fois a été significativement élevée en général après l'arrêt de la PID quelle que soit la commune (OR=3,81 ; $p<0,001$). Pendant la période d'intervention, le taux de parturité de *An gambiae* observé à Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè a été respectivement de 40%, 42,42%, 40% et 44,60%. Après l'arrêt de l'intervention, les taux observés sont devenus plus élevés : respectivement 91,61%, 87,72%, 93,02% et 82,83% (figure 32).

Dans la zone témoin, la parturité est la même pendant les deux périodes (OR=1,13 ; $p=0,54$).

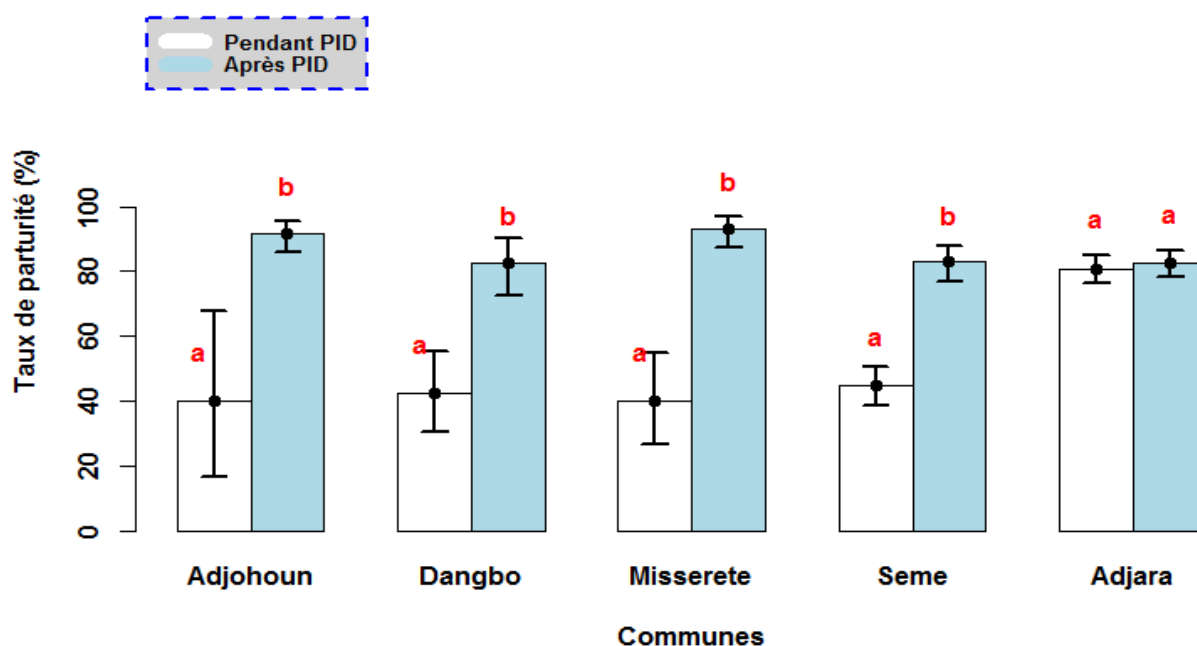


Figure 32 : Taux de parturité de *Anopheles gambiae* observé durant la mise en œuvre de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les différentes communes de l'Ouémé. (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p>0,05$)

1.2.5. Augmentation du taux de gorgement des moustiques à l'intérieur des maisons après l'arrêt de la PID

Le taux de gorgement de *An gambiae* a été respectivement de 0%, 9,09%, 25% et 36,96% dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè pendant la période d'intervention (figure 33). Ce taux a été significativement plus élevé après l'arrêt de l'intervention dans toutes les communes (OR=1,48 ; $p<0,001$) (46,08% à Adjohoun, 60,27% à Dangbo, 81,48% à Missérété et 82,61% à Sèmè).

Chez l'ensemble des moustiques, on obtient le même phénomène: le taux de gorgement obtenu après l'arrêt de la PID a été significativement plus élevé que celui enregistré pendant la PID dans les communes de Dangbo, Missérété et Sèmè (OR= 1,65 ; $p< 0,001$). Par contre, dans la commune de Adjohoun, aucune différence significative n'a été observée entre les taux de gorgement des deux périodes (OR=0,93 ; $p=0,64$) (figure 34).

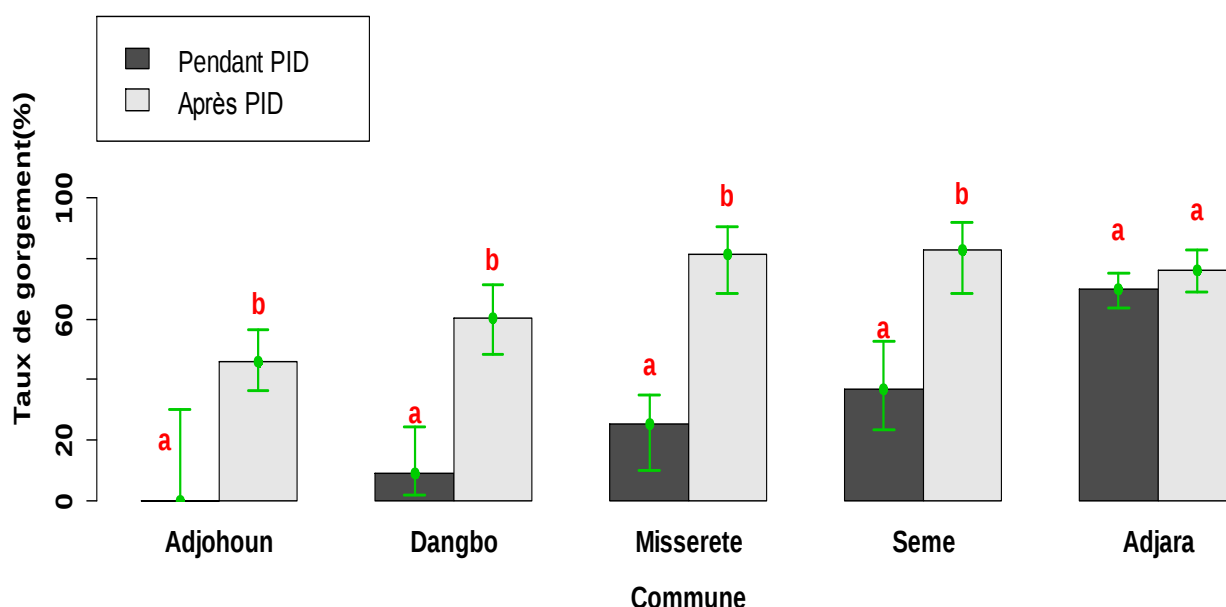


Figure 33 : Taux de gorgement de *Anopheles gambiae* observé durant la mise en œuvre de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les différentes communes de l'Ouémé (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p>0,05$)

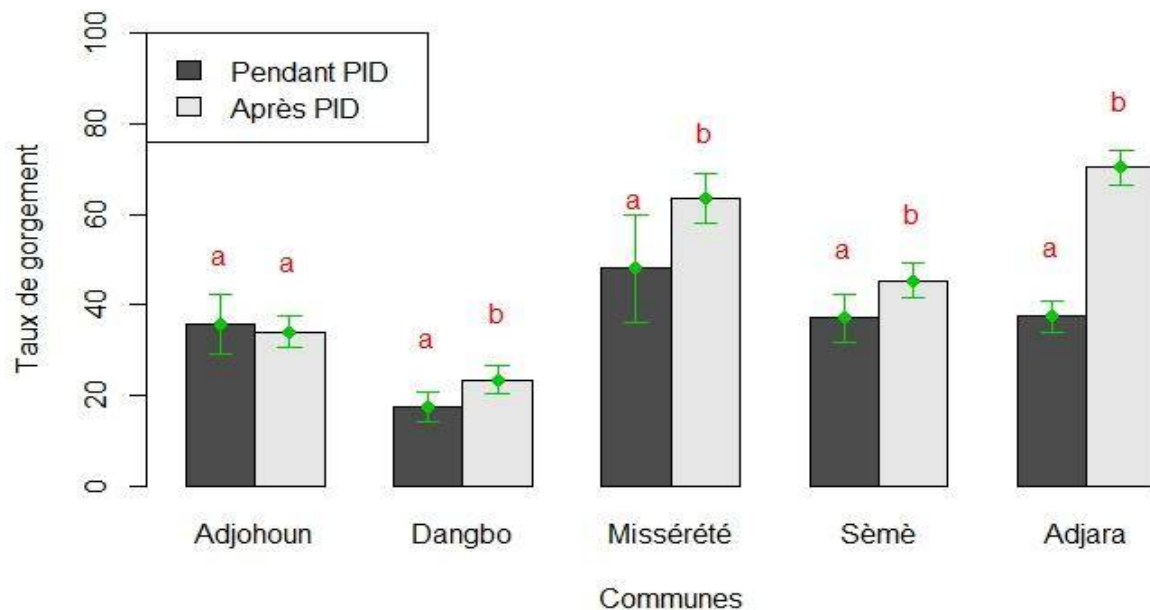


Figure 34 : Taux de gorgement des Culicidae observé durant la mise en œuvre de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les différentes communes de l'Ouémé. (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p>0,05$)

1.3. Impact de l'arrêt de la PID sur le taux d'inoculation entomologique (TIE) dans les zones sous intervention PID

Pendant la période PID, 493 têtes-thorax de *An. gambiae* ont été soumis à l'ELISA CSP parmi lesquels 10 ont été positifs au *P. falciparum*. L'indice sporozoïtique (Is) moyen est de 0,02. Parmi ces 10 positifs, 9 ont été collectés en avril et mai durant la 3^{ème} campagne de la PID. Seulement 1 moustique infecté a été capturé durant le 4^{ème} tour de la PID (tableau XI).

Par contre, après l'arrêt de la PID, 20 têtes thorax ont été positifs sur 688 moustiques testés, soit un Is=0,029 (tableau XI). On note ainsi une augmentation non significative de l'infectivité au *P. falciparum* après l'arrêt de la PID ($p=0,330$).

Lorsqu'on ne considère pas les moustiques infectés collectés en avril 2010 au début du 3^{ème} tour de la PID, les résultats montrent qu'un seul anophèle sur 159 est infecté pendant la PID (Is=0,0063) et 4 sur 195 après l'arrêt de la PID (Is=0,021) entre août et décembre, d'où une augmentation non significative de l'infectivité après l'arrêt de la PID ($p=0,233$).

Dans la zone témoin (Adjara), l'indice sporozoïtique est élevé pendant les deux périodes : 0,091 (32/351) en 2010 et 0,039 (31/790) en 2011.

Pendant la période de la PID, chaque habitant des 4 communes recevait une moyenne de 13,11 piqûres infectées pour une période de 9 mois (avril-décembre 2010). Après arrêt de la PID, un taux similaire a été obtenu : 10,40 piqûres infectées pour la même période (tableau XI). Dans les communes de Adjohoun et de Missérété, le TIE obtenu après arrêt de la PID est significativement différent de celui obtenu pendant la PID (9,015 piqûres infectées/homme à Adjohoun après PID contre 3,66 pendant la PID). A Missérété, 15,08 piqûres infectées/homme sont observées après arrêt de la PID contre 2,41 pendant la PID. Par contre, dans les communes de Sèmè et de Dangbo, on note une baisse du TIE après arrêt de la PID (tableau XI).

Tableau XI : Taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. gambiae* observé pendant la campagne PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans le département de l'Ouémé

A) Commune de Adjohoun

		Pendant la PID (avril-décembre 2010)					Après arrêt de la PID (avril-décembre 2011)					IDR 95% IC	Comparaison TIE/période
		3ème campagne de la PID (avril-juillet)	4ème campagne de la PID (août-décembre)	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période	avril- juillet	août- décembre	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période		
Adjohoun centrale	Thorax	4	4	8			25	16	41				
	Thorax+	0	0	0			1	0	1				
	Is	0	0	0	0	0	0,04	0	0,02	0,58	5,20	∞	p<0,001
	PHN/nuit	0,14	0,14	0,14			1,16	0,44	0,78				
	TIE	0	0	0			0,04	0	0,02				
Adjohoun périphérique	Thorax	15	10	25			39	27	66				
	Thorax+	2	0	2			2	1	3				
	Is	0,13	0	0,08	0,81	7,33	0,05	0,04	0,05	1,43	12,83	1,75[1,72-1,78]	p<0,001
	PHN/nuit	0,54	0,14	0,34			1,31	0,78	1,03				
	TIE	0,07	0	0,03			0,07	0,03	0,05				
Adjara centrale	Thorax	44	83	127			15	2	17				
	Thorax+	3	6	9			2	0	2				
	Is	0,07	0,07	0,07	10,67	96,01	0,13	0	0,12	0,9	8,1	0,08[0,04-0,17]	p<0,001
	PHN/nuit	6,57	3,46	5,02			0,44	0,08	0,25				
	TIE	0,45	0,25	0,36			0,06	0	0,03				
Adjara périphérique	Thorax	120	104	224			516	257	773				
	Thorax+	14	9	23			23	6	29				
	Is	0,12	0,09	0,10	59,57	536,15	0,04	0,02	0,04	13,8	124,2	0,23[0,19-0,28]	p<0,001
	PHN/nuit	32,86	5,82	19,34			16,13	7,19	11,40				
	TIE	3,83	0,50	1,99			0,61	0,17	0,46				

Thorax += thorax positif Is= indice sporozoïtique PHN= piqûre par homme et par nuit TIE = taux d'inoculation entomologique IDR: Incidence Density Ratio

B) Commune de Dangbo

		Pendant la PID (avril-décembre 2010)					Après arrêt de la PID (avril-décembre 2011)					IDR 95% IC	Comparaison TIE/période
		3ème campagne PID (avril-juillet)	4ème campagne PID (août-décembre)	Total (avril-décembre)	TIE/mois	TIE/période	avril- juillet	août- décembre	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période		
Dangbo centrale	Thorax	13	2	15			11	9	20				
	Thorax+	0	0	0			0	0	0				
	Is	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,00	p=1
	PHN/nuit	0,46	0,07	0,27			0,34	0,25	0,29				
	TIE	0	0	0			0	0	0				
Dangbo périphérique	Thorax	93	14	107			48	17	65				
	Thorax+	3	1	4			0	1	1				
	Is	0,03	0,07	0,04	2,14	19,28571	0	0,06	0,02	0,58	5,23	0,27[0,27-0,28]	p<0,001
	PHN/nuit	3,32	0,5	1,91			2,19	0,36	1,22				
	TIE	0,11	0,04	0,07			0	0,02	0,02				
Adjara centrale	Thorax	44	83	127			15	2	17				
	Thorax+	3	6	9			2	0	2				
	Is	0,07	0,07	0,07	10,67	96,01	0,13	0	0,12	0,9	8,1	0,08[0,04-0,17]	p<0,001
	PHN/nuit	6,57	3,46	5,02			0,44	0,08	0,25				
	TIE	0,45	0,25	0,36			0,06	0	0,03				
Adjara périphérique	Thorax	120	104	224			516	257	773				
	Thorax+	14	9	23			23	6	29				
	Is	0,12	0,09	0,10	59,57	536,15	0,04	0,02	0,04	13,8	124,2	0,23[0,19-0,28]	p<0,001
	PHN/nuit	32,86	5,82	19,34			16,13	7,19	11,40				
	TIE	3,83	0,50	1,99			0,61	0,17	0,46				
Thorax += thorax positif		Is= indice sporozoïtique	PHN= piqûre par homme et par nuit			TIE = taux d'inoculation entomologique			IDR: Incidence Density Ratio				

C) Commune de Missérété

		Pendant la PID (avril-décembre 2010)					Après arrêt de la PID (avril-décembre 2011)					IDR 95% IC	Comparaison TIE/période
		3ème campagne PID (avril-juillet)	4ème campagne PID (août-décembre)	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période	avril- juillet	août- décembre	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période		
Misserete centrale	Thorax	12	5	17			38	16	54				
	Thorax+	0	0	0			1	0	1				
	Is	0	0	0	0	0	0,03	0	0,02	0,34	3,09	∞	p<0,001
	PHN/nuit	0,43	0,18	0,30			0,84	0,42	0,62				
	TIE	0	0	0			0,02	0	0,01				
Misserete périphérique	Thorax	44	32	76			45	58	103				
	Thorax+	1	0	1			4	2	6				
	Is	0,02	0	0,01	0,54	4,82	0,09	0,03	0,06	3,01	27,07	5,61[5,53-5,69]	p<0,001
	PHN/nuit	1,57	1,14	1,36			1,66	1,47	1,56				
	TIE	0,04	0	0,02			0,15	0,04	0,10				
Adjara centrale	Thorax	44	83	127			15	2	17				
	Thorax+	3	6	9			2	0	2				
	Is	0,07	0,07	0,07	10,67	96,01	0,13	0	0,12	0,9	8,1	0,08[0,04-0,17]	p<0,001
	PHN/nuit	6,57	3,46	5,02			0,44	0,08	0,25				
	TIE	0,45	0,25	0,36			0,06	0	0,03				
Adjara périphérique	Thorax	120	104	224			516	257	773				
	Thorax+	14	9	23			23	6	29				
	Is	0,12	0,09	0,10	59,57	536,15	0,04	0,02	0,04	13,8	124,2	0,23[0,19-0,28]	p<0,001
	PHN/nuit	32,86	5,82	19,34			16,13	7,19	11,40				
	TIE	3,83	0,50	1,99			0,61	0,17	0,46				
Thorax += thorax positif		Is= indice sporozoïtique		PHN= piqûre par homme et par nuit		TIE = taux d'inoculation entomologique		IDR: Incidence Density Ratio					

D) Commune de Sèmè

		Pendant la PID (avril-décembre 2010)					Après arrêt de la PID (avril-décembre 2011)					IDR 95% IC	Comparaison TIE/période
		3ème campagne PID (avril-juillet)	4ème campagne PID (août-décembre)	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période	avril- juillet	août- décembre	Total (avril- décembre)	TIE/mois	TIE/période		
Sèmè centrale	Thorax	80	58	138			121	9	130				
	Thorax+	2	0	2			6	0	6				
	Is	0,03	0	0,01	4,03	36,27	0,05	0	0,06	2,87	25,85	0,71[0,71-0,72]	p<0,001
	PHN/nuit	16,36	2,18	9,27			4,03	0,31	2,06				
	TIE	0,41	0	0,13			0,20	0	0,10				
Sèmè périphérique	Thorax	73	34	107			166	43	209				
	Thorax+	1	0	1			2	0	2				
	Is	0,01	0	0,01	1,64	14,73	0,01	0	0,01	0,83	7,44	0,5[0,5-0,51]	p<0,001
	PHN/nuit	9,50	2,18	5,84			5,19	1,19	3,07				
	TIE	0,13	0	0,05			0,06	0	0,03				
Adjara centrale	Thorax	44	83	127			15	2	17				
	Thorax+	3	6	9			2	0	2				
	Is	0,07	0,07	0,07	10,67	96,01	0,13	0	0,12	0,9	8,1	0,08[0,04-0,17]	p<0,001
	PHN/nuit	6,57	3,46	5,02			0,44	0,08	0,25				
	TIE	0,45	0,25	0,36			0,06	0	0,03				
Adjara périphérique	Thorax	120	104	224			516	257	773				
	Thorax+	14	9	23			23	6	29				
	Is	0,12	0,09	0,10	59,57	536,15	0,04	0,02	0,04	13,8	124,2	0,23[0,19-0,28]	p<0,001
	PHN/nuit	32,86	5,82	19,34			16,13	7,19	11,40				
	TIE	3,83	0,50	1,99			0,61	0,17	0,46				

Thorax += thorax positif Is= indice sporozoïtique PHN= piqûre par homme et par nuit TIE = taux d'inoculation entomologique

2. Discussion

Plusieurs espèces de moustiques ont été rencontrées lors des deux années d'étude. En dehors de quelques variations, les proportions récoltées en 2010 sont les mêmes que celles retrouvées en 2011 après l'arrêt de la PID. Les pourcentages retrouvés sont similaires à ceux indiqués par Padonou *et al.* (2011) en 2009.

Après l'arrêt de la PID et malgré le remplacement de cette intervention par la distribution des moustiquaires imprégnées à la population de l'Ouémé, on a assisté à une augmentation des indicateurs de la transmission du paludisme.

L'étude a montré que les inquiétudes des populations relatives à une éventuelle augmentation des densités de moustiques après l'arrêt de la PID sont justes. L'agressivité anophélienne exprimée dans ce travail en termes de piqûres de *An. gambiae* par homme par nuit (PHN) a augmenté entre les deux périodes dans trois des quatre communes précédemment sous PID (Adjohoun, Dangbo et Missérété). La forte valeur de PHN notée à Sèmè en 2010 comparativement à 2011 s'explique par le fait que, en 2010, les pluies étaient très fortes, ce qui s'était soldé par de grandes quantités d'eau qui ont permis la formation de beaucoup de gîtes larvaires d'anophèles dans cette commune. Cette forte pluviométrie n'a pas été observée dans les autres communes. La diminution du taux de piqûre après l'arrêt de la PID qui a également été observée dans la zone témoin (Adjara), s'explique par la même raison, à savoir, la pluviométrie (hauteur d'eau et nombre de jours de pluie) plus forte en 2010 qu'en 2011. En conclusion, le remplacement de la PID par la couverture universelle des MIILD n'a pas permis de maintenir le taux de piqûres à son niveau initial. Par ailleurs, *An. funestus* qui avait disparu lors de la campagne PID a réapparu après l'arrêt de cette intervention à Missérété. Toutefois, cela pourrait signifier qu'en réalité, *An. funestus* n'était pas entièrement éliminé de la zone PID. Certaines populations de *An. funestus* ont dû résister à la PID, peut être parce qu'elles sont plus exophiles, mais probablement de très faibles proportions. Ainsi, la probabilité de capturer un spécimen avec seulement deux séances de captures par mois est très faible sans oublier qu'il s'agit d'une espèce qu'on ne rencontre pas à toutes les saisons. Le deuxième facteur relatif à la réapparition de *An. funestus* est le phénomène de migration. Une migration passive ou active peut déplacer cette espèce de zones plus lointaines dans le secteur où elle avait disparu.

Malgré la diminution du taux de piqûre des anophèles à Sèmè après l'arrêt de la PID, la situation de cette commune doit être sérieusement examinée. Sèmè est caractérisé par la présence de nombreux gîtes de reproduction (gîtes temporaires, semi-permanents et

permanents) et une grande abondance de moustiques. Cette zone est celle dont le taux de piquûre a été considéré comme relativement élevé en dépit de la mise en œuvre de la PID en 2009 et 2010 (Padonou *et al.*, 2011).

Le niveau de transmission a augmenté dans les communes après l'arrêt de la PID. A Adjohoun et à Missérété, le taux d'inoculation entomologique obtenu après arrêt de la PID a été significativement plus élevé que celui obtenu au cours de l'intervention. Cette variation du niveau de transmission est due au taux élevé de piquûres de *An. gambiae* et à un indice de CSP relativement élevé enregistrés après l'arrêt de l'intervention.

Comparativement aux données obtenues à Adjohoun, Dangbo et Missérété, le niveau de transmission du paludisme est très élevé à Sèmè pendant les 2 périodes. Mais le TIE dans cette zone après l'arrêt de la PID est inférieur à celui enregistré pendant la PID. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'après l'arrêt de la PID, et compte tenu de la forte nuisance culicidienne dans cette zone, les populations se sont appropriées l'outil de lutte antivectorielle mis à leur disposition (les MIILD). En effet, après l'arrêt de la PID, l'utilisation des MIILD a donné de bons résultats en termes de réduction de la transmission dans cette zone de forte agressivité anophélienne. Ceci confirme les travaux de Kelly-Hope *et al.* (2008) et de Akogbéto *et al.* (2011). De plus, les résultats des travaux réalisés en Afrique ont montré que la lutte antivectorielle par utilisation généralisée des MIILD est une stratégie qui peut réduire la morbidité palustre de 50 à 60% et la mortalité générale de 20% (Alonso *et al.*, 1993; D'Alessandro *et al.*, 1995; Binka *et al.*, 1996).

La présence des moustiquaires Olyset dans les maisons après l'arrêt de la PID n'a pas augmenté le taux de sortie de *An. gambiae* et de *Culex spp.* Ces résultats montrent que l'effet excito-répulsif de la perméthrine sur *An. gambiae* ne s'est pas manifesté probablement en raison de la résistance de ce vecteur aux pyréthrinoïdes. Ces résultats rappellent ceux de N'Guessan *et al.* (2007) qui ont montré qu'une baisse d'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes s'est amorcée dans les populations résistantes du Bénin.

Au cours de l'étude, une attention particulière a été apportée à la rémanence du bendiocarb. Deux semaines après la pulvérisation et cela pendant les quatre tours de la PID, tous les moustiques (la souche Kisumu et la souche sauvage locale) exposés sur les murs traités sont morts dans les 24 heures indépendamment de la position du cône sur les murs (en bas, au milieu ou en haut), ce qui indique l'efficacité et l'homogénéité de la pulvérisation. La formation des agents pulvérisateurs a été donc un succès. Après le quatrième mois, les taux de mortalité enregistrés sur les murs en banco non crépis sont descendus en dessous du seuil d'efficacité (80%) au 1^{er} et au 2^{ème} tour de la pulvérisation chez les deux souches selon les

travaux de Padonou (2012). Cependant, au troisième et au quatrième tour, l'efficacité de la pulvérisation est complète sur la souche Kisumu quel que soit le support, et partielle sur la souche résistante de terrain. Une observation similaire a été faite par Nguena au Cameroun en 2010. Cet auteur a montré que l'effet de l'insecticide sur la mortalité des anophèles lors des aspersions dépend du type de mur traité (Nguena Nguefack, 2010).

La variation de la rémanence du bendiocarb notée dans cette étude en fonction de la nature des supports avait été observée lors d'une étude en Inde et au Bénin sur des supports imprégnés (Elliott *et al.*, 1978; Ansari & Razdan, 2004). Cette variation s'explique probablement par la différence de porosité des différents supports utilisés. En effet, les supports n'absorberaient pas la solution insecticide de la même façon et la biodisponibilité du bendiocarb sur les supports ne serait donc pas la même au cours du temps. La faible efficacité du bendiocarb sur le banco et le ciment serait due à la grande porosité de ces supports. Le bendiocarb pulvérisé pénètre probablement en profondeur dans le mur et sa concentration à la surface devient faible. De plus, le ciment est basique, car contient du calcaire et la demi-vie du bendiocarb diminue lorsque le pH augmente. Toutefois une autre étude menée en Mozambique a montré que les surfaces traitées n'affectent pas la rémanence du bendiocarb (Maharaj *et al.*, 2004).

L'efficacité du bendiocarb après le 4^{ème} tour est plus élevée que celle notée après le 1^{er} et le 2^{ème} tour (Padonou, 2012), montrant que plus le nombre de traitement augmente, l'efficacité du bendiocarb est meilleure. Ces résultats sont similaires à ceux de Coosemans à Bobo-Dioulasso qui a montré que la rémanence se trouve nettement améliorée avec un second traitement insecticide (Coosemans & Sales, 1978). Dans notre étude, au quatrième tour de la PID, l'effet résiduel du bendiocarb a été enregistré jusqu'à sept mois sur la souche sensible Kisumu avec des taux de mortalité allant de 91,1% (murs en ciment non crépis) à 83,9% (murs en banco non crépis). Pour *An. gambiae* récolté sur le terrain, au-delà du sixième mois, tous les taux de mortalité étaient inférieurs au seuil d'efficacité.

L'efficacité du bendiocarb sur la souche sensible de *An. gambiae* Kisumu a été la même comparée à la population sauvage. Cela s'explique par le fait que le bendiocarb agit sur l'acétylcholinestérase. Or la fréquence de la mutation *Ace-1^R* des populations de *An. gambiae* est très faible voire nulle (<1%) dans le département de l'Ouémé. Par ailleurs, il n'existe pas de mécanisme métabolique de résistance aux carbamates au sein des populations sauvages ayant servi aux bioessais (Corbel *et al.*, 2007).

La décision de l'Etat béninois de réaliser une étude sur l'évolution des indicateurs entomologiques comme mesure d'accompagnement pour apaiser les populations de l'Ouémé après l'arrêt de la pulvérisation intradomiciliaire est juste. S'il est impératif que la mise en œuvre d'une stratégie de lutte doit être accompagnée d'un suivi-évaluation, l'arrêt brusque ou l'abandon d'une intervention de lutte pour une raison quelconque doit être également accompagné d'une étude pour mesurer les conséquences. L'exemple de la pulvérisation intradomiciliaire est édifiant. En effet, la PID est une stratégie chère et difficile à organiser qui bénéficie, aujourd'hui, en Afrique, de l'aide des partenaires financiers. Après le départ desdits partenaires, la poursuite des activités constitue un problème pour l'économie des pays africains. C'est ce qui s'est passé dans l'Ouémé où, après le déplacement de la PID dans un autre département, l'opération s'est arrêtée. Mais l'état béninois a vu juste en initiant une étude sur les indicateurs entomologiques après l'arrêt de la PID pour mesurer les conséquences et surtout vérifier si la couverture universelle des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action proposée à la population de l'Ouémé comme mesure alternative est efficace.

3. Conclusion

La présente étude a montré que les inquiétudes des populations relatives à une éventuelle augmentation des densités de moustiques après l'arrêt de la PID sont justifiées. Le souhait du Programme National de Lutte contre le Paludisme qui consistait à calmer ces inquiétudes après l'arrêt de la PID en mettant gratuitement à disposition de la population des moustiquaires imprégnées a été réalisé mais sans maintenir les indicateurs entomologiques à leur niveau initial. La plupart de ces indicateurs ont connu un rebond. Dans les communes de Adjohoun, de Dangbo et de Missérété, le taux de piqûres des anophèles a augmenté. Toutefois, à Sèmè, ce taux a plutôt diminué. Cette diminution qui a également été observée dans la zone témoin (Adjara), est due aux phénomènes climatiques. *An. gambiae* S, jamais rencontré auparavant dans l'Ouémé a fait son apparition. *An. funestus* qui avait disparu lors de la campagne PID a réapparu après l'arrêt de cette intervention à Missérété. Mais cette réapparition pourrait être liée à un phénomène de migration passive ou active qui pourrait déplacer cette espèce de zones plus lointaines dans le secteur où elle avait disparu. L'arrêt de la PID a été également marqué par une augmentation du TIE dans 3 des 4 communes, une diminution de l'exophilie et une augmentation de la longévité des anophèles.

Chapitre 6:

Résistance des vecteurs aux insecticides après l'arrêt de la PID : évolution et signification opérationnelle: mesure de quelques paramètres indirects d'impact de la résistance. Relation entre le portage des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* et la présence de l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum* chez *An. gambiae s.s*

La dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides a été considérée comme un aspect important dans notre étude. Plusieurs études récentes ont montré que l'utilisation massive d'insecticides surtout en milieu agricole a entraîné l'apparition des souches résistantes aux insecticides au sein des populations vectrices (Akogbéto & Yakoubou, 1999; Diabaté *et al.*, 2001). Cette résistance des vecteurs aux insecticides est principalement due à une mutation génétique de cible : la mutation *Kdr*. Par ailleurs, d'autres auteurs ont noté une augmentation rapide de cette mutation après une distribution et une utilisation massives des MIILD (Stump *et al.*, 2004; Czeher *et al.*, 2008) et suite à une grande campagne de PID (Reimer *et al.*, 2005). L'évolution de la résistance aux insecticides étant un phénomène de temps, il n'est pas exclu que, quelques années après la PID dans l'Ouémé, que la résistance se développe (**Article 4 et 9**). La mutation *Kdr* conduit à la fois à la réduction de l'effet de choc « knock-down » et de l'effet létal des pyréthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires (Chandre *et al.*, 1999b; Corbel *et al.*, 2004). Les travaux de Weill *et al.* (2000) et de Fanello *et al.* (2001) en Afrique de l'ouest ont montré la présence de la mutation *Kdr* seulement chez la forme moléculaire S de *An. gambiae* s.s. Au Bénin, la mutation a été détectée aussi bien chez la forme moléculaire S que chez la forme M de *An. gambiae* s.s. (Akogbéto, 2001; Djènotin *et al.*, 2010) avec une fréquence allélique très élevée (Djègbè *et al.*, 2011). La résistance aux carbamates et aux organophosphorés, due à la substitution de la glycine par la sérine en position 119 (G119S) du gène codant pour l'acétylcholinestérase 1 (ace-1) (Weill *et al.*, 2003a) a été également signalé chez *An. gambiae* s.s. en Afrique de l'Ouest (Weill *et al.*, 2004; Djogbénou *et al.*, 2008). Cette mutation G119S est retrouvée en association avec la résistance chez les formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s (Alou *et al.*, 2010).

Dans une étude récente (Gnanguènon, com. pers.), il a été montré que les individus de *An. gambiae* porteurs du gène de résistance *Kdr*, en particulier les génotypes RR, sont plus aptes à traverser les trous des moustiquaires imprégnées par rapport aux sensibles SS. Toutefois, cette observation a été faite sur un effectif de moustiques faible, c'est pourquoi l'auteur suggère de poursuivre l'étude sur un échantillon plus important et dans d'autres localités. Cependant, cette observation suggère l'idée d'un avantage conféré par le portage du gène de résistance *Kdr*. Cet avantage se justifie par le fait que les moustiques résistants réussissent à garder un contact plus long avec les moustiquaires imprégnées malgré l'effet excito-répulsif de l'insecticide d'imprégnation.

Par ailleurs, l'impact de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides sur l'efficacité des outils de lutte antivectorielle a été montré en cas expérimentales (N'Guessan

et al., 2007). Toutefois, cet impact n'a pas été encore observé à l'échelle opérationnelle (Henry *et al.*, 2006). Si la résistance a un impact sur les opérations de lutte antivectorielle, alors les moustiques résistants pourraient être plus infectés que les moustiques sensibles dans les zones où la pression de sélection par MIILD ou PID est forte. En effet, les moustiques résistants sont sensés appartenir à un groupe d'âge plus ancien étant entendu que les anophèles sensibles sont plus exposés à l'action létale des matériaux imprégnés.

Dans la présente étude, nous avons évalué l'impact de la résistance sur la transmission du paludisme chez les deux formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. et génotypes *Kdr* associés. Nous avons alors recherché la présence de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* chez des femelles de *An. gambiae* capturées dans plusieurs localités du Bénin. Les femelles porteuses de sporozoïtes sont ensuite génotypées et comparées à des échantillons témoins non infectés issus de la même population. Un tableau de contingence a montré si le risque de l'infection est associé à la forme (M/S) et au génotype de résistance (**article 5**).

Les données détaillées de cette partie de la thèse sont publiées dans les **articles 4 et 5**, mais nous reprenons ici les points essentiels relatifs aux résultats et à la discussion.

Article 4: Padonou GG, Sèzonlin M, **Ossè R**, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbéto M. Impact of three years of large scale of indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions on the insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasit Vectors* 2012, 5:72.

Article 5: **Ossè R**, Gnanguenon V, Sèzonlin M, Aïkpon R, Padonou G, Yadouléon A, Akogbéto MC. Relationship between the presence of *Kdr* and *Ace-1* mutations and infection with *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s. in Benin. *J Parasitol Vector Biol* 2012, 4(3): 31-39.

Article 9: Bendiocarb resistance selection pressure: what happen after his massive use for IRS in areas under universal coverage of LLINs in southern Benin? (En cours de rédaction)

1. Résultats

1.1. Surveillance de la résistance de *An. gambiae* aux insecticides dans les différentes communes après l'arrêt de la PID

1.1.1. Evolution de la résistance des vecteurs aux insecticides

En 2010 et 2011, pendant la période de pulvérisation intradomiciliaire, trois enquêtes sur la sensibilité de *An gambiae* ont été organisées. Au total, 4364 moustiques ont été mis au contact de divers papiers imprégnés d'insecticide : perméthrine à 0,75%, deltaméthrine à 0,05%, DDT à 4% et bendiocarb à 0,1%. Les résultats des tests de sensibilité montrent que :

a) Avec la perméthrine

Toutes les populations de *An. gambiae* (Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè) étaient résistantes à la perméthrine 0,75% en 2010 (figure 35A, B, C et D). En novembre 2011, cette résistance a été également observée, mais le niveau a baissé dans toutes les communes : Adjohoun (74,60% contre 11% en 2010), Dangbo (65% contre 16,92% en 2010) et Missérété (65,59% contre 16,12% en 2010). Mieux, à Sèmè et Adjara on est passé d'une forte résistance à une suspicion de résistance (figure 35D et E). La baisse de niveau de résistance entre les deux périodes est significative ($p < 0,05$) (figure 35).

b) Avec le DDT

Une forte résistance a été enregistrée vis-à-vis du DDT 4% pendant toute la période de la PID et après PID dans toutes les communes (figure 35).

c) Avec la deltaméthrine

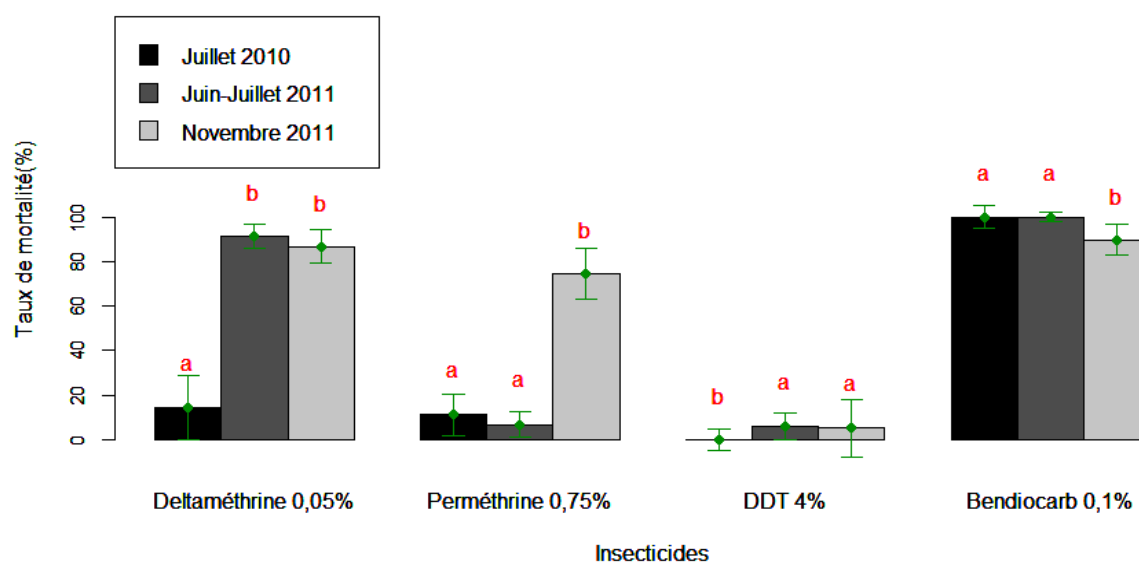
Avant 2010, *An gambiae* était entièrement sensible à la deltaméthrine dans toutes les communes. Mais à partir de 2010-2011, les tests de sensibilité effectués ont montré une baisse du niveau de sensibilité de *An gambiae* vis-à-vis de cet insecticide. Par ailleurs, le niveau de sensibilité des moustiques récoltés en 2011 est significativement plus élevé de celui enregistré en 2010 ($p < 0,05$) (figure 35 A, C, D et E). Par contre, dans la commune de Dangbo, aucune différence significative n'a été observée ($p > 0,05$) (figure 35 B).

L'émergence de la résistance de *An. gambiae* à la deltaméthrine en 2010-2011 a été observée non seulement dans les zones précédemment sous PID mais aussi dans la zone témoin et dans le nord Bénin (Atacora) (Aïkpon, com. pers.).

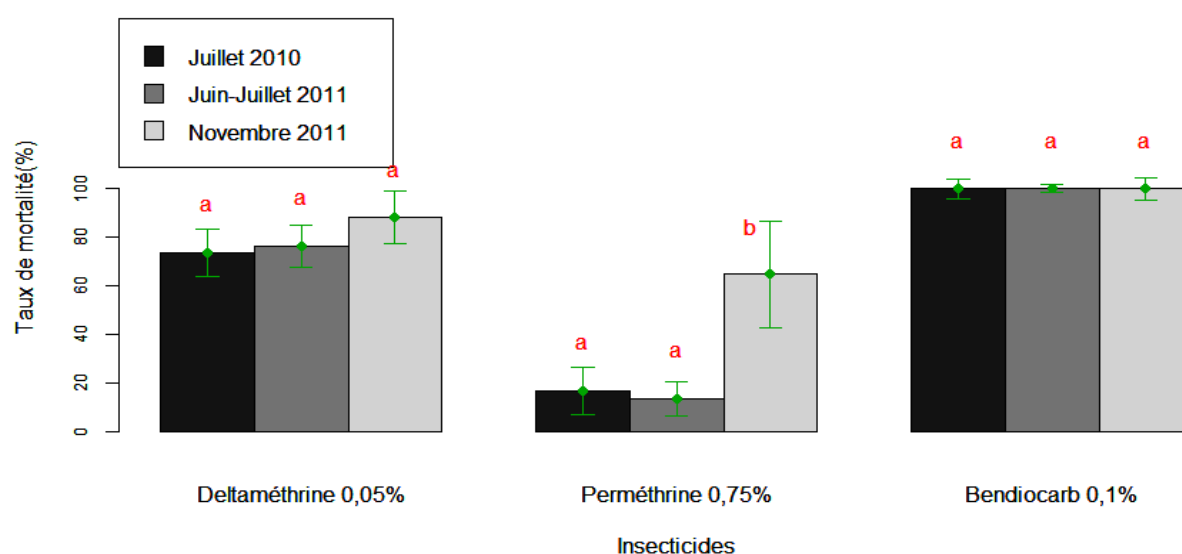
d) Avec le bendiocarb

Après 3 ans d'utilisation de bendiocarb dans les zones de l'Ouémé, aucune résistance à cet insecticide n'a été enregistrée (figure 35A, B, C et D). Toutefois, la mortalité obtenue en novembre 2011 à Adjohoun (89,9%) est significativement différente de celles enregistrées en juillet 2010 et en juin-juillet 2011 (100%) (figure 35A).

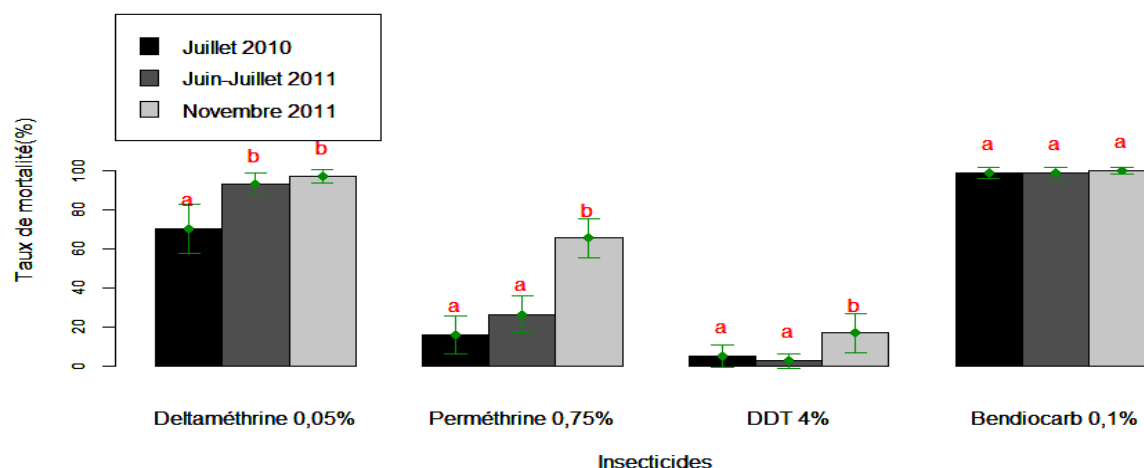
A



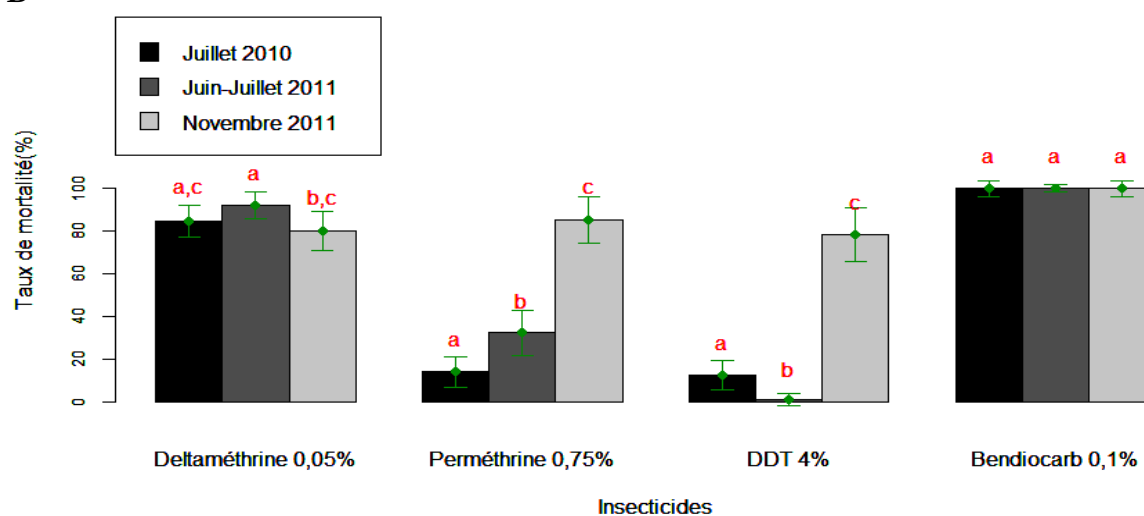
B



C



D



E

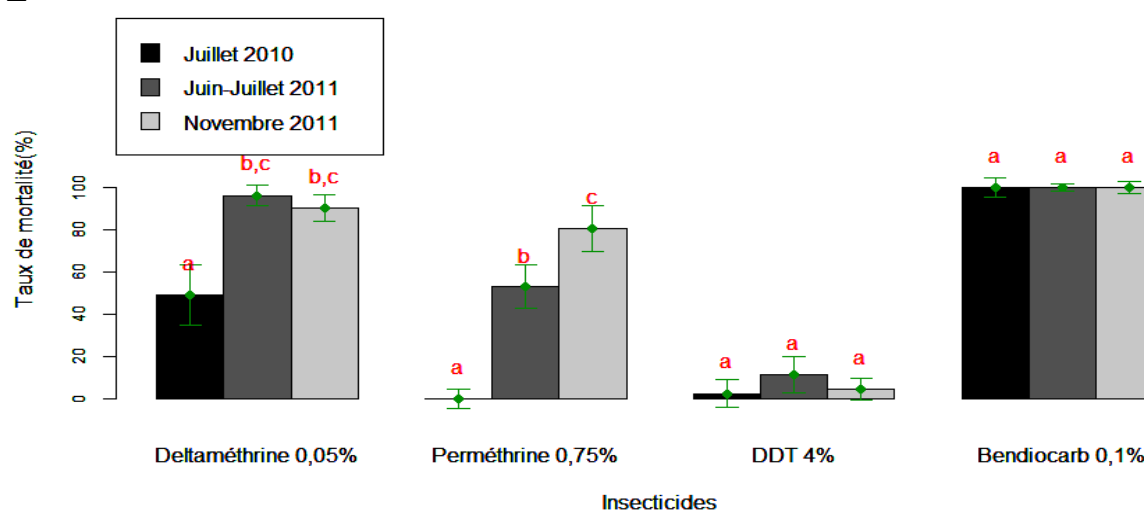


Figure 35 : Taux de mortalité de *An.gambiae* après 60 minutes d'exposition aux différents papiers imprégnés observé pendant la campagne de la PID (avril-décembre 2010) et après l'arrêt de la PID (avril-décembre 2011) dans les communes de **Adjohoun (A)**, **Dangbo (B)**, **Missérété (C)**, **Sèmè (D)** et **Adjara (témoin) (E)**. (Les taux portant la même lettre en exposant par commune ne sont pas significativement différents $p>0,05$)

1.1.2. Evolution des mécanismes de résistance des vecteurs dans les zones d'étude

Les résultats des tests moléculaires effectués avec les souches de *An. gambiae*, survivants issus des tests de sensibilité ont révélé en 2010 et 2011 la présence d'une seule espèce (*An. gambiae* s.s.). En 2010, la quasi-totalité des moustiques analysés sont de forme moléculaire M (100%). Par contre, en 2011, à part la commune de Sèmè, 2 formes moléculaires (M et S) ont été observées avec une prédominance de la forme M (90%) (tableau XII).

La mutation *Kdr* est le principal mécanisme de résistance identifié dans toutes les communes avec une fréquence très élevée, supérieure à 80% en 2010 et 2011 (tableau XII). Mais aucune différence significative n'est notée entre les fréquences des deux années ($P > 0,05$). Quant à la mutation *Ace-1*, elle n'a pas été observée malgré 3 années de pulvérisation intradomiciliaire au bendiocarb. Néanmoins, dans la zone témoin une faible fréquence a été notée (0,02) (tableau XII).

Tableau XII : Répartition des formes, des espèces et des fréquences *Kdr* et *Ace-1* de *An. gambiae* s.l issue des zones d'études.

	Années	Nombres		Formes				Mutation <i>Kdr</i>			Mutation <i>Ace-1</i>			
		testés	Espèces	moléculaires										
Localités			Am	Ag	M	S	RR	RS	SS	Fréquence <i>Kdr</i>	RR	RS	SS	Fréquence <i>Ace</i> <i>1R</i>
Adjohoun	2010	24	0	24	24	0	16	8	0	0,83*	0	0	24	0
	2011	23	0	23	21	2	12	8	0	0,80*	0	0	23	0
Dangbo	2010	25	0	25	25	0	19	6	0	0,88*	0	0	25	0
	2011	20	0	20	18	2	10	5	0	0,83*	0	0	20	0
Misséréte	2010	22	0	22	22	0	18	4	0	0,91*	0	0	22	0
	2011	26	0	26	21	2	15	6	0	0,86*	0	0	26	0
Sèmè	2010	25	0	25	25	0	20	5	0	0,9*	0	0	25	0
	2011	28	0	28	28	0	18	7	0	0,86*	0	0	28	0
Adjara (Ctrl)	2010	27	0	27	27	0	21	6	0	0,89*	0	0	27	0
	2011	27	0	27	26	1	25	2	0	0,96*	0	1	26	0,02

Am = *An. melas*; Ag = *An. gambiae* s.s. (*) les fréquences portant le même symbole en exposant par commune ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$).

1.2. Relation entre le portage des gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* et la présence de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* chez *An. gambiae* s.s

1.2.1. Fréquence allélique des mutations *Kdr* et *Ace-1* chez les formes M et S

Dans cette partie du travail, pour avoir la possibilité de rencontrer les formes de *An. gambiae* espérées et une fréquence des génotypes RR, RS et SS permettant les comparaisons, l'étude a été réalisée dans l'Ouémé et hors de l'Ouémé. Ainsi, nous avons tenu compte de la diversité des milieux écologiques. Par ailleurs, il n'était pas évident au départ de trouver un nombre élevé de *An. gambiae* infectés au *P. falciparum* dans un contexte d'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées par les populations. Mais, nous avons pensé qu'en variant les zones écologiques, on augmente la possibilité de découvrir un milieu où le taux d'infection de *An. gambiae* est relativement élevé.

Un total de 3112 femelles de *An. gambiae* provenant des différentes localités a été analysé. Les deux formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. ont été identifiées, avec une prédominance de la forme M (93,4%, n=1903) dans les localités du sud du Bénin et de la forme S (95%, n=887) dans celles du nord, sauf à Malanville (95% de M, n=322) (tableau XIII). 1492 individus appartenant aux deux formes moléculaires ont été analysés à la PCR pour la mutation *Kdr*. La fréquence allélique de cette mutation a varié de 59,61 % (Malanville, n=78) à 99 % (Adjara, n=151). Elle est de 84,51% chez la forme moléculaire M majoritaire au sud et de 70,33% chez S majoritaire au nord (tableau XIII). Pour avoir une idée plus précise de la susceptibilité de chacune des deux formes pour la mutation *Kdr*, nous avons calculé la fréquence *Kdr* chez M et S pour les localités où les deux populations ont été trouvées en sympatrie. Ainsi, à Malanville au nord du Bénin, la fréquence est plus élevée chez la forme S (100%, n = 4) comparativement à la forme M (59,61%, n = 78) ($p < 0,05$), ce qui est en accord avec les résultats de beaucoup de travaux de la sous-région ouest africaine. En revanche, dans les localités d'Adjohoun et de Tori-Bossito (au sud du Bénin), c'est la situation inverse : respectivement 78,1% pour M (n = 185) et 64,28% pour S (n = 14) ($p < 0,05$), puis 77,29% pour M (n = 370) et 48,61% pour S (n = 72) ($p < 0,05$) (tableau XIII). La mutation *Ace-1* n'a été observée que dans les localités de Adjara, Sèmè, Pehunco, Cobly et Toukountouna, avec une très faible fréquence variant de 2,63% (Cobly, n=19) à 10,41% (Toukountouna, n=24). La moyenne est de 3% pour M et de 3,71% pour S.

Tableau XIII : Fréquence des allèles *Kdr* et génotypes observés chez la forme M et S de *An. gambiae* s.s.

Localités	Mutation <i>Kdr</i> L1014F									
	Forme M			Fréquence		Forme S			Fréquence	
	RR	RS	SS	R (%)	S (%)	RR	RS	SS	R(%)	S(%)
Sèmè	64	3	0	97,8	2,24	-	-	-	-	-
Dangbo	120	3	0	98,8	1,22	-	-	-	-	-
Adjohoun	117	55	13	78,1	21,9	4	10	0	64,3	35,7
Adjara	148	3	0	99	1	-	-	-	-	-
Missérété	41	2	0	97,7	2,33	-	-	-	-	-
Tori-Bossito	247	78	45	77,3	22,7	27	16	29	48,6	51,4
Bamè	175	62	2	86,2	13,8	2	0	0	100	0
Pehunco	-	-	-	-	-	10	14	0	70,8	29,2
Kouandé	-	-	-	-	-	24	2	0	96,2	3,85
Cobly	-	-	-	-	-	15	4	0	89,5	10,5
Boukoumbé	-	-	-	-	-	9	16	0	68	32
Tanguiéta	-	-	-	-	-	22	3	1	90,4	9,62
Toukountouna	-	-	-	-	-	12	9	3	68,8	31,3
Malanville	33	27	18	59,6	40,4	4	0	0	100	0
Total	945	233	78	84,5	15,5	129	74	33	70,3	29,7

1.2.2. Indice de positivité en antigène circum sporozoïtique de *P. falciparum* chez les formes M et S de *Anopheles gambiae*

Les résultats des tests ELISA-CSP (tableau XIV) montrent que l'indice de positivité est en moyenne de 5,46% chez *An. gambiae* s.s. Il varie de 1,67% (Boukoumbé) à 11,84% (Kouandé). La moyenne de l'indice de positivité chez *An. gambiae* s.s. de forme moléculaire M a été de 5,70% avec une variation de 3,89% (Adjara) à 8,21 % (Dangbo). Chez les individus de forme S, cet indice de positivité a été en moyenne de 4,77%, variant de 0,31% (Malanville) à 11,84% (Kouandé). Aucune différence significative de sensibilité n'a été observée chez les formes M et S pour *P. falciparum* ($p > 0,05$).

Tableau XIV: Indices de positivité en CS de *P. falciparum* chez les formes M et S de *An. gambiae* s.s.

Localités	Total testé	Forme M		Forme S		Total	
		CS+	%CS+	CS+	%CS+	CS+	%CS+
Sèmè	175	9	5,14	-	-	9	5,14
Dangbo	207	17	8,21	-	-	17	8,21
Adjohoun	226	10	4,42	-	-	10	4,42
Adjara	334	13	3,89	-	-	13	3,89
Missérété	75	4	5,33	-	-	4	5,33
Tori-Bossito	534	35	6,55	-	-	35	6,55
Bamè	424	29	6,84	-	-	29	6,84
Pehunco	105	-	-	3	2,86	3	2,86
Kouandé	76	-	-	9	11,84	9	11,84
Cobly	352	-	-	15	4,26	15	4,26
Boukoumbé	180	-	-	3	1,67	3	1,67
Tanguiéta	46	-	-	4	8,7	4	8,7
Toukountouna	56	-	-	4	7,14	4	7,14
Malanville	322	14	4,35	1	0,31	15	4,66
Total	3112	131	5,7	39	4,77	170	5,46

1.2.3. Génotypes et phénotypes des gènes *Kdr* et *Ace-1* chez les *An. gambiae* s.s. positifs et non positifs en antigène CS de *P. falciparum*

Pour établir la relation entre le portage de gènes de résistance *Kdr* et *Ace-1* et la positivité en antigène CS de *P. falciparum* chez *An. gambiae* s.s. nous avons réalisé le tableau XV permettant de comparer les génotypes et phénotypes (sensible ou résistant) pour les mutations *Kdr* et *Ace-1* chez *An. gambiae* s.s. positif et non positif en antigène CSP de *P. falciparum*. Le gène *Kdr* étant récessif, les génotypes RS et SS ont le phénotype sensible et le génotype RR conduit au phénotype résistant. Aucune association n'a été observée entre génotype et phénotype résistants (ou sensibles) des vecteurs et leur positivité au CSP ($p > 0,05$).

Le gène *Ace-1* étant dominant, le génotype SS a le phénotype sensible et les RS, RR ont des phénotypes résistants. Aucune différence significative n'a été observée entre génotype et phénotype résistants (ou sensibles) des vecteurs et leur positivité au CSP ($p > 0,05$).

Tableau XV: Génotypes et phénotypes ([R], [S]) des mutations *Kdr* et *Ace-1* chez les *An. gambiae* s.s. positifs et non positifs à l'antigène CS de *P. falciparum*

Localités	CSP	Mutation <i>Kdr</i> L1014F					Mutation <i>Ace1</i> G119S						
		RR	RS	SS	[R]	[S]	p	RR	RS	SS	[R]	[S]	p
Sèmè	(+)	8	1	0	8	1		0	0	9	0	9	
	(-)	56	2	-	56	2	0,87	0	3	10	3	10	0,67
Dangbo	(+)	17	0	-	17	0		0	0	7	0	7	
	(-)	103	3	-	103	3	0,93	0	3	68	3	68	0,93
Adjohoun	(+)	6	1	3	6	4		0	0	2	0	2	
	(-)	115	64	10	115	74	0,97	0	0	8	0	8	1
Adjara	(+)	12	1	0	12	1		0	1	12	1	12	
	(-)	136	2	-	136	2	0,87	0	4	23	4	23	0,87
Missérété	(+)	3	1	-	3	1		0	0	4	0	4	
	(-)	38	1	-	38	1	0,74	0	0	39	0	39	1
Tori - Bossito	(+)	15	10	10	15	20		-	-	-	-	0	
	(-)	259	84	64	259	148	0,21	-	-	-	-	0	-
Bamè	(+)	26	3	0	26	0		-	-	-	-	0	
	(-)	151	59	2	151	61	0,25	-	-	-	-	0	-
Pehunco	(+)	2	1	0	2	1		0	2	0	2	0	
	(-)	8	13	-	8	13	0,57	0	2	22	2	22	-
Kouandé	(+)	3	1	-	3	1		0	0	4	0	4	
	(-)	21	1	-	21	1	0,76	0	0	22	0	22	1
Cobly	(+)	8	2	-	8	2		0	1	9	1	9	
	(-)	7	2	-	7	2	0,96	0	0	9	0	9	0,87
Boukoumbé	(+)	0	2	-	0	2		0	0	2	0	2	
	(-)	9	14	-	9	14	-	0	0	23	0	23	1
Tanguiéta	(+)	3	0	-	3	0		0	0	3	0	3	
	(-)	19	3	1	19	3	0,86	0	0	17	0	17	1
Toukountouna	(+)	1	1	0	1	1		0	1	1	1	1	
	(-)	11	8	3	11	11	1	0	4	18	4	18	0,69
Malanville	(+)	10	4	2	10	6		-	-	-	-	0	
	(-)	27	23	16	27	38	0,37	-	-	-	-	0	
Total	(+)	114	28	15	114	15	0,87	-	5	53	5		1
	(-)	960	279	96	960	96		-	16	237	16		

2. Discussion

Anopheles gambiae s.s. est la seule espèce du complexe *An. gambiae* trouvée en 2010 et en 2011 dans l'Ouémé. En plus de la forme M qui est la seule forme trouvée en 2010 (pendant la PID), en 2011, après l'arrêt de la PID, une faible proportion de la forme S (3,7% à 10%) a été rencontrée. C'est pour la première fois que cette forme est rencontrée à une fréquence relativement « élevée ». Jusqu'en 2010, *An. gambiae* S n'avait jamais été retrouvé dans le département de l'Ouémé. Cela pourrait être dû aux conséquences des changements climatiques. En effet, de plus en plus, l'univers est confronté au phénomène de réchauffement climatique et à la diminution de la pluviométrie, ce qui pourrait avoir pour corollaire la diminution des gîtes permanents et semi permanents favorables à M au profit de gîtes temporaires favorables au développement de la forme S.

Le but de la présente étude est également de suivre la dynamique de la résistance aux insecticides avant et après la PID. Avant 2010, *An. gambiae* était entièrement sensible à la deltaméthrine. Mais à partir de 2010-2011, les tests de sensibilité effectués ont montré une diminution de la sensibilité de *An. gambiae* à la deltaméthrine. L'émergence de la résistance de *An. gambiae* à la deltaméthrine en 2010 et 2011 a été observée non seulement dans les zones précédemment sous PID, mais aussi dans la zone témoin. L'apparition de la résistance à la deltaméthrine n'est certainement pas due à la PID, mais certainement à l'utilisation généralisée des MIILD au Bénin depuis quelques années et à une utilisation plus forte des intrants agricoles en particulier dans les champs de coton et dans les jardins maraîchers (Corbel *et al.*, 2007; Yadouléon *et al.*, 2009).

La résistance aux pyréthrinoïdes observée chez *An. gambiae* pendant les trois années dans les zones sous PID de l'Ouémé est associée à la présence de la modification du site cible des pyréthrinoïdes, le «canal sodium voltage dépendant» mais aussi probablement à l'augmentation de la détoxification métabolique (Corbel *et al.*, 2007). En effet, la mutation *Kdr*, responsable de la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes est le principal mécanisme de résistance identifié dans les populations de *An. gambiae* examinées. La fréquence allélique de cette mutation est très élevée dans toutes les communes, ce qui est inquiétant étant donné que le gène *Kdr* associé à des mécanismes de résistances métaboliques pourrait avoir un impact significatif sur l'efficacité des MIILD (WHO, 2007b).

L'absence de résistance moléculaire vis-à-vis des organophosphorés et des carbamates qui s'est manifestée par des fréquences insignifiantes, voire nulles (<1%) de la mutation *Ace-1*,

montre que cette mutation n'a pas été mise en jeu par *An. gambiae* malgré 3 ans d'utilisation de bendiocarb dans l'Ouémé. La faible fréquence observée à Adjara serait due à une mutation spontanée qui existait avant la mise en œuvre de la PID ou un début d'apparition de cette mutation due à une sélection exercée par des produits insecticides sur les moustiques. Toutefois, il serait nécessaire de suivre régulièrement l'évolution de la résistance liée à ce gène. En effet, la mise en place du phénomène de résistance est un problème de temps.

L'émergence de la résistance aux différents insecticides utilisés en santé publique notamment les pyréthrinoides chez *An. gambiae s.l* a été également signalée dans plusieurs pays Africains comme la Côte d'Ivoire (Elissa *et al.*, 1993), le Kenya (Vulule *et al.*, 1999), le Bénin (Akogbéto & Yakoubou, 1999; Yadouleton *et al.*, 2011), le Cameroun (Etang *et al.*, 2003) et le Nigéria (Awolola *et al.*, 2008) au cours de la dernière décennie. La mutation *Kdr* joue un rôle très important dans l'émergence de la résistance de *An. gambiae* au DDT et aux pyréthrinoides en Afrique de l'Ouest comme l'ont signalé beaucoup d'auteurs (Chandre *et al.*, 1999c; Corbel *et al.*, 2004; Yadouleton *et al.*, 2010).

Les résultats de nos travaux de recherche montrent que le gène *Kdr (Leu-Phe)* a été retrouvé à une fréquence allélique très élevée (0,80 en moyenne) dans les populations de *An. gambiae s.s.* quelle que soit la forme (M ou S). Si des données sont disponibles sur les mécanismes de développement de cette résistance (Djogbénou, 2008), des informations sont nécessaires sur les facteurs à l'origine de sa sélection surtout dans les zones rurales céréalières où la production des céréales ne nécessitent pas d'utilisation d'insecticides. Toutefois, il est clair que le développement de la résistance est lié à la fois à la bio-écologie du vecteur et à l'intensité de la pression de sélection exercée par l'utilisation des insecticides en santé publique et en agriculture. Si génétiquement parlant on estime que l'apparition d'un gène de résistance (*Kdr, Ace-1*) dans une population de moustiques est un phénomène spontané dont la sélection est liée à des pressions extérieures, en particulier à l'utilisation non contrôlée des insecticides dans le milieu, pour notre part, toute pression exercée sur un moustique à l'état larvaire ou adulte pourrait déclencher une réaction de défense de survie de la part de ce moustique qui pourrait à long terme créer un mécanisme de contrôle de cette pression.

La mutation *Kdr* a été détectée au départ dans les zones cotonnières, d'abord au sein des populations de la forme moléculaire S de *An. gambiae s.s.* avant d'amorcer son expansion dans la forme moléculaire M par introgression (Weill *et al.*, 2000). Les résultats obtenus à Malanville au nord du Bénin où la fréquence *Kdr* est plus élevée chez S que chez M sont en accord avec cette hypothèse. Toutefois, si l'hypothèse est vérifiée partout, on ne comprend pas pourquoi à Adjohoun et Tori-Bossito au sud, les données sont inversées avec les plus

fortes fréquences pour la forme M. En gardant l'hypothèse de départ, on peut conclure que la mutation *Kdr* est apparue il y a longtemps au sud du Bénin et qu'après son transfert à M, elle a pu se maintenir et évoluer très rapidement chez cette forme (Yadouléon *et al.*, 2010).

Outre la résistance aux pyréthrinoides, nous avons noté une faible résistance de *An. gambiae* s.s. aux carbamates avec l'apparition, chez *An. gambiae*, de la mutation *Ace-1*, mais à très faibles fréquences dans quelques localités. Un niveau de résistance similaire a été noté au Bénin par Djogbénou *et al.* (2010a), Djènontin *et al.* (2010) et Yadouléon *et al.* (2010). Ce début d'apparition du gène *Ace-1* est à suivre de très près en ce sens que, depuis quelques années au Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme s'emploie à utiliser le bendiocarb en pulvérisations intradomiciliaires dans le cadre de ses stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme. La mise en œuvre de cette stratégie pourrait augmenter, les années à venir, le niveau de résistance du gène *Ace-1*. Il urge à cet effet que des surveillances continues soient effectuées dans les milieux traités au bendiocarb afin de suivre l'évolution du gène *Ace-1* et la sensibilité des vecteurs aux insecticides par rapport à l'état initial. Cette surveillance permettra de mieux gérer la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides pour un meilleur contrôle de la transmission du paludisme.

S'il est possible que le gène *Kdr* confère aux populations de *An. gambiae* porteuses de cette mutation, une plus grande aptitude à pénétrer les moustiquaires imprégnées (Guanguenon, com. pers.), de la même manière, il est probable que les *An. gambiae* s.s. porteurs de la mutation *Kdr* soient plus susceptibles à transmettre le paludisme puisque résistants aux insecticides, ils sont susceptibles de vivre plus longtemps comparativement aux moustiques sensibles non porteurs de la mutation (Rivero *et al.*, 2010) considérés théoriquement plus fragiles au contact des agressions extérieures (MIILD, PID). Or, les tests ELISA CSP effectués sur les femelles paires porteuses de la mutation et les non porteuses ont montré des taux d'infection au *P. falciparum* similaires. Ces résultats montrent qu'il n'existe pas de relation nette entre l'infectivité et la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, ce qui concorde avec les travaux de Koffi *et al.* (2002) effectués en Côte d'Ivoire.

Par ailleurs, aucune différence n'a été observée entre l'infectivité au *P. falciparum* des formes M et S de *An. gambiae*, mais elles présentent des dynamiques différentes de transmission : la forme M est le vecteur majeur au sud et la forme S au nord. Cette observation a été déjà faite par Ndiath *et al.* (2008) dans une étude effectuée au Sénégal.

3. Conclusion

Il ressort de cette étude que les populations de *An. gambiae* dans le département de l'Ouémé ont conservé leur résistance aux pyréthrinoïdes, mais sont toujours sensibles au bendiocarb après l'arrêt de la PID. La pulvérisation intradomiciliaire par l'utilisation massive du bendiocarb n'a pas exercé une pression de sélection sur les vecteurs du paludisme. Cela peut être dû au coût lié à la mutation *Ace-1* en présence d'un traitement.

Par ailleurs, deux populations de *An. gambiae* s.s. assurent la transmission du paludisme au Bénin : *An. gambiae* M majoritaire dans les zones de forêt et de savane humide au sud et la forme S majoritaire dans les zones de savane sèche au nord. Ces deux formes sont résistantes aux insecticides, en particulier au DDT et aux pyréthrinoïdes. Le principal mécanisme de résistance mis en évidence dans les deux populations est la mutation *Kdr* dont la fréquence est aussi élevée pour S et pour M contrairement à ce qui est observé ailleurs.

L'hypothèse selon laquelle les populations de *An. gambiae* s.s. porteuses de la mutation *Kdr* pourraient être plus susceptibles à transmettre le paludisme n'est pas vérifiée dans l'étude. Aucune différence de positivité en protéine circumsporozoïtique de *P. falciparum* chez les *An. gambiae* de génotypes RR, RS et SS n'a été trouvée. Il n'existe donc pas de relation entre le portage du gène *Kdr* et l'infectivité au *P. falciparum*. Par ailleurs, les formes M et S ont la même susceptibilité vis-à-vis de ce parasite.

Chapitre 7:

Discussion générale, conclusion et perspectives

1. Niveau de la transmission du paludisme au cours de la campagne PID

Les résultats de notre étude ont confirmé ceux de Akogbéto *et al.* (2011) qui ont montré une chute drastique du taux de piqûre des anophèles lors du premier et du deuxième tour de la PID en 2008 et en 2009. Selon ces auteurs, cette baisse spectaculaire est due à plusieurs facteurs dont l'effet létal du bendiocarb sur les anophèles résistants aux pyréthrinoides (Akogbéto *et al.*, 2010). Par ailleurs, la PID a induit un changement de comportement des populations de *An. gambiae* et de *Mansonia spp*, traduit par un fort taux d'exophilie induite par le bendiocarb présent sur les murs intérieurs des habitations. Ce changement de comportement a été également noté par Padonou (2012) lors d'une étude sur l'impact de la PID au démarrage de la campagne au Bénin en 2008. Cette forte exophilie est liée à l'atmosphère désagréable causée par la présence du bendiocarb sur les murs à l'intérieur des habitations, ce qui n'est pas favorable à une longue survie des anophèles car cela les empêche de s'alimenter normalement. Cette atmosphère désagréable qui réduit le séjour des anophèles à l'intérieur des maisons justifie le faible taux de gorgement des anophèles observé au cours de l'étude. Ces résultats rappellent les études antérieures qui ont montré que la PID peut réduire la densité moyenne, la survie et le taux d'inoculation entomologique des populations de *An. gambiae* (Zhou *et al.*, 2010; Akogbéto *et al.*, 2011).

La forte réduction du TIE notée sur toute la période d'étude montre que la zone PID est devenue invivable pour les anophèles dont certains mourraient avant l'achèvement du cycle sporogonique du *Plasmodium* en raison d'une longévité plus réduite dans les zones d'intervention. Des résultats similaires avaient été rapportés dans des études récentes qui ont montré que la PID a été une stratégie efficace de prévention contre l'infection et la mortalité palustre (Zhou *et al.*, 2010; Pluess *et al.*, 2010; Keating *et al.*, 2011; Okumu & Moore, 2011) et a été associée à une réduction de la morbidité due au paludisme dans une zone à forte transmission en Ouganda. Dans ladite étude, l'impact était plus important après la rotation avec les carbamates (Kigozi *et al.*, 2012). Toutefois, nos résultats sont contraires à ceux enregistrés par Corbel *et al.* (2012) dans la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito au sud du Bénin. Mais les résultats médiocres enregistrés dans la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori sont dus à la taille de l'étude. En effet, il s'agit d'une intervention PID à petite échelle sur une population d'environ 10 000 habitants contrairement à la présente étude qui a couvert plus de 350 000 habitants. Par ailleurs, dans la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito, les deux tours de PID réalisés au cours de l'étude sont séparés de 8 mois d'intervalle alors que l'effet résiduel du bendiocarb n'est que de 3 mois. Selon Aïkpon (com. pers.), les

résultats en cours de la campagne PID dans l'Atacora, au nord du Bénin, sur une population de 500 000 habitants, sont encourageants avec une baisse du taux de piqûres des anophèles, de l'indice sporozoïtique et du Taux d'Inoculation Entomologique. La PID est donc une intervention de lutte à encourager. Mais compte tenu de sa cherté et de sa lourdeur, elle ne peut pas être mise en œuvre partout. Elle doit être réservée seulement pour les zones où la transmission du paludisme est élevée, en particulier les zones où la mortalité et la morbidité dues au paludisme sont les plus élevées. Paradoxalement, dans les zones où le TIE est très élevé, il faut réduire la transmission de façon drastique pour espérer réduire la prévalence du paludisme (Trape, 2001; Akogbéto *et al.*, 2011).

2. Niveau de la transmission du paludisme après le remplacement de la PID par les moustiquaires imprégnées

S'il est impératif que la mise en œuvre d'une stratégie de lutte doit être accompagnée d'un suivi-évaluation, son arrêt brusque ou son abandon pour une raison quelconque doit être également accompagné d'une étude pour mesurer les conséquences. En effet, après l'arrêt de la PID et malgré le remplacement de cette intervention par la distribution des moustiquaires Olyset à la population de l'Ouémé, on a assisté à une augmentation des indicateurs de la transmission du paludisme. Le taux de piqûre de *An. gambiae* a connu une augmentation significative après arrêt de la PID. Cette augmentation de l'agressivité anophélienne est justifiée par l'absence du bendiocarb sur les murs et la forte résistance de *An. gambiae* à la perméthrine, insecticide d'imprégnation des Olyset (Yadouleton *et al.*, 2010; Padonou *et al.*, 2012; Ossè, com. pers.). Le remplacement de la PID par la couverture universelle des MIILD n'a donc pas permis de maintenir le taux de piqûres à son niveau initial. Quant à l'exophilie de *An. gambiae* et de *Culex spp*, elle a connu une diminution significative après l'arrêt de l'intervention. L'effet excito-répulsif de la perméthrine sur ces moustiques ne s'est pas manifesté probablement en raison de leur forte résistance à ce produit. Ces résultats confirment les travaux de N'Guessan *et al.* (2007) et de Corbel *et al.* (2010) au Bénin qui ont montré une baisse sensible de l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrianoïde en zone de forte résistance des vecteurs aux pyréthrianoïdes.

Par ailleurs, *An. funestus*, vecteur du paludisme au Bénin (Djènontin *et al.*, 2010), qui a, entre temps, disparu pendant la PID a fait son apparition après l'arrêt de l'intervention. Il ressort aussi de nos résultats que le niveau de transmission a augmenté dans les communes de Adjohoun et Missérété après l'arrêt de la PID. L'augmentation du taux d'inoculation entomologique est justifiée par le taux élevé de piqûres de *An. gambiae* et l'indice

sporozoïtique relativement élevé enregistrés après la mise en place des MIILD à l'intérieur des habitations. Même, dans la commune de Sèmè où l'agressivité anophélienne a été plus forte que dans les autres communes, une baisse de la transmission a été observée après l'arrêt de la PID. Ceci pourrait être dû à une forte utilisation des MIILD par les habitants de cette zone. Cette réduction de la transmission obtenue dans cette zone suite à l'utilisation des MIILD corrobore avec les travaux de divers auteurs qui ont montré que l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées d'insecticide a permis de réduire l'incidence du paludisme et de fournir une protection significative contre la mortalité attribuée au paludisme, les attaques cliniques du paludisme et l'infection palustre (WHO, 2009; Bekele *et al.*, 2012). Des études antérieures menées en Afrique subsaharienne, ont montré que l'efficacité protectrice des moustiquaires était plus faible dans les zones de paludisme stable caractérisé par des TIE élevés (Lengeler, 2008).

3. Efficacité des MIILD et leur acceptabilité par la population de l'Ouémé

La distribution gratuite des MIILD dans le département de l'Ouémé a suscité un engouement de la part des communautés. Cette distribution a permis d'offrir des moyens de protection individuelle à toute la population, en particulier ceux dont le pouvoir d'achat est faible et d'augmenter le taux de couverture et d'utilisation des MIILD dans le département, un des objectifs du plan d'action du Programme National de Lutte contre le Paludisme. Les résultats de l'enquête sociologique réalisée ont montré que l'accès à la couverture universelle basée sur un Olyset pour deux personnes promis par le PNLN est atteint dans le département de l'Ouémé. Par ailleurs, le taux d'utilisation des moustiquaires imprégnées au sein de la population a été meilleur. En effet, la nuisance culicidienne étant assez forte dans notre zone d'étude, l'utilisation des moustiquaires a été forte au sein des communautés. La population utilise effectivement les MIILD pour se protéger contre les piqûres de moustiques (Agyepong & Manderson, 1999). Toutefois, les autorités chargées de la lutte contre le paludisme devraient considérer la sensibilisation des populations sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées non pas comme une activité marginale, mais comme une activité aussi importante que leur distribution afin d'induire leur pérennisation au niveau communautaire et de réduire davantage le contact homme-vecteur. Compte tenu de son importance, cette activité devra être conçue par des spécialistes en socio-anthropologie.

Nos résultats ont également montré qu'il y a une dégradation accélérée des fibres moustiquaires au niveau des sites d'étude. Dans certaines communes, plus de 10% des

moustiquaires Olyset ont perdu leur intégrité physique après seulement 6 mois d'utilisation. Il ne s'agira donc pas pour les PNLP de seulement distribuer des MIILD, mais il faudrait également mettre en place des stratégies pour encourager les utilisateurs des MIILD à réparer les MIILD trouées ou déchirées et remplacer celles qui sont irréparables. Il est à noter que l'implication des femmes dans cette stratégie doit être primordiale à cause du premier rôle qu'elles jouent dans la lutte préventive contre le paludisme à domicile.

Il ressort aussi de cette étude qu'il y a une baisse d'efficacité des moustiquaires Olyset contre les vecteurs porteurs de la mutation *Kdr*. Les taux de mortalité observés après les tests en cône sur ces moustiquaires ont été très faibles confirmant la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes et, éventuellement, la présence d'autres mécanismes de résistance, notamment des mécanismes enzymatiques impliqués dans cette résistance. En génétique des populations, un phénotype s'exprime par la combinaison de génotypes, de l'environnement et des interactions géniques. Ces interactions géniques sont si importantes qu'elles influencent la valeur sélective des individus. Le fait d'être porteur de l'allèle de résistance n'est pas le seul paramètre permettant la survie de l'individu dans un milieu sous traitement insecticide. Par ailleurs, il est important de noter qu'une mutation génique aussi avantageuse qu'elle soit entraîne un fardeau génétique pour la population considérée. La résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes représente une menace potentielle pour le succès de la lutte antivectorielle.

La très faible proportion de la forme moléculaire S dans la zone d'étude ne nous a pas permis d'étudier l'impact des moustiquaires imprégnées sur chacune des formes M et S de *An. gambiae*. Une telle étude est envisageable dans une zone où les deux formes moléculaires M et S coexisteraient dans des proportions permettant de faire des comparaisons.

4. Dynamique de la résistance de *An. gambiae* aux insecticides après trois ans d'utilisation du bendiocarb en PID dans l'Ouémé et gestion de la résistance des vecteurs

Après 3 ans d'utilisation du bendiocarb dans l'Ouémé, les vecteurs sont demeurés sensibles à ce produit comme l'ont montré les études précédentes au Bénin (Djogbénou *et al.*, 2008; Akogbéto *et al.*, 2010; Padonou *et al.*, 2012), en Mozambique (Sharp *et al.*, 2007) et en Ouganda (Kigozi *et al.*, 2012). En revanche, nous avons noté une forte résistance au DDT et à la perméthrine et, pour la première fois, une baisse du niveau de sensibilité, voire une résistance totale de *An. gambiae* vis-à-vis de la deltaméthrine dans toutes les localités.

L'augmentation de la résistance aux pyréthréinoïdes en Afrique notée depuis quelques années et décrites par Ranson *et al.* (2011) s'est traduite dans la présente étude par l'apparition de la résistance à la deltaméthrine dans toutes les zones y compris la localité témoin n'ayant bénéficié d'aucune intervention. Cette augmentation ne se justifie pas par la mise en œuvre de la PID mais par d'autres facteurs comme l'augmentation des MIILD dans ce milieu. Ces facteurs sont aussi liés à la bio-écologie du vecteur et à toute pression de sélection exercée sur les vecteurs dont l'utilisation anarchique et intensive des pesticides en agriculture (Yadouléon *et al.*, 2011). L'absence d'individus homozygotes RR pour la mutation *Ace-1R* dans la zone témoin pourrait se justifier par le coût de la résistance (Weill *et al.*, 2003b; Djogbénou *et al.*, 2010b). En effet, la mise en œuvre de la PID au bendiocarb a montré un bénéfice en ce sens que cet insecticide ne semble pas avoir un impact sur la résistance. Cependant, il serait préférable que des surveillances continues soient effectuées dans les milieux traités afin de suivre l'évolution du gène *Ace-1R* par rapport à l'état initial pour envisager, selon le résultat, la mise en place d'une stratégie de gestion de la résistance.

La gestion de la résistance des vecteurs doit être abordée de façon collective et aller au-delà des modèles théoriques qui, le plus souvent, évoquent peu le rôle du milieu et l'activité humaine en tant que source de pression de sélection de cette résistance. Elle doit, en plus des concepts scientifiques, regrouper tous les acteurs utilisant les insecticides aussi bien en santé publique qu'en agriculture pour une utilisation judicieuse de ces insecticides afin de pérenniser le plus longtemps possible les bénéfices des MIILD et de la PID. Ceci pourrait se réaliser par une rotation concertée des insecticides pour limiter l'extension des gènes et mécanismes de résistance. Certaines stratégies de gestion de la résistance s'appuient sur cette idée, à savoir que la suppression de la pression sélective inversera la résistance et qu'il sera ensuite possible, à un certain moment, de réintroduire l'insecticide d'origine dans les programmes de lutte antivectorielle. Ces stratégies doivent cependant être mises en œuvre avant que le gène de la résistance ne devienne courant et stable dans la population ; sans quoi, le gène résistant ne reculera plus, même si l'on cesse d'utiliser l'insecticide à l'origine de la pression sélective (McKenzie & Whitten, 1982). Toutefois, au Bénin, le risque d'émergence d'autres mécanismes de résistance en l'occurrence la résistance métabolique, doit orienter la recherche vers de nouvelles classes d'insecticides ou de nouvelles combinaisons (associant plusieurs insecticides à différent mode d'actions très bénéfiques) qui pourraient supplémenter ou remplacer les pyréthréinoïdes là où ceux-ci devenaient inefficaces (Ranson *et al.*, 2000b; Müller *et al.*, 2008). Des résultats prometteurs ont été obtenus à l'aide de nouvelles familles

d'insecticides tels que les pyroles (N'Guessan *et al.*, 2010) ou les champignons entomopathogènes (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2005). Ces derniers (e.g. *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*) ont montré une efficacité insecticide intéressante contre les anophèles vecteurs du paludisme en Afrique et présentent l'avantage de ne pas montrer de résistance croisée avec les insecticides chimiques conventionnels (Farenhorst *et al.*, 2009). A moyen terme, il faudra compter sur la lutte génétique. Celle ci fait appel à deux grandes méthodes: la technique de l'insecte stérile et la technique de l'insecte génétiquement modifié (Beaty, 2000). L'utilisation d'agents biologiques permettant d'augmenter l'efficacité des insecticides existants vis-à-vis des vecteurs du paludisme peut être aussi envisagée.

La lutte antivectorielle doit surtout faire appel à des méthodes de lutte physique (drainage et assèchement des marais) qui devraient être systématiquement prises en compte dans les programmes d'aménagement et de mise en valeur des territoires. La lutte antivectorielle est une question de stratégie qui doit être adaptée aux conditions des communautés locales.

Malgré les difficultés liées à la lutte contre le paludisme, les pays africains ne doivent pas se décourager et avoir espoir en l'avenir. L'environnement actuel est favorable à l'élimination du paludisme avec une prise de conscience à tous les niveaux, au développement de la recherche biomédicale et surtout dans le domaine du paludisme et l'existence de plusieurs outils de lutte. Si l'éradication du paludisme a été effective dans les régions tempérées, c'est grâce à la mise en place de plusieurs stratégies de lutte appropriées basées sur la lutte antivectorielle alliant aménagement de l'environnement, pulvérisations intradomiciliaires et le traitement antipaludique. Certes, la situation en Afrique subsaharienne est un peu plus complexe à cause d'un système vectoriel très complexe, d'une insuffisance de ressources humaines et financières, d'une insuffisance de volonté politique et du développement de la résistance des vecteurs aux insecticides et des parasites aux antipaludiques. C'est pourquoi, malgré quelques progrès enregistrés çà et là, l'Afrique reste un faciès de paludisme stable avec de longue période de transmission (Mouchet, 2004). En dépit des efforts considérables et l'augmentation du financement international consacrés à travers le monde pour contrôler et éliminer cette maladie (Feachem & Phillips, 2009), elle reste un problème majeur de santé publique, avec près de 216 millions de cas par an et environ 655 000 décès, dont 86% sont des enfants de moins de 5 ans (WHO, 2011). Mais ces derniers temps, la communauté internationale est mobilisée contre le paludisme autour de plusieurs stratégies et outils de lutte. En effet, les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé pour lutter contre le paludisme incluent la thérapie à base d'artémisinine et les moustiquaires imprégnées d'insecticide à

longue durée (MIILD), soutenues par des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticide à effet rémanent (PID) et le traitement préventif intermittent pendant la grossesse. Entre 2008 et 2010, près de 289 millions de moustiquaires imprégnées d'insecticide ont été livrées à l'Afrique subsaharienne, assez pour protéger 578 millions de personnes. En plus de tout cela, environ 81 millions de personnes, soit 11% de la population à risques, étaient également protégées par la PID (WHO, 2011). Le déploiement de ces stratégies a montré une réduction importante de la morbidité et de la mortalité du paludisme associée à des paramètres entomologiques avec des niveaux de transmission modérée dans certains pays en Afrique subsaharienne (Lengeler *et al.*, 2004; Pluess *et al.*, 2010). Mais, nous devons rester vigilant et ne pas crier trop tôt à la victoire. En effet, une récente augmentation des cas de paludisme a été signalée dans certains de ces pays, soulignant la fragilité de la lutte contre le paludisme dans cette partie du monde (Trape *et al.*, 2011).

Références bibliographiques

1. Adam K.S., Boko M. Le Bénin-Nouvelle édition mise à jour. Cotonou : Editions du Flamboyant, Paris : EDICEF, 1993, 95pp.
2. Agossou C., Yessoufou M., Souradjou M. Impact des habitudes de lavage sur l'efficacité et la durabilité des MIILD de type PermaNet® dans les conditions de terrain. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur des travaux. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi, 2006, 82pp.
3. Agyepong I.A., Manderson L. Mosquito avoidance and bed net use in the Greater Accra Region, Ghana. *Journal of Biosocial Science*, 1999, 31, 79-92.
4. Ahorlu C.K., Dunyo S.K., Afari E.A., Koram K.A., Nkrumah F.K. Malaria related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control. *Tropical Medicine and International Health*, 1997, 2 (5), 488-499.
5. Akogbéto M. Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin. Thèse de doctorat ès-sciences. Université de Paris XI, 1992, 192pp.
6. Akogbéto M., Modiano D., Bosman A. Malaria transmission in the lagunar area of Cotonou (Benin). *Parassitologia*, 1992, 34, 147-154.
7. Akogbéto M., Di Deco M.A. Répartition des membres du complexe *Anopheles gambiae* et de leurs variants chromosomiques au Bénin et au Togo, Afrique occidentale. *Journal of African Zoology*, 1995, 109, 443-454.
8. Akogbéto M., Romano R. Infectivity of *Anopheles melas* vis-a-vis *Plasmodium falciparum* in the coastal lagoon area of Benin. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1999, 92, 57-61.
9. Akogbéto M., Yakoubou S. Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets, Benin, West Africa. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1999, 92, 123-130.
10. Akogbéto M. Etude entomologique sur la transmission du paludisme côtier lagunaire au Bénin. *Tropical Medicine and Health*, 2001, 6, 845-847.

11. Akogbéto M., Padonou G., Gbénou D., Irish S., Yadouleton A. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malaria Journal*, 2010, 9, 204.
12. Akogbéto M., Padonou G., Bankolé H., Kindé Gazard D., Gbédjissi G. Dramatic decline of malaria transmission after implementation of large-scale Indoor Residual Spraying using bendiocarb in Benin, West Africa, an area of high *Anopheles gambiae* resistance to pyrethroids. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2011, 85(4), 586–593.
13. Alessandro (d') U. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet*, 1995, 345, 479-483.
14. Alonso P.L., Lindsay S.W., Armstrong Schellenberg J.R., Keita K., Gomez P., Shenton F.C., Hill A.G., David P.H., Fegan G., Cham K.A. malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of the Gambia, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993, 2, 37-44.
15. Alou L.P., Koffi A.A., Adja M.A., Tia E., Kouassis P.K., Kone M., Chandre F. Distribution of ace-1R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cote d'Ivoire. *Malaria Journal*, 2010, 9, 167.
16. Anonyme. Fipronil. Worldwide Technical Bulletin. Rhône-Poulenc, Research Triangle Park, NC, *Printed in the U.S.A.*, 1996, 20pp.
17. Ansari M.A., Razdan R.K. Impact of residual spraying of bendiocarb against the malaria vector *Anopheles culicifaces* in selected villages of the Ghaziabad District. *Uttar Pradesh, India. Journal of the American Mosquito Control Association*, 2004, 20(4), 418-423.
18. Antonio-Nkondjio C., Simard F., Cohuet A., Fontenille D. Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles moucheti*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric south Cameroon populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 2002, 2, 69-72.
19. Asidi A.N., N' Guessan R., Koffi A.A., Curtis C.F., Hougard J.M., Chandre F., Corbel V., Darriet F., Zaim M., Rowland M.W. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambdacyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malaria Journal*, 2005, 4, 25.

20. Awolola T.S., Brooke B.D., Koekemoer L.L., Coetzee M. 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*, 2003, 8, 420-422.
21. Awolola T.S., Oduola O.A., Strode C., Koekemoer L.L. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. from Nigeria. *Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 103, 1139-1145.
22. Azondékon R., Vigninou E. Contrôle de qualité des moustiquaires imprégnées commercialisées ou distribuées au Bénin. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur des travaux. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi, 2007, 80pp.
23. Badolo A., Ilboudo-Sanogo E., Ouedraogo A. P., Costantini C. Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Tropical Medicine and International Health*, 2004, 9, 330-334.
24. Bang Y.H., Sabuni I.B., Tonn R.J. Integrated control of urban mosquitoes in Dares Salaam using community sanitation supplemented by larviciding. *East African Medical Journal*, 1975, 52, 578-584.
25. Beaty Barry J. Genetic manipulation of vectors: a potential novel approach for control of vector-borne diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (19), 10295-10297.
26. Bekele D., Belyhun Y., Petros B., Deressa W. Assessment of the effect of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in three rural kebeles of Adami Tulu District, South Central Ethiopia. *Malaria Journal*, 2012, 11, 127.
27. Binka F.N., Kubaje A., Adjuik M., Williams L.A., Lengeler C., Maude G.H., Armah B., Kajihara J., Adiamah H., Smith P.G. Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana; a randomized controlled trial. *Tropical Medicine and International Health*, 1996, 1, 147-154.
28. Blanford S., Chan B.H., Jenkins N., Sim D., Turner R.J., Read A.F., Thomas M.B. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 2005, 308 (5728), 1638-1641.

29. Burkot T.R., Graves P.M., Wirtz R.A., Gibson F.D. The efficiency of sporozoïtes transmission in the human malarias *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 1987, 65, 375-380.
30. Carnaval. Les moustiques, morphologie, biologie et santé. 2000, 20pp.
31. Carnevale P., Mouchet J. Vector control and malaria control. *Médecine Tropicale*, 1990, 50, 391-398.
32. Cavalie P.H., Mouchet J. Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le nord de la république du Cameroun. *Médecine Tropicale*, 1961, 21, 847-870.
33. Cervinskas J., Berti P., Desrochers R., Mandy J., Kulkarni M. Evaluation de la possession et de l'utilisation des moustiquaires imprégnées de l'insecticide long durée (MILDs) au Mali huit mois après la campagne intégrée de décembre 2007: *Rapport Final*. Ottawa: Health Bridge Canada, 2008. Site Web :

<http://www.healthbridge.ca/assets/images/pdf/Malaria/Final%20Mali%20Report%20nov%2030.pdf> (http://www.healthbridge.ca/reports_e.cfm#Malaria)
34. Chandre F., Darriet F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J., Guillet P. Situation de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999a, 77, 230-234.
35. Chandre F., Manguin S., Brengues C., Dossou Yovo J., Darriet F., Diabate 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 for the Mopti form. *Parassitologia*, 1999b, 41, 319-322.
36. Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., Carnevale P., Guillet P. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1999c, 15, 53-59.
37. Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S., Carnevale P., Guillet P. Modifications of pyrethroid effect associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2000, 14, 81-88.
38. Coetzee M., Craig M., Le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 2000, 16, 74-77.

39. Coleman M., Casimiro S., Hemingway J., Sharp B. Operational impact of DDT reintroduction for malaria control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. *Journal of Medical Entomology*, 2008, 45(5), 885-90.
40. Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., Di Deco M.A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1979, 73, 483-497.
41. Coosemans M., Sales S. Evaluation au stade 4 du malathion, bendiocarb et deltaméthrine pour lutter contre les Anophèles. Rémanence de la perméthrine et d'un Analogue Biodégradable du DDT. *BOBO-DIOULASSO*, 1978, 30pp.
42. Coosemans M., d'Alessandro U. Plaidoyer pour les moustiquaires imprégnées dans les programmes de lutte contre le paludisme. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2001, 94, 2 bis, 169-173.
43. Corbel V., Chandre F., Brengues C., Akogbéto M., Hougard J., Guillet P. Dosage-dependent effects of permethrin treated net on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malaria Journal*, 2004, 3, 22-30.
44. Corbel V., N'guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., Akogbéto M., Hougard J.M., Rowland M. Multiple insecticide mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*, 2007, 101, 207-216.
45. Corbel V., Chabi J., Dabiré R.K., Etang J., Nwane P., Pigeon O., Akogbeto M., Hougard J.M. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet® 3.0) against pyrethroid resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. *Malaria Journal*, 2010, 9, 113.
46. Corbel V., Akogbéto M., Damien G.B., Djènonstin A., Chandre F., Rogier C., Moiroux N., Chabi J., Banganna B., Padonou G.G., Henry M-C. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomized controlled trial. *Lancet Infectious Diseases*, 2012, 12, 617–626.
47. Costantini C., Sagnon N.F., Della Torre A., Diallo M., Brady J., Gibson G., Coluzzi M. Odor-mediated host preferences of West African mosquitoes, with particular reference to malaria vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 58, 56-63.
48. Costantini C., Badolo A., Ilboudo-Sanogo E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae*

- complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 98, 644-652.
49. Coz J., Davidson G., Hamon J. La résistance des anophèles aux insecticides en Afrique Tropicale et à Madagascar. *Cahier ORSTOM., Série Entomologie*, 1968, 6(3/4), 207-210.
 50. Craig G.B. Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science*, 1967, 156, 1499-1501.
 51. Cuany A., Handani J., Berge J., Fournier D., Raymond M., Georghiou G.P., Pasteur N. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1993, 45, 1-6.
 52. Curtis C.F., Myamba J., Wilkes T. J. Comparison of different insecticides and fabrics for anti-mosquito bednets and curtains. *Medical and Veterinary Entomology*, 1996, 10, 1-11.
 53. Czeher C., Labbo R., Arzika I., Duchemin J.B. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malaria Journal*, 2008, 7, 189.
 54. Dadd R.H. Effects of size and concentration of particles on rates of ingestion of latex particulates by mosquito larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 1971, 64, 687-692.
 55. Darriet F., Tho Vien N., Robert V., Carnevale P. Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria. *WHO*, 1984, 20pp.
 56. Darriet F., Robert V., Carnevale P. 1987. Evaluation de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoïdes et un juvénoïde, dans la lutte contre *Culex quinquefasciatus*. *Cah. ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 1987, 25, 119-126.
 57. Darriet F., Guillet P., N'guessan R., Doannio J.M., Koffi A., Konan L.Y., Carnevale P. Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. *Médecine Tropicale*, 1998, 58, 349-354.
 58. Darriet F., N'guessan R., Koffi A.A., Konan L., Doannio J.M., Chandre F., Carnevale P. Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2000, 93, 131-134.
 59. Darriet F., N'guessan R., Hougard J.M., Traore-Lamizana M., Carnevale P. An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2002, 95, 299-303.

60. Darriet F. Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides. IRD Editions, Paris, 2007, 177pp.
61. Debboun M., Frances S.P., Strickman D. Insect repellents: principles, methods, and uses. *CRC Press, Taylor & Francis Group*, 2007.
62. Detinova T.S., Gillies M.T. Observations on the Determination of the Age Composition and Epidemiological Importance of Populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. *Bulletin of World Health Organization*, 1964, 30, 23-28.
63. Devonshire A.L., Field L.M. Gene amplification and insecticide resistance. *Annual Review of Entomology*, 1991, 36, 1-23.
64. Diabaté A., Baldet T., Ido K., Dabiré R., Guiguemba T. Sensibilité aux pyréthrinoïdes d'*An. gambiae s.l.* dans les hydro-aménagements au Burkina Faso : Implications opérationnelles dans la lutte contre le paludisme. *Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR*, 2001, 49pp.
65. Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Akogbéto M., Guiguemba T.R., Darriet F., Brengues C., Guillet P., Hemingway J., Small G.J., Hougard J.M. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002a, 67, 617-622.
66. Diabaté A., Chandre F., Rowland M., N'guessan R., Duchon S., Dabiré K.R. Hougard J.M. The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors. *Tropical Medicine and International Health*, 2006, 11, 597-603.
67. Diatta M., Spiegel A., Lochouart L., Fontenille D. Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in Senegal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 92, 270-2.
68. Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cellular Microbiology*, 2003, 5 (1), 3-14.
69. Djègbé I., Boussari O., Sidick A., Martin T., Ranson H., Chandre F., Akogbéto 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. *Malaria Journal*, 2011, 10, 261.
70. Djènontin A., Chabi J., Baldet T., Irish S., Penetier C., Hougard J.M., Corbel V., Akogbéto M., Chandre F. Managing insecticide resistance in malaria vectors by

- combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malaria Journal*, 2009, 8, 233-236.
71. Djènontin A., Chandre F., Chabi J., N'guessan R., Baldet T., Akogbéto M., Corbel V. The indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethrinoid-resistant malaria vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010, 83, 266-270.
 72. Djènontin A., Bio-Bangana S., Moiroux N., Henry M., Bousari O., Chabi J., Ossè R., Koudénoukpo S., Corbel V., Akogbéto M., Chandre F. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vector in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): a pre-intervention study. *Parasites and Vectors*, 2010, 3, 83-84.
 73. Djogbenou L. Dynamique des mécanismes de la résistance aux insecticides liés à la modification de cibles dans les populations naturelles d'*An.gambiae* s.l. d'Afrique de l'Ouest. Thèse unique, Université de Montpellier 2, 2008, 212pp.
 74. Djogbenou L., Dabiré R., Diabaté A., Kengne P., Akogbéto M., Hougard J.M., Chandre F. Identification and geographic distribution of the *ace 1R* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 78 (2), 298-302.
 75. Djogbenou L., Pasteur N., Bio-Bangana S., Baldet T., Irish S.R., Akogbéto M. Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Tropica*, 2010a, 114, 116-122.
 76. Djogbenou L., Noel V., Agnew P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malaria Journal*, 2010b, 9, 12.
 77. Djouaka R.F., Bakare A.A., Coulibaly O.N., Akogbéto M.C., Ranson H., Hemingway J., Strode C. Expression of cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BCM Genomics*, 2008, 9, 538.
 78. Doannio J.M.C., Hougard J.M., Dossou-Yoyo J., Duval J. Evaluation en milieu naturel de l'activité de trois analogues de régulateurs de croissance, l'OMS 3 007, l'OMS 3 010 et l'OMS 3 019, sur *Culex quinquefasciatus* en Afrique de l'Ouest. *Cah. ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 1986, 24 (4), 287-291.
 79. Dolo A., Camara F., Poudiougou B., Toure A., Kouriba B., Bagayogo M., Sangare D., Diallo M., Bosman A., Modiano D., Toure Y.T., Doumbo O. Epidémiologie du paludisme

- dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana)-Etude entomo-parasitologique et clinique. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2003, 96, 308-312.
80. Dossou-Yovo J., Doannio J.M., Diarrassouba S., Chauvancy G. Impact d'aménagements de rizières sur la transmission du paludisme dans la ville de Bouaké, Côte d'Ivoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1998, 91, 327-333.
 81. Duchemin J.B., Tsy J.M., Rabarison P., Roux J., Coluzzi M., Costantini C. Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Medical and Veterinary Entomology*, 2001, 15, 50-7.
 82. Elissa N., Mouchet J., Riviere F., Meunier J.Y., Yao K. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1993, 73, 291-294.
 83. Elliott M., Janes N.F., Potter C. The future of pyrethroids in insect control. *Annual Review of Entomology*, 1978, 23, 443-469.
 84. Etang J., Manga L., Chandre F., Guillet P., Fondjo E., Mimpfoundi R., Toto J.C., Fontenille D. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera Culicidae) in the Republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 2003, 40, 491-497.
 85. Etang J., Fondjo E., Chandre F., Morlais I., Brengues C., Nwane P., Chouaibou M., Ndjemai H., Simard F. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 74, 795-797.
 86. Fanello C., Kolaczinski J. H., Conway D. J., Carnevale P., Curtis C.F. The *kdr* pyrethroid resistance gene in *Anopheles gambiae*: tests of non-pyrethroid insecticides and a new detection method for the gene. *Parassitologia*, 1999, 41, 323-326.
 87. Fanello C., Della Torre A. Distribution du gène *kdr* dans les formes chromosomiques et moléculaires des *Anopheles gambiae* s.s en Afrique Occidentale. *Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR*, 2001, 52pp.
 88. Fanello C., Petrarca V., Della Torre A., Santolamazza F., Dolo G. The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 2003a, 12, 241-245.
 89. Fanello C., Carneiro I., Ilboudo-Sanogo E., Cuzin-Ouattara N., Badolo A., Curtis C.F. Comparative evaluation of carbosulfan and permethrin-impregnated curtains for

- preventing house-entry by the malaria vector *Anopheles gambiae* in Burkina Faso. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003b, 17, 333-338.
90. Farenhorst M., Mouatcho J.C., Kikankie C.K., Brooke B.D., Hunt R.H., Thomas M.B., Koekemoer L.L., Knols B.G., Coetzee M. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2009, 106 (41), 17443-17447.
 91. Favia G., Della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti , Sagnon N.F., Toure Y., Coluzzi M. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Molecular Biology*, 1997, 6, 377-383.
 92. Feachem R.G., Phillips A.A. Malaria: 2 years in the fast lane. *Lancet*, 2009; 373, 1409-1411.
 93. Fegan G.W., Noor A.M., Akhwale W.S., Cousens S., Snow R.W. Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study. *Lancet*, 2007, 370, 1035-1039.
 94. Fond topographique IGN 2004, Bénin.
 95. Fontenille D., Campbell G.H. Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992, 46, 28-30.
 96. Fontenille D., Lochouart L. The complexity of the malaria vectorial system in Africa. *Parassitologia*, 1999, 41, 267-271.
 97. Fontenille D., Simard F. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2004, 27 (5), 357-75.
 98. Fournier D., Bride J.M., Mouches C., Raymond M., Magnin M., Berge J.B., Georgiou G.P. Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1987, 27, 211-217.
 99. Georgiou G.P., Taylor C.E. Proceedings 15th Intern. Congress Entomology. *Entomological Society of America*, College Park, Maryland, 1977, 759-785.
 100. Georgiou G.P. Insecticide resistance and prospects for its management. *Research review*, 1980, 76, 131-144.
 101. Gillies M.T., De Meillon D. The Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publications: South African Institute for Medical Research*, 1968, 54, 343.

102. Gillies M.T., Coetzee M.A. Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara, 2nd edn. *Publications: South African Institute for Medical Research*, 1987, 55,143.
103. Graham K., Kayedi M.H., Maxwell C., Kaur H., Rehman H., *et al.* Multi-country field trials comparing wash-resistance of PermaNet and conventional insecticide-treated nets against anopheline and culicine mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 2005, 19, 72-83.
104. Grant D.F., Matsumura F. Glutathion S-Transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1989, 33, 132-143.
105. Greenwood B.M., Bojang K., Whitty C.J., Targett G.A. Malaria. *Lancet*, 2005, 365, 1487-98.
106. Guillet P., Alnwick D., Cham M.K., Neira M., Zaim M., Heymann D., Mukelabai K. Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. *Bulletin of World Health Organization*, 2001a, 79, 998.
107. Guillet P., N'guessan R., Darriet F., Traore L.M., Chandre F., Carneval P. First trials of combined pyrethroid and carbamate treated mosquito nets active against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* s.s. and *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2001b, 15, 105-112.
108. Hamon J., Mouchet J. La résistance aux insecticides chez les insectes d'importance médicale: méthodes d'études et situation en Afrique au Sud du Sahara. *Médecine Tropicale*, 1961, 21, 564-596.
109. Harbach R.E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 2004, 94, 537-53.
110. Hardstone M.C., Leichter C.A., Scott J.G. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *Journal of Evolutionary Biology*, 2009, 22, 416-423.
111. Hargreaves K., Koekemoer L., Brooke B.D., Hunt R.H., Mthembu J., Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 2000, 14, 181-189.
112. Hargreaves K., Hunt R.H., Brooke B.D., Mthembu J., Weeto M.M., Awolola T.S., Coetzee M. *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003, 17, 417-422.

113. Hassal K.A. The biochemistry and uses of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. *VCH Publishers Inc*, 1990, 536pp.
114. Hawley W.A., Phillips-Howard P.A., Ter Kuile F.O., Terlouw D.J., Vulule J.M., Ombook M., Nahlen B.L., Gimnig J.E., Kariuku S.K., Kolczak M.S., Hightower A.W. Community-wide effects of Permethrin treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2003, 68(4), 121-127.
115. Hemingway J., Hawkes N.J., Mccarroll L., Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 2004, 34, 653-665.
116. Henry M.C., Assi S.B., Rogier C., Dossou-Yovo J., Chandre F., Guillet P., Carnevale P. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Côte d'Ivoire. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 73, 859-864.
117. Henry M., Diallo F., Bordes J., Ka S., Pradines B., Diatta B. Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* slisolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 75, 146-151.
118. Hightower A., Kiptui R., Many A., Wolkon A., Vanden Eng J.L., Hamel M., Noor A., Sharif S.K., Buluma R., Vulule J., Laserson K., Slutsker L., Akhwale W. Bed net ownership in Kenya: the impact of 3.4 million free bed nets. *Malaria Journal*, 2010, 9, 183.
119. INSAE. Fichier village Ouémé. Mai, 2004. 29pp
120. Keating J., Locatelli A., Gebremichae A., Ghebremeskel T., Mufunda J., Mihreteab S., Berhane D., Carneiro P. Evaluating indoor residual spray for reducing malaria infection prevalence in Eritrea: results from a community randomized control trial. *Acta Tropica*, 2011, 119(2-3), 107-113.
121. Kelly-Hope L., Ranson H., Hemingway J. Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. *Lancet Infectious Diseases*, 2008, 8, 387-389.
122. Kigozi R., Baxi S.M., Gasasira A., Sserwanga A., Kakeeto S., Nasr S., Rubahika D., Dissanayake G., Kamya M.R., Filler S., Dorsey G. Indoor Residual Spraying of Insecticide and Malaria Morbidity in a High Transmission Intensity Area of Uganda. *PLoS ONE*, 2012, 7(8), e42857.

123. Kilian A., Byamukama W., Pigeon O., Atieli F., Duchon S., Phan C. Long-term field performance of a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in rural Uganda. *Malaria Journal*, 2008, 7, 49.
124. Kilian A., Wijayanandana N., Ssekitoleeko J. Review of delivery strategies for insecticide treated mosquito nets: are we ready for the next phase of malaria control efforts? *TropIKA net Journal*, 2010, 1, 1.
125. Kinde-Gazard D., Gbenou D., Tohon C., Da Silva C., Nahum A., Massougbodji A. Indicateurs de suivi et d'évaluation en 2001 de l'initiative « Faire reculer le paludisme » au Bénin. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2004, 97, 349-352.
126. Kiszewski A., Mellinger A., Spielman A., Malaney P., Sachs S.E., Sachs J. A global index representing the stability of malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 70, 486-98.
127. Koenrardt C.J.M., Majambres, Hemerik, Takken W. The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae s.l.* *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2004, 112, 125-134.
128. Koffi A.A., Tia E., Carnevale P., Chandre F. Rapport final Projet MIM1-Equipe de Côte d'Ivoire: Bouaké. 2002, 48pp.
129. Kolaczinski J.H., Fanello C., Herve J.P., Conway D.J., Carnevale P., Curtis C.F. Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bulletin of Entomological Research*, 2000, 90, 125-132.
130. Kumar A., Sharma V.P., Thavaselvam D., Sumodan P.K., Kamat R.H., Audi S.S., Surve B.N. 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. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1996, 12(3 Pt 1), 409-413.
131. Leeper J.R., Roush R.T., Reynolds H.T. (1986) Preventing or managing resistance in arthropods. In: populations, (ed.) Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management populations. National Academy Press, Washington, D.C., 1986, 335-346.
132. Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Review*, 2004, 2, 55pp.

133. Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria (Review). *The Cochrane Library*, 2008, 3, 55pp.
134. Lepoivre P. Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. *De Boeck Université*, 2003, 432pp.
135. Lindsay S., Gilson M. Bednets revisited – old idea, new angle. *Parasitology Today*, 1998, 4, 270- 272.
136. Lines J. Review: mosquito nets and insecticides for net treatment: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa. *Tropical Medicine and International Health*, 1996, 1, 616-632
137. Louis J.P., Albert J.P. Malaria in the Republic of Djibouti. Strategy for control using a biological antilarval campaign: indigenous larvivorous fishes (*Aphanius dispar*) and bacterial toxins. *Médecine Tropicale*, 1988, 48, 127-31.
138. Lundwall E., Pennetier C., Corbel V., De Gentile L., Legros F. Malaria: what about exposure prophylaxis? *Revue du Praticien*, 2005, 55, 841-848.
139. Maharaj R., Casimiro S., Mthembu S.D., Sharp B.L. The residual life of bendiocarb: a fiel-based evaluation from Mozambique. *Journal of Medical Entomology*, 2004, 41(1), 130-132.
140. Malcolm C.A. Current status of pyrethroid resistance in anophelines. *Parasitology Today*, 1988, 4 (7), 13-16.
141. Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M. Plasmodies –Malaria- Formes cliniques, diagnostic, Encyclopédie médicale et Chirurgicale. *Maladies infectieuses*, 2000, 8 – 507- A-20, 16pp.
142. Marbiah N.T., Petersen E., David K., Magbity E., Lines J., Bradley D.J. A controlled trial of lambda-cyhalothrin-impregnated bed nets and/or dapsone/pyrimethamine for malaria control in Sierra Leone. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 58, 1-6.
143. Martinez Torres D., Chandre F., Williamson M., Darriet F., Berge 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 Molecular Biology*, 1998, 7, 179-184.
144. Matovu F., Goodman C., Wiseman V., Mwengee W. How equitable is bed net ownership and utilisation in Tanzania? A practical application of the principles of horizontal and vertical equity. *Malaria Journal*, 2009, 8, 109.

145. Maxwell C.A., Chambo W., Mwaimu M., Magogo F., Carneiro I.A., Curtis C.F. Variation of malaria transmission and morbidity with altitude in Tanzania and with introduction of alphacypermethrin treated nets. *Malaria Journal*, 2003, 2, 28.
146. McCabe E.T., Barthel W.F., Gertler S.I., Hall S.A. Insect repellents, III, N, Ndiethylamides. *Journal of Organic Chemistry*, 1954, 19, 493.
147. Mckenzie J.A., Whitten M.J. Selection for insecticide resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilla cuprina*. *Experientia*, 1982, 38, 84–85.
148. Ministère de la Santé de la République du Bénin. Annuaire des statistiques sanitaires SNIGS/DPP/MS, 2007, 248pp.
149. Ministère de la Santé. Annuaire des statistiques sanitaires des départements de l'Ouémé et du Plateau 2010. Direction de la Programmation et de la Prospective, 2011, 91pp.
150. Mouchés C., Pasteur N., Berge J.B., Hyrien O., Raymond M., De Saint Vincent B.R., De Silvetri M., Georghiou G.P. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, 1986, 233, 778-780.
151. Mouchet J., Hamon J. Les problèmes techniques de l'éradication du paludisme en Afrique. *Cahier Orstom, Série Entomologie Médicale*, 1963, 33, 39-48.
152. Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Fontenille D., Ravaonjanahary C., Richard A., Robert V. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers Santé*, 1993, 3, 220-238.
153. Mouchet J. DDT and public health. *Santé*, 1994, 4, 257-262.
154. Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J. Biodiversité du paludisme dans le monde. (Eds) John Libbey Eutotext, 2004, 428pp.
155. Muller P. DDT, das insektizid dichlorophenyltrichloroethan und seine bedeutung. *Basel: Birrklauser*, 1955, 29-89.
156. Müller P., Chouaïbou M., Pignatelli P., Etang J., Walker E.D., Donnelly M.J., 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. *Molecular Ecology*, 2008, 5, 10-11.
157. Nauen R. Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Management Sciences*, 2006, 62, 690-692.
158. Ndiath M.O., Brengues C., Konate L., Sokhna C., Boudin C., Trape J.F., Fontenille D. Dynamics of transmission of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles arabiensis* and the

- molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* in Dielmo, Senegal. *Malaria Journal*, 2008, 7, 136.
159. Nentwig G. Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitology Research*, 2003, 90 (Supp 1), 40-48.
 160. Nguena Nguefack H.L. Analyse Statistique des facteurs qui déterminent la rémanence des traitements insecticides. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master de Statistique Appliquée. *ENSP de Yaoundé*, Octobre 2010, 100pp.
 161. N'guessan R., Corbel V., Akogbéto M., Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13, 199-206.
 162. N'guessan R., Boko P., Odjo A., Chabi J., Akogbéto M., Rowland M. Control of Pyrethroid and DDT-resistant *Anopheles gambiae* by Application of Indoor Residual Spraying or Mosquito Nets Treated with a Long-lasting Organophosphate Insecticide, Chlorpyrifos-methyl . *Malaria Journal*, 2010, 9, 44.
 163. Nikou D., Ranson H., Hemingway J. An adult-specific CYP6P450 gene is over expressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, 2003, 318, 91-102.
 164. Okumu F.O., Moore S.J. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malaria Journal*, 2011, 10, 208.
 165. OMS. Comité d'experts du paludisme, 6^e édition. Genève : OMS-Série Rapport technique n° 123, 1957, 4-5.
 166. OMS. Paludisme, Bureau de l'information 1211 Genève 27, 12 Mars 1996, 12pp.
 167. OMS. Tests procedures for insecticide resistance, monitoring in malaria vectors. Bio-efficacy and persistence of insecticide in treated surfaces. Report of the WHO informal consultation, 1998, 17-20.
 168. OMS. Rapport sur la santé dans le monde. Pour un réel changement. 1999, 131pp.
 169. OMS. Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs. 2002, 102pp.
 170. OMS. Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets. *WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11*, 2005a, 18pp.
 171. OMS. La santé et les objectifs du Millénaire pour le développement. 2005b, 84pp.
 172. OMS. Paludisme lutte antivectorielle et protection individuelle. Suisse: Genève, 2006, 253pp.

173. OMS. Rapport 2009 sur le paludisme dans le monde. 2009, 78pp. Disponible sur l'internet à: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html
174. Ossè R., Aikpon R., Padonou G., Oussou O., Yadouleton A., Akogbeto M. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasites and Vectors*, 2012, 5, 163.
175. Padonou G. Evaluation en cas expérimentales de l'efficacité de quelques insecticides pyrèthroïdes, organophosphorés et carbamate en pulvérisation intradomiciliaire. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master d'entomologie appliquée. Faculté des Sciences et techniques. Université d'Abomey Calavi, 2008, 25pp.
176. Padonou G. Contrôle de *Anopheles gambiae* (Diptera, Nematocera, Culicidae), vecteur du paludisme, par le bendiocarb en pulvérisation intradomiciliaire à grande échelle dans le département de l'Ouémé au Bénin. Thèse de doctorat, Université d'Abomey-Calavi, 2012, 258pp.
177. Padonou G.G., Sezonlin M., Gbedjissi G.L., Ayi I., Azondekon R., Djènantin A., Bio-Bangana S., Oussou O., Yadouleton A., Boakye D., Akogbéto M. Biology of *Anopheles gambiae* and insecticide resistance: Entomological study for a large scale of indoor residual spraying in South East Benin. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 2011, 3(4), 59-68.
178. Padonou G.G., Sèzonlin M., Ossè R., Aizoun N., Oké-Agbo F., Oussou O., Gbédjissi G., Akogbéto 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. *Parasites and Vectors*, 2012, 5, 72.
179. Perera M.D.B., Hemingway J., Karunaratne S. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malaria Journal*, 2008, 7, 168.
180. Pluess B., Tanser F.C., Lengeler C., Sharp B.L. Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane Database Systematic Review*, 2010, 4, 46pp.
181. PNLP. Campagne de distribution gratuite de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action aux ménages du Bénin, Rapport général. MS Cotonou Bénin, janvier 2012, 66pp.
182. Pock Tsy J-M., Duchemin J.B., Marrama L., Rabarison P., Le Goff G., Rajaonarivelo V., Robert V. Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first

- evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal*, 2003, 2, 33.
183. Poupardin R. Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble 1, 2011, 275pp.
 184. Prapanthadara L., Hemingway J., Ketterman A.J. DDT resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-deshydrochlorinase activity of glutathione-S-Transferases. *Bulletin of Entomological Research*, 1995a, 85, 267-274.
 185. Prapanthadara L., Hemingway J., Ketterman A.J. Partial purification and characterization of glutathione-S-Transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1995b, 47, 119-133.
 186. Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin. Politique nationale de lutte contre le paludisme et cadre stratégique de mise en œuvre. MS Cotonou Bénin, 2005, 50pp.
 187. Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., Collins F.H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 2000a, 9, 491-497.
 188. Ranson H., Jensen B., Wang X., Hemingway J., Collins F.H. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 2000b, 9, 499-507.
 189. 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 Parasitology*, 2011, 27, 91-98.
 190. Reimer L.J., Tripet F., Slotman M., Spielman A., Fondjo E., Lanzaro G.C: An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14, 683-688.
 191. Rivero A., Vezilier J., Weill M., Read A.F., Gandon S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathogens*, 2010, 6(8), pii:e1001000.

192. Rooker S., Guillemaud T., Berge J., Pasteur N., Raymond M. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, 1996, 77, 555-561.
193. Rowland M., Freeman T., Downey G., Hadi A., Saeed M. DEET mosquito repellent sold through social marketing provides personal protection against malaria in an area of all-night mosquito biting and partial coverage of insecticide-treated nets: a case-control study of effectiveness. *Tropical Medicine and International Health*, 2004a, 9, 343-350.
194. Rowland M., Downey G., Rab A., Freeman T., Mohammad N., Rehman H., Durrani N., Reyburn H., Curtis C., Lines J., Fayaz M. DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan. *Tropical Medicine and International Health*, 2004b, 9, 335-342.
195. Russell T.L., Lwetoijera D.W., Maliti D., Chipwaza B., Kihonda J., Charlwood J.D., Smith T.A., Lengeler C., Mwanyangala M.A., Nathan R., Knols B.G.J., Takken W., Killeen G.F. Impact of promoting longer-lasting insecticide treatment of bed nets upon malaria transmission in a rural Tanzanian setting with pre-existing high coverage of untreated nets. *Malaria Journal*, 2010, 9, 187.
196. Scholte E.J., Ng'habi K., Kihonda J., Takken W., Paaijmans K., Abdulla S., Killeen G.F., Knols B.G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Sciences*, 2005, 308 (5728), 1641-1642.
197. Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993, 49, 520-529.
198. Sharp B.L., Kleinschmidt I., Streat E., Maharaj R., Barnes K.I., Durrheim D.N., Ridl F.C., Morris N., Seocharan I., Kunene S., La Grange J.J.P., Mthembu D.J., Maartens F., Martin C.L., Barreto A. Seven years of regional malaria control collaboration, Mozambique, South Africa, and Swaziland. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007, 76(1), 42-47.
199. Sharp B.L., Ridl F.C., Govender D., Kuklinski J., Kleinschmidt I. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, 2007, 6, 52.
200. Skarbinski J., Massaga J.J., Rowe A.K., Kachur S.P. Distribution of free untreated bednets bundled with insecticide via an integrated child health campaign in Lindi

- Region, Tanzania: lessons for future campaigns. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007, 76 (6), 1100-1106.
201. Smith S.C., Joshi U.B., Grabowsky M., Selanikio J., Nobiya T., Aapore T. Evaluation of bednets after 38 months of household use in northwest Ghana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007, 77, 243-248.
 202. Snow R.W., Bradley A.K., Hayes R., Byass P., Greenwood B.M. Does woodsmoke protect against malaria? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1987, 81, 449-451.
 203. Soderlund D.M., Bloomquist J.R. Pesticide resistance in arthropods. New York: Roush, R. T. & Tabashnik, B. E. (eds). Chapman and Hall, 1990, 58pp.
 204. Stump A.D., Atieli F.K., Vulule J.M., Besansky N.J. Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004, 70, 591-596.
 205. Tabashnik B.E. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. *Journal of Economic Entomology*, 1989, 82, 1263-1269.
 206. Taylor C.E., Georgiou G.P. Suppression of insecticide resistance by alteration of gene dominance and migration. *Journal of Economic Entomology*, 1979, 72, 105-109.
 207. Thwing J., Hochberg N., Vanden Eng J., Issifi S., Eliades M.J., Minkoulou E., Wolkon A., Gado H., Ibrahim O., Newman R.D., Lama M. Insecticide-treated net ownership and usage in Niger after a nationwide integrated campaign. *Tropical Medicine and International Health*, 2008, 13(6), 827-834.
 208. Toe L.P., Skovmand O., Dabire K.R., Diabaté A., Diallo Y., Guiguemde T.R., Doannio J.M., Akogbéto M., Baldet T., Gruenais M.E. Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. *Malaria Journal*, 2009, 8, 175.
 209. Trape J-F. Contre: Les limites des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 2001, 94, 2 bis, 174-179.
 210. Trape J-F., Tall A., Diagne N., Ndiath O., Ly A.B., Faye J., Dieye-Ba F., Roucher

- C., Bouganali C., Badiane A., Sarr F.D., Mazenot C., Touré-Baldé A., Raoult D., Druilhe P., Mercereau-Puijalon O., Rogier C., Sokhna C. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11, 925–932.
211. United Nations. The Millennium Development Goals Report, 2008, 54pp. Accessed at: www.un.org on August 17, 2009.
 212. Vulule J.M., Beach R.F., Atieli F.K., Roberts J.M., Mount D.L., Mwangi R.W. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*, 1994, 8, 71-75.
 213. Vulule J., Beach R., Atieli F., Mcallister J., Brogdon W., Roberts J., Mwangi R., Hawley W. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Medical and Veterinary Entomology*, 1999, 13, 239-244.
 214. Wang J., Nguyen V., Glen J., Henderson B., Saul A., Miller L. H. Improved yield of recombinant merozoite Surface protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* using chemically defined media. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 90 (7), 838-47.
 215. Watkins W., Sibley C.H., Hastings I.M. The search for effective and sustainable treatments for *P. falciparum* malaria in Africa. A model of the selection of resistance by antifolate drugs and their combination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 72, 163–173.
 216. Weill M., Chandre F., Bengues C., Manguin S., Akogbéto M., Pasteur N., Guillet P., Reymond. The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9, 451-452.
 217. Weill M., Duron O., Labbe P., Berthomieu A., Raymond M. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Medical Sciences*, 2003a, 19, 1190-1192.
 218. Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 2003b, 423(6936), 136-137.
 219. Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily

- detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13, 1-7.
220. Wirth M.C., Marquine M., Georghiou G.P., Pasteur N. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. Department of Entomology, University of California, Riverside 92521. *Journal of Medical Entomology*, 1990, 27(2), 202-206.
 221. Wirtz R., Zavala F., Charoenvit Y., Campbell G., Burkot T., Schneider I., Esser K., Beaudoin R., Andre R. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bulletin of World Health Organization*, 1987, 65, 39-45.
 222. WHO. Resistance of disease vectors to pesticides. WHO/VBC/76.609, 1976, 10pp.
 223. WHO. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. *Mimeogr. Doc.*, WHO/VBC/85.3, 1985, 23pp.
 224. WHO. Frequently Asked Questions on DDT Use for Disease Vector Control. WHO/HTM/RBM/2004.54. Genève: OMS, 2004, 12pp.
 225. WHO. Report on the implementation of IRS in the Africa region. 2007a. Site web: http://www.afro.who.int/vbc/reports/report_on_the_implementation_of_irs_in_the_african_region_2007.pdf
 226. WHO. Report on the Tenth WHOPES working Group Meeting. *World Health Organization, Geneva*, WHO/CDS/NTD/WHOPES/2007.1, 2007b, 97pp.
 227. WHO. World Malaria Report. *Geneva, WHO*, 2008, 190pp.
 228. WHO. World Malaria Report 2009. *World Health Organization, Geneva*, 2009, 78pp. Site web: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html.
 229. WHO. World Malaria Report 2011. *Geneva, Switzerland: World Health Organization*, 2011. Site web: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed May 21, 2012)
 230. Yadouleton A.W., Asidi A., Djouaka R.F., Braima J., Agossou C.D., Akogbéto M.C. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal*, 2009, 8, 103.
 231. Yadouleton A., Padonou G., Asidi A., Moiroux N., Bio-Banganna S., Corbel V., N'guessan R., Gbénou D., Yacoubou I., Gazard K., Akogbéto M. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal*, 2010, 9, 83-88.
 232. Yadouleton A.W., Martin T., Padonou G., Chandre F., Alex A., Djogbenou L., Dabiré R., Aïkpon R., Glitoh I., Akogbéto M.C. Cotton pest management strategies on the

- selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* populations in northern Benin. *Parasites and Vectors*, 2011, 4, 60.
233. Zaim M., Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitology*, 2002, 18, 161-163.
234. Zhou G., Githeko A., Minakawa N., Yan G.L. Community-wide benefits of targeted indoor residual spray for malaria control in the Western Kenya Highland. *Malaria Journal*, 2010, 9(1), 67.

Annexes

Annexes 1 : Articles publiés et soumis

RESEARCH

Open Access

Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign

Razaki Ossè^{1,2*}, Rock Aikpon^{1,2}, Gil Germain Padonou^{1,2}, Olivier Oussou¹, Angès Yadouléton¹ and Martin Akogbéto^{1,2}

Abstract

Background: Since 2008, the National Malaria Control Program (NMCP) has been engaged in the implementation of indoor residual spraying (IRS) in Benin. The first and second round was a success with a drastic decrease of malaria transmission in areas under IRS. We present here the results of the third round. The purpose of this study was to compare the results of the third round of IRS to those achieved during the first two rounds. A second success of IRS will enable the Government of Benin to extend the strategy to other areas.

Methods: Mosquito collections were carried out in the department of Ouémé where the homes of four districts were treated with bendiocarb. In these districts, more than 350 000 inhabitants were protected by IRS. A fifth untreated district served as control. In the five districts, mosquito collections were organized to follow the dynamics of malaria transmission and possible changes in the behavior of mosquitoes.

Results: A significant reduction in human biting rate was recorded after the third round of IRS, specifically in Adjohoun (89.78%), Dangbo (56.8%) and Misséréte (93.22%) where an inhabitant received less than 2 bites of *An. gambiae* per night. During this same time, the entomological inoculation rate (EIR) declined dramatically in all areas under intervention (74.26% reduction). We also noted a significant reduction in longevity, the blood feeding rate of the vectors and an increase in exophily induced by bendiocarb on *An. gambiae* and *Mansonia spp.*

Conclusion: The present study showed, once again, the effectiveness of bendiocarb on anopheles populations resistant to pyrethroids. This product can be recommended in combination with other insecticides for the management of vector resistance to insecticides.

Keywords: *An.gambiae*, EIR, Longevity, IRS, Bendiocarb, Resistance, Benin

Background

Despite much effort, malaria remains a serious public health problem in Africa. The estimated number of malaria cases worldwide in 2010 was 216 million and the vast majority (81%) was found in Africa. Africa accounts for 91% of 655,000 malaria deaths registered in 2010 in the world [1]. In Benin, in 2007 malaria

accounted for 43% of the cases and was also the primary cause of health facility admissions [2]. However, the international community is not discouraged. The “Roll Back Malaria” initiative launched on July 23rd, 1998 by The WHO and its partners, received a favorable response from heads of state in the North and peer endemic countries of Africa. In addition, malaria is one of the Millennium Development Goals (MDG) as one of the global targets for 2015 and the period 2001–2010 has been declared by the United Nations as «Decade to Roll Back Malaria in developing countries, particularly in Africa».

* Correspondence: ossraz@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, Bénin

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

It is in this context that the National Malaria Control Programme, which fully complies with all of these decisions to implement its strategies against malaria with two major directions in the field of vector control: the universal access to Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and Indoor Residual Spraying (IRS). But the main problem of the use of impregnated materials is the development of resistance. In recent years, insecticide resistance was widespread in West Africa [3-6], in East Africa [7], in Central Africa [8] and South Africa [9,10].

In addition, N'Guessan *et al.* [11] reported a decrease in the effectiveness of treated nets and indoor residual spraying of lambda-cyhalothrin in experimental huts in areas of high resistance of mosquitoes in southern Benin. If these reports seem worrying, they need to be placed in context as was done in the discussion of this article. This study was carried out at the experimental hut level and it is still difficult to extrapolate what will happen at the community level. Therefore, this paper aims to investigate the effectiveness of indoor residual spraying using bendiocarb at the community level, but in the presence of high resistance of *An. gambiae* to pyrethroids.

Moreover, according to Rowland [12], the implementation of a resistant management strategy should take into account the resistance mechanisms involved. According to this author, the resistance mechanism in the M form of *An. gambiae* is probably the cause of the reduction in the effectiveness of pyrethroid-impregnated materials. In addition, recent results in phase III in Tori-Bossito, Benin, where indoor residual spraying of insecticide has been implemented on a population of ten thousand inhabitants, failed to draw valid conclusions [13]. According to Akogbéto *et al.* [14], the impact of IRS on malaria transmission in Tori-Bossito was not significantly different from the control area (area where children under five years old and pregnant women were protected by LLINs). According to these authors, this insignificant impact is due to the size of populations covered by IRS. A population of ten thousand persons corresponds to a small village. It is therefore essential to study the effectiveness of malaria vector control methods (IRS and LLINs) taking into account two factors: the presence of vector resistance to insecticides and the size of the human population to be protected.

Taking into account the first factor, Zaim *et al.* [15] recommend the search for alternatives to resistance management. Therefore, since 2008 in Benin, the NMCP decided to use non-pyrethroid insecticides in indoor residual spraying in areas of vector resistance to insecticides [16]. For this reason, during the IRS operation launched by NMCP with support from PMI in 2008 in the Ouémé department, bendiocarb was used. The

choice of bendiocarb was made after an evaluation in phase II of several insecticides [16].

The second factor taken into account in this study is the size of the population covered. The IRS campaign of Ouémé is a major operation which covered about 500 000 inhabitants.

From July 2008 to April 2010, three rounds of IRS have been implemented. The treatment of the houses was made by a Non-Governmental Organization, the Research Triangle Institute (RTI) with community participation. According to Akogbéto *et al.* [14], the first two rounds were a great success reducing malaria transmission by 94%.

This survey presents the results of the third round of IRS using bendiocarb in Benin. Thus, we followed the dynamics of malaria transmission in area under the third round of IRS. The recorded data were compared with those of the test year. The entomological monitoring focused on the feeding behavior, the physiological age and entomological inoculation rate of anopheline mosquitoes and the feeding behavior of culicine mosquitoes was considered as well.

Methods

Study areas

The survey was conducted in four districts of Ouémé department (Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè) in southern Benin (Figure 1). In each district, two localities were chosen: one located in a central plateau and the other located in the peripheral valley characterized by the presence of temporary and permanent mosquito breeding habitats, respectively. This district has essentially a sub-equatorial climate, with two dry seasons (August-September and December-March) and two rainy seasons (April-July and October-November). The annual mean rainfall is 1,500 mm in July, relative humidity (RH) of $70\% \pm 5$ and the average monthly temperature varies between 23 and 32°C.

The data from these four districts under IRS intervention were compared with those of a control area (district of Adjara) with the same characteristics but where none of the houses had been sprayed. The 4 intervention districts and the control district are located in the same department, the department of Ouémé. The five areas are populated by the same people, the Ouémènou and Goun, who are mostly traders, artisans and officials. The entire population of each district has access to a hospital. Through the efforts of the National Malaria Control Program, access to the targeted coverage with ITNs has become a reality. However, Adjohoun, Dangbo and Sèmè districts are located on the banks of perennial streams. Furthermore, the choice of catch localities took into account the distribution of the breeding sites, except that any disparity in the distribution of breeding

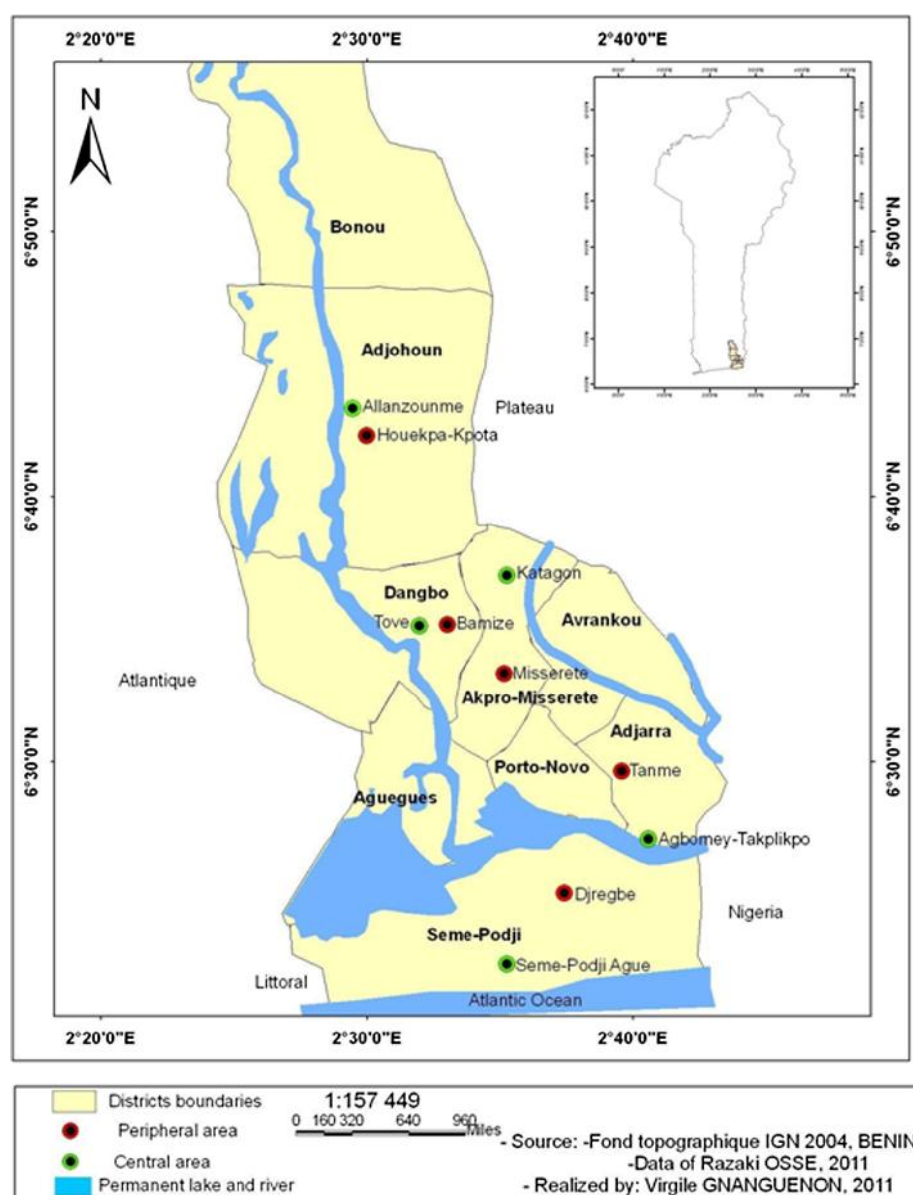


Figure 1 Map of the study area.

sites especially in the districts of intervention and control district could affect the results concerning the impact on mosquito densities. Then, the position of houses relative to permanent and semi permanent breeding sites would be a major criterion of the choice of catch localities in the 5 districts.

In the current promotion of ITNs in all countries of the south Sahara, it is difficult to compare an IRS area, a non-IRS area and non-LLINs area. The four districts under IRS (Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè) and the control district (Adjara) belong to the same department (Ouémé). All of the five districts are covered by LLINs in the targeted coverage: Children under 5 years

and pregnant women receive LLINs from the NMCP. All the five districts have in common the use of LLINs by both vulnerable populations. The only difference in terms of control interventions is the IRS in Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè. Hence, we consider that any reduction in malaria transmission in these four districts in relation to the control district is due to the IRS.

Implementation of intervention

Before IRS intervention, the choice of an insecticide was necessary. Various insecticides were evaluated over a period of 4 months in experimental huts. Three of them (Sumithion 40 WP [Fenitrothion]; Master Quick ZC

[mixture of chlorpyrifos 250 g/l + deltamethrin 12 g/l] and Ficam M [bendiocarb, 800 g/kg]) were effective against mosquitoes resistant to pyrethroids. Of the three insecticides, bendiocarb was the product chosen by the NMCP for the IRS implementation [16].

Indoor residual spraying using bendiocarb was applied at a rate of 400 mg/m² in Adjohoun, Dangbo, Misséréte and Sèmè district. The formulation used was the FicamTM WP in the water-soluble form packaged in sachets of 250 g. Over 90% of households were treated. The first and second IRS operations were made in July 2008 and March 2009 respectively. In 2010, the third round took place in March-April. The three IRS operations were carried out by volunteers recruited from the local community and trained by the Research Triangle Institute (RTI) team, USAID's implementing partner. The treatment of the walls was done with a manual pressure sprayer of the HUDSON XPERT type. Before treatment, sprayers were protected with a laboratory coat, gloves, boots and a helmet for safety.

Mosquito sampling

Human landing catch

In each district, a central and a peripheral area were selected. Monthly, mosquito collections were carried out from 9 p.m. to 5 a.m. inside and outside houses using a mouth aspirator, by human volunteers who had previously given consent. Two nights of mosquito collections a month were carried out for eight months (before and after intervention). A total of eight night catches were conducted in each locality for a total of 64 night catches per month in the four districts. These catches were made from April to July 2008 (before intervention) and from April to July 2010 (after the third round of IRS). In each district, two houses and four collectors were selected per area for the collection of mosquitoes. The recorded data were used to assess the aggressiveness (HBR), the physiological age and the entomological inoculation rate vectors (EIR).

Exit window trap catch

Moreover, in order to assess the impact of interventions on exit induced by the presence of bendiocarb, we sampled mosquitoes using windows exit traps and morning pyrethrum spray catches (PSC). Therefore, in each area, eight bedrooms were selected for mosquito collection in the morning. Exit traps were put over the windows of every bedroom retained. Mosquitoes were collected for 2 nights each month from 6 p.m. to 6 a.m. next day. The houses where the traps were set were selected based on the number of people who slept in them (01 sleeper per hut). The houses were built of mud and wood with a sheet-metal roof and the eve was tight. The area between the upper walls and the roof is closed.

The exit window traps used were made of a terylene netting mounted on a 30 cm cubical metallic frame. The entrance side was drawn into a truncated cone with a 2.5 cm diameter hole at its apex, which was 2.5 cm from the opposite face of the trap. In addition to that, mosquitoes resting in the house were collected by Morning Spray Catch (MSC) from 7 a.m. to 9 a.m. The collections from the window traps were done in the morning using a mouth aspirator. Morning pyrethrum spray catches were done using pyrethrum spray and white canvas spread on the floor to collect knocked down mosquitoes. These two sampling methods led to an accurate estimation of the total density of mosquito species in the treated houses and the proportion of female mosquitoes exiting from the houses. Exit rate is estimated by mosquitoes which have escaped treated walls and have been retained in the exit window traps. Anopheles mosquitoes collected were classified according to the state of their abdomens.

Mansonia spp. and *Culex spp.* are vectors of viral diseases and filarial nematodes. In the area, a high proportion of these mosquitoes was recorded. Moreover, *Culex quinquefasciatus* is highly resistant to pyrethroids in the study area. In spite of this resistance, the IRS significantly reduced the density of these species of mosquito or increased exophily. These results indicated a successful prospect concerning the use of bendiocarb. We therefore determined the impact of the IRS on the behavior of those mosquitoes.

Laboratory processing

After each night catch, mosquitoes were sorted by genus as anopheline and culicine and counted. Anophelines were morphologically identified to species using taxonomic keys of Gillies & De Meillon [17] and Gillies & Coetzee [18]. Ovaries from randomly selected female *An.gambiae s.l.* specimens captured on human landing catches were dissected to determine parity rate, by observing the degree of coiling of ovarian tracheoles [19]. Mosquito infectivity rates were determined from head and thorax of all female anopheline specimens by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) as described by Wirtz *et al.* [20]. The carcass of these females (abdomens, wing and legs) were stored in individual tubes with silicagel and preserved at -20°C in the laboratory for identification of species and characterization of molecular forms within the *An.gambiae* complex as previously described [21,22].

Data analysis

The human biting rate [number of bites/man/night] (ma), the sporozoite rate (Is) and the entomological inoculation rate (EIR) were determined. The percentages of reduction of biting rate (HBR) and EIR were calculated after the

intervention. Parturity rates, exophily and blood feeding rate were evaluated. Comparisons of these rates were made by the Chi-square test.

Ethical consideration

Ethical approval for this study was granted by the Ethical Committee of the Ministry of Health in Benin. The mosquito collectors gave prior informed consent and they

were vaccinated against yellow fever. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive treatments of malaria.

Results

Species and molecular forms of *Anopheles gambiae*

PCR revealed 100% of mosquitoes tested were *Anopheles gambiae* s.s. M form.

Table 1 Entomological Inoculation Rate (EIR) and Human Biting Rate (HBR) observed before and after IRS intervention

Localities	Variables	Before intervention April-July 2008	After intervention April-July 2010	% Reduction
Adjohoun	Tnber	207	19	
	Man night	64	56	
	HBR	3,23	0,33	89,78
	S%	5,71	10,52	
	EIR (b/m/n)	0,18	0,034	81,11
	EIR/month	5,4	1,02	
	EIR/period	21,6	4,08	
Dangbo	Tnber	280	106	
	Man night	64	56	
	HBR	4,375	1,89	56,8
	S%	4,49	2,83	
	EIR (b/m/n)	0,19	0,053	72,11
	EIR/month	5,7	1,59	
	EIR/period	22,8	6,36	
Misséréké	Tnber	944	56	
	Man night	64	56	
	HBR	14,75	1	93,22
	S%	1,07	1,78	
	EIR (b/m/n)	0,15	0,018	88,13
	EIR/month	4,5	0,534	
	EIR/period	18	2,136	
Sèmè	Tnber	1592	724	
	Man night	64	56	
	HBR	24,88	12,93	48,03
	S%	3,5	1,96	
	EIR (b/m/n)	0,87	0,253	70,92
	EIR/month	26,1	7,59	
	EIR/period	104,4	30,36	
Adjara Control	Tnber		1117	
	Man night		56	
	HBR		19,95	
	S%		10,36	
	EIR (b/m/n)		2,067	
	EIR/month		62,01	
	EIR/period		248	

Tnber Total number, HBR Human Bite Rate, S% Sporozoite index, EIR (b/m/n) Entomological Inoculating Rate (infected bite/man/night).

Variation in *An. gambiae* human biting rates in localities under IRS coverage

The results of our research show a lower human biting rate during the third round of IRS in Adjohoun, Dangbo and Missérété districts where every person living in these districts receives less than two bites of *An. gambiae* per night. Indeed, in these districts, the reduction of human biting rate was 89.78% (0.33 bite/man/night after IRS against 3.23 before intervention), 56.8% (1.89 bites against 4.375) and 93.22% (1 bite against 14.75) respectively in Adjohoun, Dangbo and Missérété. However, in the fourth district under IRS intervention (Sèmè), the reduction observed was low, 12.93 bites of *An. gambiae* per man per night after the third round against 24.88 before the intervention (48.03% of reduction) (Table 1).

In the control area, the human biting rate was high: 20 bites per man per night during the same period (April-July 2010).

Variation of *Mansonia spp* and *Culex spp* human biting rates in localities under IRS coverage

The main mosquitoes which caused a nuisance in the study area were *Mansonia spp.* and *Culex spp.* They were found to be anthropophilic and exophagic. According to our results, the impact of IRS seems low on these 2 Culicinae compared to *An. gambiae*. The reduction of human biting rate observed in *Mansonia spp* and *Culex spp* was low compared to that of *An.gambiae*. With *Mansonia spp*, the reduction was 43.23%, 50.36%, 34.43% and 35% respectively in Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè (Table 2). Concerning *Culex spp*, there

is no impact. The reduction is too low in the districts of Adjohoun (4.65%), Dangbo (1.36%) and Missérété (8.95%). However, in Sèmè district, it is relatively high: 32% (Table 2).

Variation in entomological inoculation rate (EIR) in localities under IRS coverage

Before intervention (April-July 2008), each person received an average of 21.6, 22.9, 18 and 104.4 infected bites over a period of four months, respectively in Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè. After the third round of IRS, the rate dropped to 4.08 in Adjohoun, to 6.36 in Dangbo, to 2.136 in Missérété and to 30.36 in Sèmè (Table 1).

The comparison of EIR observed before and after intervention in each district reveals a decrease of 81.1%, 72.11%, 88.13% and 70.92% respectively in Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè (Table 1). In the control area, the rate was very high (248 infected bites/man/4 months) (Table 1).

Variation in the longevity of *An. gambiae* in localities under IRS coverage

For both periods, 1083 ovaries of *An. gambiae* were dissected. Before intervention (April-July 2008), the parity rate of *An. gambiae* was 68.54% in Missérété, 79.94% in Adjohoun. But after the third round of IRS, we observed a dramatic decline in this rate in all areas under intervention ($p < 0.05$). It went from 79.94% to 30% in Adjohoun and 68.34% to 32.14% in Missérété (Table 3).

Table 2 Human Biting Rate (HBR) of *Mansonia spp.* and *Culex spp.* observed before and after IRS intervention

Localities	Variables	<i>Mansonia spp.</i>			<i>Culex spp</i>		
		Before intervention April-July 2008	After intervention April-July 2010	% Reduction	Before intervention April-July 2008	After intervention April-July 2010	% Reduction
Adjohoun	Tnber	2160	1073		1539	1284	
	Man night	64	56		64	56	
	HBR	33,75	19,16	43,23	24,05	22,93	4,651
Dangbo	Tnber	2984	1296		2790	2408	
	Man night	64	56		64	56	
	HBR	46,63	23,14	50,36	43,59	43	1,362
Missérété	Tnber	936	537		236	188	
	Man night	64	56		64	56	
	HBR	14,63	9,589	34,43	3,688	3,357	8,959
Sèmè	Tnber	2750	1564		1054	630	
	Man night	64	56		64	56	
	HBR	42,97	27,93	35	16,47	11,25	31,69
Adjara Control	Tnber		397			433	
	Man night		56			56	
	HBR		7,089			7,732	

Table 3 Variation of parity rate of *Anopheles gambiae* s.l. collected during the long rainy season in 2008 before IRS intervention and in the same period after

Localities	Before intervention (April-July 2008)		After intervention (April-July 2010)		p-value
	Nber diss	P rate%	Nber diss	P rate%	
Adjohoun	70	79,94	10	30	0,001
Dangbo	89	78,03	41	46,34	0,000
Missérété	78	68,54	28	32,14	0,000
Sèmè	114	78,42	244	40,16	0,000
Control	93	70,97	316	81,01	0,019
Total	444	75,28	639	60,25	0,000

Nber diss Number collected and dissected, IRS Indoor Residual Spraying, P rate% Parity rate%.

Variation in induced exophily in *An. gambiae* in localities under IRS coverage

Before intervention, rate of induced exophily for Adjohoun, Dangbo, Misserete, and Sèmè was 30.95%, 36.90%, 27.08% and 35.57%, respectively (Table 4). After intervention, the rate of exophily was very high: 81.82% in Dangbo, 80% in Missérété and 75.68% in Sèmè. Compared to natural exophily, the difference was significant in all districts treated ($p < 0.05$). In Adjohoun, no *An.gambiae* were collected in windows traps or in the morning pyrethrum spray catches after intervention.

Variation in induced exophily in *Mansonia spp* and *Culex spp* in localities under IRS coverage

Exophily rate observed in *Mansonia spp* in Adjohoun (59.20%) and Sèmè (51.43%) was significantly different from that observed before intervention ($p < 0.05$). In Dangbo district, there was no significant difference between these two rates ($p = 0.196$) (Table 5).

In *Culex spp*, it was only in Adjohoun that a significant difference was observed between the exophily rates before and after intervention ($p < 0.05$). On the other hand, in Dangbo and Sèmè the exophily rate after IRS was not significantly different from before intervention ($p = 0.79$ and $p = 0.54$ respectively) (Table 5).

Variation in mosquito blood feeding rate in *An. gambiae* in localities under IRS coverage

The blood feeding rate observed after IRS in the treated areas was low (Table 6). Compared to that observed before intervention, the difference between the two rates is significant ($p < 0.05$) in all districts (Table 6). This rate was 9.09% after IRS against 54.76% before in Dangbo, 20% against 62.5% in Missérété and 35.14% against 54.90% in Sèmè.

Discussion

The strategy of indoor residual spraying (IRS) implemented by the National Malaria Control Program (NMCP) in the Ouémé department with the PMI support had a great impact on malaria transmission. In all districts under intervention, the density of *An. gambiae* (human biting rate) and the entomological inoculation rate (EIR) have significantly declined.

The results have shown that *An. gambiae* s.s. M form was the major malaria vector species biting in the study area. The same trend was found by Padonou *et al.* [23], which explained the absence of the S molecular form by the ecological characteristics of the Ouémé region.

After the implementation of the third round of IRS, the biting rate of anopheles dropped drastically. In Adjohoun, Dangbo and Missérété, the mosquito biting rates were less than 2 bites per person per night. This drastic drop is due to the lethal effect of bendiocarb on the anophelines resistant to pyrethroids [16].

Indeed, comparing the number of *An. gambiae* bites that a person receives in one night from April to July 2008 and April-July 2010, the rates were significantly reduced. These results were consistent with those of Akogbéto *et al.* [14] in the same study area.

Mansonia and *Culex* mosquitoes are abundant in the area. Indeed, the main objective is to determine the impact of indoor residual spraying on malaria transmission and on the behavior of anopheline mosquitoes, especially *An. gambiae*. But owing to the high proliferation of other mosquitoes in the study area especially *Mansonia spp.* and *Culex spp.*, it was an opportunity to determine the impact of the IRS on the behavior of those mosquitoes.

Table 4 Induced exophily in *An. gambiae* pre and post IRS operation using bendiocarb in 4 study localities

Localities	Before intervention (May-July 2008)			After intervention (May-July 2010)			p-value
	Total No	Nber exit window trap	Exit rate (%)	Total No	Nber exit window trap	Exit rate (%)	
Adjohoun	84	26	30,95	0	0	-	-
Dangbo	84	31	36,9	0	18	81,82	< 0,05
Missérété	288	78	27,08	5	4	80	< 0,05
Sèmè	388	138	35,57	0	28	75,68	< 0,05
Control	88	43	48,86	0	65	36,52	0,05

Total No Total number; Nber exit window trap Number exit window trap.

Table 5 Exit index on *Mansonia spp* and *Culex spp* by bendiocarb treated walls before and after IRS intervention

Localities	<i>Mansonia spp.</i>							<i>Culex spp.</i>						
	Before intervention (May-July 2008)			After intervention (May-July 2010)			p-value	Before intervention (May-July 2008)			After intervention (May-July 2010)			p-value
	Total No	Nber exit window trap	Exit rate%	Total No	Nber exit window trap	Exit rate%		Total No	Nber exit window trap	Exit rate%	Total No	Nber exit window trap	Exit rate%	
Adjohoun	128	20	15,63	27	16	59,26	p<0,05	132	20	15,15	67	46	68,66	< 0,05
Dangbo	20	8	40	139	77	55,4	p=0,196	56	20	35,71	198	67	33,84	0,79
Missérété		-	-	37	29	78,38	-	-	-	-	11	2	18,18	-
Sèmè	92	12	13,04	70	36	51,43	p<0,05	177	49	27,68	83	26	31,33	0,54
Control				228	37	16,23					52	33	63,46	

Total No Total number.

Missing this opportunity to check a possible change in Culicinae against the IRS would be a big loss of information that we could obtain with no supplementary effort.

In the area, *Culex quinquefasciatus* is highly resistant to pyrethroids. In spite of this resistance, the IRS significantly reduced the density of these species of mosquito or increased exophily. These results indicated a successful prospect concerning the use of bendiocarb. Certainly, as shown in the article, many of the *Mansonia spp* and *Culex spp* bite more outside than inside and enter houses and take their blood meal on man in the bedroom before going out. Therefore, the increase of *Mansonia spp* exophily in the IRS area could be comparative with the control area. But the impact of the third round of IRS is very low.

In *Mansonia spp*, a lower human biting rate was observed in all districts after the introduction of the third round of IRS. But in *Culex spp*, the reduction observed was very low. This could be due to multiple mechanisms of insecticide resistance present in the *Culex spp* [24]. Performance noted are also linked to higher coverage of the IRS (the coverage rate of the first round is 90%).

During the April-July 2008 period (before intervention), the entomological inoculation rate (EIR) was estimated at 64.8, 68.4 and 54 infected bites per year for *An.gambiae* respectively in Adjohoun, Dangbo and Missérété. These data were similar to those observed in similar areas in

southern Benin in 1990 [25,26] and in the city of Bouake in Cote d'Ivoire (67.3 infective bites per year) [27]. However, they were low compared to data recorded in Bancoumana, Mali (245 infective bites per person between June and October) [28]. Despite the relatively low EIR in the study area, in Sèmè and the control area (Adjara), the values were high (Table 1). These high rates of EIR were justified by the lack of LLINs in these environments.

The EIR was low in localities under IRS coverage. This shows that the IRS performed in four districts were a great success. Indeed, we had a reduction of 74.26% of EIR in the third round of IRS. However, in the work of Akogbéto *et al.* [14], this reduction was more than 94%. The efficacy of bendiocarb for large scale IRS was recently also demonstrated in Equatorial Guinea for *An. gambiae* where no infective mosquitoes were identified [29]. The difference between the reduction rates observed could be explained by the time between the second round (March 2009) and the third round (April 2010) of IRS. Indeed, in view of the low persistence of bendiocarb on the walls (3 to 4 months), after one year of IRS cessation, the people received infected bites of *An. gambiae* before the third round of PID. It is normal that after 12 months of IRS cessation, transmission resumes. This explains why 40% of mosquitoes positive for ELISA CSP were collected in April 2010 early in third round of IRS.

Table 6 Percentage of blood feeding *An. gambiae* collected in IRS by Pyrethrum Spray Catch (PSC) and in exit windows traps before (May-July 2008) and after (May-July 2010) interventions

Localities	Before intervention (May-July 2008)			After intervention (May-July 2010)			p-value
	Total No	Feed	Blood feeding rate (%)	Total No	Feed	Blood feeding rate (%)	
Adjohoun	84	44	52,38	0	0	-	-
Dangbo	84	46	54,76	22	2	9,09	< 0,05
Missérété	288	180	62,5	5	1	20	< 0,05
Sèmè	388	213	54,9	37	13	35,14	< 0,05
Control	88	52	59,09	178	112	62,92	> 0,05

Total No Total number, IRS Indoor Residual Spraying.

The EIR reduction is not only due to the large area covered by the IRS and the large protected population (500,000 inhabitants), the lethal effect of bendiocarb on mosquitoes resistant to pyrethroids [6,16], but also to the use of ITNs by children under five and pregnant women. The IRS area has become unfavourable for anopheles that died probably before the completion of the sporogonic cycle of *Plasmodium* due to a shorter longevity of *An. gambiae* in intervention areas. The effect of the carbamate bendiocarb on the walls inside a structure is harmful to mosquitoes. This could explain the high induction of exophily observed in *An. gambiae* and *Mansonia spp* (Tables 4 and 5). This high exophily induced by bendiocarb prevents mosquitoes from eating normally. This statement recalls the work of experimental huts of Asidi *et al.* [30], Darriet *et al.* [31] and N'Guessan *et al.* [32]. Indeed, some anopheles who managed to enter the houses could not take their blood meal before going out, which explains the very low blood feeding rate observed during the study (Table 6). However, very few mosquitoes are able to take their blood meal on the hosts in the house. The implementation of IRS should not exclude the use of LLINs by children and pregnant women.

Conclusion

The three IRS campaigns in the Ouémé department with the PMI support had a significant impact on malaria transmission in the treated areas. The results show that in the four districts, the human biting rate of mosquitoes dropped spectacularly. A reduction of 74.26% in the entomological inoculation rate was recorded after three rounds of IRS, due to the decline in the lifespan of *An. gambiae* in treated areas and high exophily induced by bendiocarb on mosquitoes. However, a combined use of the IRS and LLINs will further reduce the contact between humans and mosquitoes and therefore, the total decrease of transmission and the blood feeding rate. Such a strategy implicates an increase in the cost of malaria prevention and cannot be implemented everywhere. It must be reserved only for areas with the highest malaria transmission.

Implementation of IRS in the department of Ouémé with the support of PMI is a success. This is why the National Malaria Control Program (NMCP) decided to continue to implement this strategy in the Atacora department and other regions of Benin after Ouémé experience.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RO, RA, GGP, AY and MA designed the study. RO and OO carried out the field activities. RO drafted the manuscript and analyzed the data. MA, RO and RA critically revised the manuscript. MA conceived and designed the study

and revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgment

This work was financially supported by PMI (President's Malaria Initiative) through USAID. We thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) and the team of CREC for their technical assistance during field work and the laboratory. We also thank the people of Adjohoun, Dangbo, Misséréte and Sèmè for their collaboration.

Received: 10 May 2012 Accepted: 29 July 2012

Published: 8 August 2012

References

- World Health Organization: *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed 21.05.2012).
- Ministère de la Santé: *Annuaire des statistiques sanitaires 2006*. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2007.
- Elissa 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, Yakoubou S: **Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest.** *Bull Soc Path Exo* 1999, **92**:123–130.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, Carnevale P, Guillet P: **Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form.** *Parassitologia* 1999, **41**:319–322.
- Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, 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.
- Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ: **Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:591–596.
- Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C, Nwane P, Chouaibou M, Ndjemai H, Simard F: **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.
- Hargreaves K, Hunt RH, Brooke BD, Mthembu J, Weeto MM, Awolola TS, Coetzee M: ***Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2003, **17**:417–422.
- 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**:99–206.
- Rowland M: *Rapport RBM/WIN Meeting*. Basel, Switzerland; 2007:24–26. http://www.rollbackmalaria.org/partnership/wg/wg_itn/docs/rbmwin4ppt/4-4.pdf (accessed 17.11.2008).
- Djénontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudénoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F: **Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:83.
- Akogbéto M, Padonou G, Bankolé H, Kindé Gazard D, Gbédjissi G: **Dramatic decline of malaria transmission after implementation of large-scale Indoor Residual Spraying using bendiocarb in Bénin, West Africa, an area of high *Anopheles gambiae* resistance to pyrethroids.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**(4):586–593.
- Zaim M, Guillet P: **Alternative insecticides: an urgent need.** *Trends parasitol* 2002, **18**:161–163.
- Akogbéto M, Padonou G, Gbenou D, Irish S, Yadouleton A: **Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin. West Africa.** *Malar J* 2010, **9**:204.
- Gillies MT, De Meillon D: **The Anophelinae of Africa South of the Sahara.** *Publ South Afri Inst Med Res* 1968, **54**:343.

18. Gillies MT, Coetzee MA: **Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara, 2nd edn.** *Publ South Afri Inst Med Res* 1987, **55**:143.
19. Detinova TS, Gillies MT: **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 Organ* 1964, **30**:23–28.
20. Wirtz RA, Ballou WR, Schneider I, Chedid L, Gross MJ, Young JF, Hollingdale M, Diggs CL, Hockmeyer WT: ***Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in Escherichia coli.** *Exp Parasitol* 1987, **63**:166–172.
21. 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.
22. 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**:19–23.
23. Padonou GG, Sezonli M, Ossè R, Aizoun N, Oke-Agbo F, Oussou O, Gbedjissi 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.
24. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Acta Trop* 2007, **101**:207–216.
25. Akogbeto M: *Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin.* Université de Paris XI: Thèse de doctorat; 1992.
26. Akogbeto M, Modiano D, Bosman A: **Malaria transmission in the lagunar area of Cotonou (Benin).** *Parassitologia* 1992, **34**:147–154.
27. Dossou-Yovo J, Doannio JM, Diarrassouba S, Chauvancy G: **Impact d'aménagements de rizières sur la transmission du paludisme dans la ville de Bouaké, Côte d'Ivoire.** *Bull Pathol Exot* 1998, **91**:327–333.
28. Dolo A, Camara F, Poudiougou B, Touré A, Kouriba B, Bagayogo M, Sangaré D, Diallo M, Bosman A, Modiano D, Touré YT, Doumbo O: **Epidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana)-Etude entomo-parasitologique et clinique.** *Bull Soc Pathol Exot* 2003, **96**:308–312.
29. Sharp BL, Ridl FC, Govender D, Kuklinski J, Kleinschmidt I: **Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea.** *Malar J* 2007, **6**:52.
30. Asidi AN, N' Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW: **Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes.** *Malaria J* 2005, **4**:25.
31. Darriet F, N'Guessan R, Hougard J-M, Traoré-Lamizana M, Carnevale P: **An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts.** *Bull Soc Pathol Exot* 2002, **95**:299–303.
32. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Chabi J, Akogbeto M, Rowland M: **Control of pyrethroid and DDT resistant *Anopheles gambiae* by application of indoor residual spraying or mosquito nets treated with a long-lasting organophosphate insecticide, chlorpyrifos-methyl.** *Malaria J* 2010, **9**:44.

doi:10.1186/1756-3305-5-163

Cite this article as: Ossè et al.: Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasites & Vectors* 2012 **5**:163.

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

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

Razaki A Ossè^{1,2*}, Rock Aïkpon^{1,2}, Ghélus Louis Gbédjissi², Virgile Gnanguenon^{1,2}, Michel Sèzonlin², Renaud Govoétchan^{1,2}, Arthur Sovi^{1,2}, Olivier Oussou¹, Frédéric Oké-Agbo¹ and Martin Akogbéto^{1,2}

Abstract

Background: Indoor residual spraying (IRS) was implemented in the department of Ouémé-Plateau, southern Benin, in 2008 and withdrawn in 2011, when long lasting insecticidal nets (LLINs) were distributed to the communities that were previously targeted by IRS. Did the LLIN strategy provide a better level of protection against malaria transmission than IRS?

Methods: Entomological surveillance was carried out to assess indicators of transmission risk during the last year of IRS and the first year after the LLIN intervention was put in place (2010–2011). Mosquito biting density was sampled by human landing collection (HLC). Females of *Anopheles gambiae* s.l. were dissected to estimate the parity rates and the blood meal index. A subsample of the *An. gambiae* s.l. collection was tested for presence of *Plasmodium falciparum* sporozoites. In addition, window exit traps and pyrethrum spray catches were performed to assess exophagic behavior of *Anopheles* vectors.

Results: There were significant increases in all the indicators following withdrawal of IRS. Vector biting density ($p < 0.001$) and longevity ($OR = 3.81 [3.01-4.82]$ 95% CI; $p < 0.001$) of the *An. gambiae* s.l. increased significantly; so too did the blood meal index ($OR = 1.48 [1.1-1.99]$ 95% CI; $p < 0.001$). Entomological inoculation rate, after IRS withdrawal at one surveillance site, Adjohoun, rose two fold (9.0 infected bites/person/9 months (Apr-Dec 2011) versus 3.66 infective bites/person during the 9 months preceding IRS (Apr-Dec 2010). A second site, Missérété, experienced a six-fold increase after IRS cessation (15.1 infective bites/person/9 months versus 2.41 during IRS). Exophily after IRS cessation decreased significantly in all areas ($p < 0.001$) suggesting that mosquitoes were more likely to rest in houses with LLINs, than in houses subjected to IRS.

Conclusion: LLINs did not impact on indicators of transmission to the same levels as did IRS after IRS withdrawal.

Keywords: Indoor residual spraying (IRS), Long lasting insecticidal (mosquito) Net (LLIN), *An. gambiae* s.l., Entomological inoculation rate (EIR), Parity, Blood meal index, Behavior, Benin

* Correspondence: ossraz@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Calavi, Benin

Background

Malaria poses a serious obstacle to development in sub-Saharan Africa [1]. To control transmission, the National Malaria Control Program (NMCP) of Benin relies on an integrated approach to control the intense transmission, characteristic of many programs in this region, through vector-control, early diagnosis and treatment plus prophylaxis during pregnancy.

Malaria vector control is based on two interventions: the long lasting insecticidal (mosquito) net (LLIN) and indoor residual spraying (IRS), both of which have been shown to be effective throughout Africa [2,3]. In Zanzibar, the scale-up of insecticide-treated nets (ITN), indoor-residual spraying (IRS) and Artemisinin combination therapy (ACT) combined reduced malaria-related burden at health facilities by over 75% within 5 years [4]. For example, on Bioko Island, Equatorial Guinea, the simultaneous use of IRS, LLINs and Artemisinin Combination Therapy (ACT) resulted in a 90% drop in the presence of *P. falciparum* circumsporozoite antigen *An. gambiae* s.l. after 4 years. During the same period, malaria parasitaemia in children under 5 years old fell from 42% to 18% and mortality decreased 70% [5]. However, if a country cannot implement both universal IRS and LLINs at the same time, as is the case for most African countries, and makes a decision to withdraw one of the interventions, what would be the result?

The challenge has become sustaining such gains in the face of technical problems, e.g. vector resistance to insecticide, as well as lack of resources for annual renewal of each intervention [6,7]. In recent years, resistance to the pyrethroid insecticides that are used on LLINs, has seriously threatened the efficacy of interventions based on the use of pyrethroid insecticides. N'Guessan *et al.* [8] showed a decrease in the effectiveness of LLINs and IRS, using pyrethroid insecticides, in areas with high levels of vector pyrethroid resistance. Several recent studies conducted in Ouémé Department have showed that *An. gambiae* is highly resistant to pyrethroid and susceptible to bendiocarb [7-9]. The resistance to pyrethroids in our study area is due to the coexistence of metabolic mechanisms and a high frequency of the knockdown resistance mechanism *kdr* [10]. Similar resistance has now been observed across Africa [11-13].

The President's Malaria Initiative (PMI) of the United States Government, helped the NMCP initiate an IRS program in 2008. The IRS target was in the department of Ouémé-Plateau, where houses in four districts, Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè were sprayed with the carbamate insecticide, bendiocarb. In 2008 and 2009, one round of IRS was applied just before the start of the long seasonal rains that usher in the transmission season. In 2010, two IRS rounds were used to extend the IRS protective effect through the second (shorter) rainy season.

IRS was popular and effective. Entomological monitoring, carried out in conjunction with the IRS campaign [14,15], showed a significant drop in the density of female *An. gambiae* s.l. as well as in the entomological inoculation rate (EIR). At the same time, managers of health centers reported a 70% reduction of severe malaria cases.

IRS was withdrawn from Ouémé, and shifted northward to the Department of Atacora in 2011. The technical rationale for the change involved (1) the shorter transmission season in the north, which can be covered by one round of IRS; (2) a high malaria burden and (3) low LLIN coverage when compared with sites in the South [16].

The threat posed by the withdrawal of IRS from Ouémé was addressed by: (1) providing the former IRS target districts with LLINs (universal coverage of 1 net / 2 persons), and (2) continuing the entomological monitoring in the four districts. Monitoring results collected in 2011, following the withdrawal of IRS and distribution of LLINs (LLIN intervention) period, compared with similar results one year earlier, (during IRS) inform this study.

Methods

Study area

The study area is located in Ouémé Department and includes four districts: Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè (Figure 1), an area of approximately 1000 km². The total population is 310,400. There are approximately 65,000 households. In 2010, the incidence of malaria in the Ouémé Department was estimated at 12.6% [17]. Each district includes two different settings: a central area, or 'plateau', characterized by the presence of temporary mosquito breeding sites and a peripheral area, or 'valley', characterized by the presence of permanent mosquito breeding sites associated with numerous pools and swamps. The distance between the 'plateau' and 'valley' is higher than two kilometers. The entire region is characterized by a sub-equatorial climate, with two dry seasons (August-September and December-March) and two rainy seasons, April-July (long) and October-November (short). The average annual rainfall is 1500 mm with a relative humidity of 70 ± 5% and an average monthly temperature ranging from 23°C to 32°C.

The data from these four districts previously under IRS intervention were compared with those of a control area (district of Adjara) with the same characteristics but where none of the houses had been sprayed. The 4 districts and the control district are located in the same department, the department of Ouémé. The five areas are populated by the same

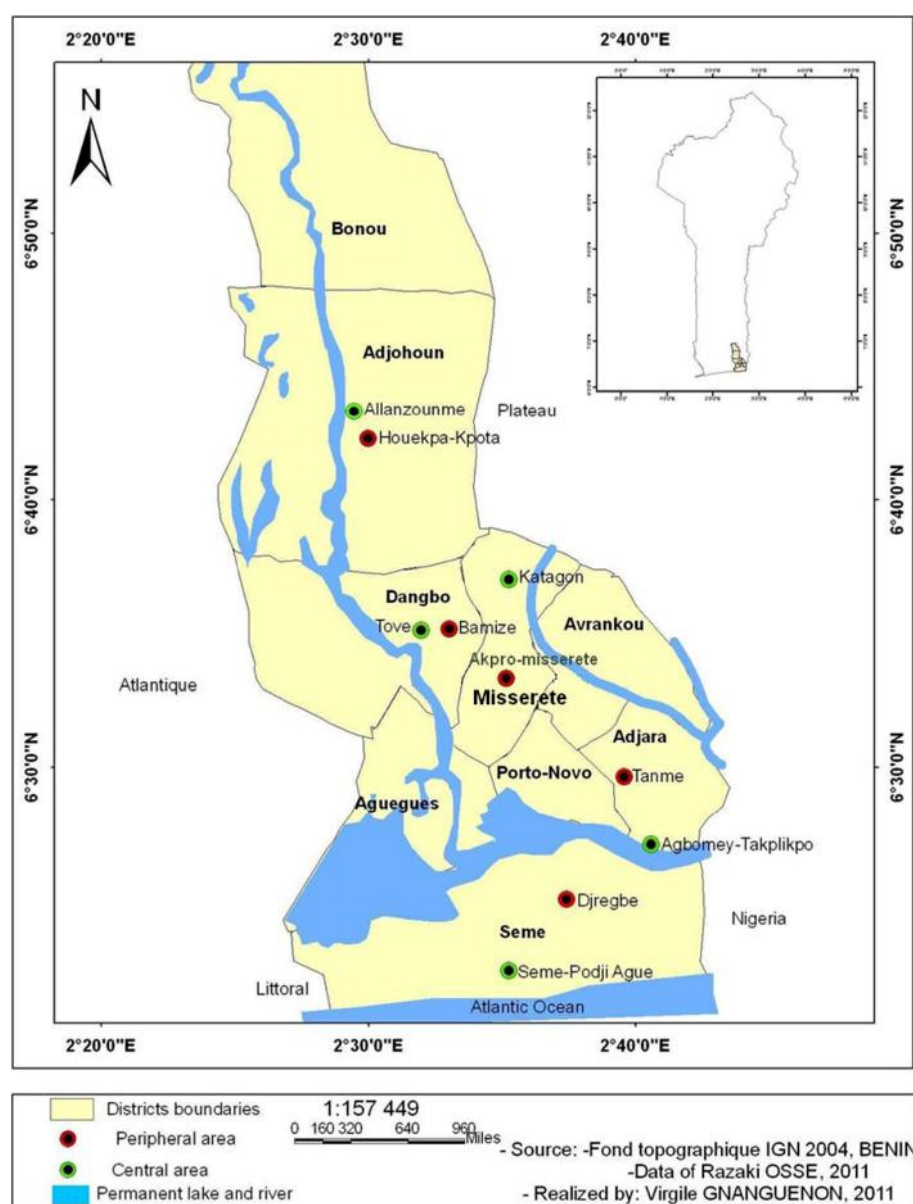


Figure 1 Map of the study area showing localities chosen in central and peripheral areas.

people, the Ouémènou and Goun, who are mostly traders, artisans and officials.

IRS Campaigns (2008–2010)

The product chosen by the NMCP to implement IRS in Ouémé was the carbamate class insecticide, bendiocarb. The formulation was 80% WP [18]. The target dosage was 0.4 g a.i./m². In 2008, 2009 and 2010, IRS preceded the long rainy season (March - April). In addition, in 2010, there was a fourth IRS round in August to extend IRS protection throughout the transmission season of the year. The four rounds were performed by volunteers chosen from the local community who were trained by

the PMI IRS partner. Each round covered over 90% of the households in the target districts.

2011 LLIN distribution

Distribution of LLINs was made by the NMCP in July 2011 and targeted all households in the study area. The coverage of LLINs distributed was 1 LLIN for 1.9 person and proportion of people sleeping under LLIN after the net distribution campaign was 81.76% (Ossè, personal communication). The LLINs, distributed after the withdrawal of IRS, were World Health Organization-approved Olyset® brand nets, rectangular in shape, 150 cm high × 180 cm long × 160 cm wide.

Entomological monitoring

Monthly mosquito collections occurred at sites located in both the 'plateau' and the 'valley' ecological zones in all four districts. There were human landing captures (HLCs) on two successive nights from 9:00 p.m to 5:00 a.m, each month, for eighteen (18) months (9 months for each intervention), from April to December 2010 (during the IRS intervention) and from April to December 2011 (after the withdrawal of IRS and the distribution of LLINs). The collection was carried out with an aspirator by adult volunteers who had given their informed consent. In each district, two houses were selected at random for the HLC. In each house, a collector was positioned inside and another outside. Considering the risk of malaria transmission, the collectors were given an antimalarial prophylaxis as a prevention against malaria. During the course of our study all mosquito collectors were monitored for malaria symptoms, which triggered an immediate parasitological test followed by an antimalarial treatment if necessary. Captured female *Anopheles gambiae s.l* were dissected to estimate the percentage of parous mosquitoes. The mosquitoes were then tested to determine the percentage that were positive for sporozoites based on an ELISA test [19].

To determine whether the shift from IRS to LLINs affected vector exophily, exit window traps and morning pyrethrum spray captures (PSCs) were done inside selected houses. Eight exit traps were placed in each district. The exit window traps used were made of a mesh of terylene (synthetic fiber) mounted on a cubical iron frame with an edge measuring 30 cm, with 1 side drawn into a funnel to direct mosquitoes into the trap [20]. The traps were put over the windows of selected houses for two nights per month from 6:00 p.m to 6:00 a.m next day. The houses where the traps were set were selected based on the number of people who slept in them. They were built of mud and wood with a sheet-metal roof and the eve was tight. The area between the upper walls and the roof is closed. Regarding the PSCs, we used the pyrethrum spray Rambo[®] and white canvas spread on the floor to collect knocked down mosquitoes from 7 a.m. to 9 a.m. The two sampling methods provided independent estimates of the vector density in the houses during IRS use and after its withdrawal as well as the proportion of female mosquitoes exiting from the houses. *Anopheles* mosquitoes collected by these two methods were classified according to the physiological state of their abdomen.

Processing mosquito collections to estimate biting density, indoor resting density, parity, blood meal index and *P. falciparum* sporozoite rate

Collected mosquitoes were separated into *Culicinae* and *Anophelinae* and then, counted. This was performed

using a binocular magnifying glass. The *Anophelinae* were put into cups to be identified to species [21,22]. The ovaries from a certain number of females *An. gambiae s.l.* from human landing catches were dissected to determine parity rates [23]. After this, all *Anopheles gambiae* were stored separately according to the locations they were collected, then labeled and conserved in Eppendorf tubes containing silica gel. The whole eppendorf tubes were stored in a freezer at -20°C for future testing by the method of enzyme immunoassay (ELISA CSP) [19].

Data analysis

Vector density during IRS and after its withdrawal was calculated. Vector biting density, indoor resting density, exophily and the entomological inoculation rates were estimated with confidence intervals at 95%. These rates during the IRS period and after its cessation, the LLIN period, were then compared, using a generalized Poisson model with analysis of deviance of the 2.11.1 version of R software, which takes into account the interdependence of observations in the same area. The proportion of parous females (females that had oviposited at least once) according to the periods was analyzed by logistic regression. The collection of mosquitoes through the windows trap and PSCs was used to estimate the total density of mosquitoes that entered the rooms and the proportion that exited. These data were used to calculate the exophily rate of the mosquitoes (proportion of mosquitoes caught in trap windows by the total number of mosquitoes caught) in each area in 2010 and 2011, as well as their blood feeding rate (number engorged divided by total collected). Significant differences were those with a p-value of <0.05.

Ethical consideration

Ethical approval for this study was granted by the Ethical Committee of the Ministry of Health in Benin. The mosquito collectors gave prior informed consent and they were vaccinated against yellow fever. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive treatments of malaria.

Results

Human biting rates (HBR) during the IRS campaign versus HBR following IRS withdrawal and distribution of LLINs

Mosquito biting rates in three of the districts increased after IRS was withdrawn. Also, a significant number of *An. funestus* was collected following the withdrawal of IRS in Missérété 'valley' area (14 in 2011 versus 1 in 2010). Table 1 compares *An. gambiae s.l.* biting rates during April - December 2010, during IRS intervention, with similar estimates from April to December 2011, following IRS withdrawal and LLIN installation (Table 1).

Table 1 Human biting rate of *An. gambiae* observed during IRS campaign and following IRS withdrawal

		During IRS				Following IRS withdrawal					
		(Apr.-Dec. 2010)				(Apr.-Dec. 2011)					
		Total mosquitoes	N human catch	HBR/night	HBR/period	Total mosquitoes	N human catch	HBR/night	HBR/period	IDR 95% IC	p-value
Adjohoun											
Central area	Inside	4	28	0.14	38.57	31	34	0.91	246.18	7.75 [6.38-9.42]	<0.001
	Outside	4	28	0.14	38.57	22	34	0.65	174.71	5.50 [4.51-6.71]	<0.001
Peripheral area	Inside	14	28	0.5	135	44	34	1.29	349.41	3.14 [2.81-3.51]	<0.001
	Outside	5	28	0.18	48.21	26	34	0.76	206.47	5.20 [4.35-6.21]	<0.001
Dangbo											
Central area	Inside	4	28	0.14	38.57	9	34	0.26	71.47	2.25 [1.81-2.79]	<0.001
	Outside	11	28	0.39	106.07	11	34	0.32	87.35	1 [0.86-1.16]	1
Peripheral area	Inside	70	28	2.5	675	58	34	1.71	460.59	0.83 [0.78-0.88]	<0.001
	Outside	37	28	1.32	356.79	25	34	0.74	198.53	0.68 [0.62-0.74]	<0.001
Missérété											
Central area	Inside	3	28	0.11	28.93	14	34	0.41	111.18	4.67 [3.7-5.88]	<0.001
	Outside	14	28	0.5	135	28	34	0.82	222.35	2 [1.78-2.25]	<0.001
Peripheral area	Inside	45	28	1.61	433.93	33	34	0.97	262.06	0.73 [0.68-0.79]	<0.001
	Outside	31	28	1.11	298.93	73	34	2.15	579.71	2.35 [2.18-2.54]	<0.001
Sèmè											
Central area	Inside	190	28	6.79	1832.14	51	34	1.5	405	0.27 [0.25-0.28]	<0.001
	Outside	329	28	11.75	3172.5	89	34	2.62	706.76	0.27 [0.26-0.28]	<0.001
Peripheral area	Inside	110	28	3.93	1060.71	58	34	1.71	460.59	0.53 [0.50-0.56]	<0.001
	Outside	217	28	7.75	2092.5	151	34	4.44	1199.12	0.70 [0.67-0.72]	<0.001
Adjara (Control)											
Central area	Inside	144	28	5.14	1388.57	6	34	0.18	47.65	0.042 [0.036-0.048]	<0.001
	Outside	137	28	4.89	1321.07	11	34	0.32	87.35	0.08 [0.07-0.09]	<0.001
Peripheral area	Inside	562	28	20.07	5419.29	349	34	10.26	2771.47	0.62 [0.61-0.64]	<0.001
	Outside	521	28	18.61	5023.93	426	34	12.53	3382.94	0.82 [0.8-0.84]	<0.001

N number.

HBR Human Bite Rate.

IDR Incidence Density Ratio.

IC Confidence interval.

A significant increase of *An. gambiae* s.l. HBR following the withdrawal of IRS was observed at most sites ($p < 0.001$) (Table 1). In Adjohoun, the average number of indoor bites was 86.78 bites/human/9 months during the IRS campaign against 297.79 after IRS withdrawal (Table 1). In this district, the outdoor aggressive density was significantly higher after IRS withdrawal and LLIN installation ($p < 0.05$) (43.39 bites/human/9 months in April-December 2010 against 190.59 bites/human/9 months after IRS withdrawal). The same observation was made in Missérété and central area of Dangbo (Table 1).

Regarding the overall human biting rate in the districts, in Adjohoun, the *An. gambiae* s.l. biting rate per

person increased from approximately 39 bites/person/9 months during the IRS intervention to 210 after IRS withdrawal in the 'plateau' area central ($p < 0.001$) and from 92 to 278 bites in the 'valley' area. The same kind of increase was observed in Missérété (from 82 to 167 bites/person/9 months after IRS withdrawal in the 'plateau' area ($p < 0.001$) and from 366 to 421 bites after IRS withdrawal in the 'valley' ($p < 0.001$). On the other hand, while the 'plateau' area in Dangbo saw an increase in HBR following withdrawal of IRS ($p < 0.001$) (Table 1).

In the 'valley' there was a decrease in HBR following withdrawal. In Sèmè the HBR after IRS withdrawal dropped significantly in both the plateau and valley zones ($p < 0.001$) (Table 1).

Annual rainfall confounds interpretation of HBR data

The highest anopheline densities were observed during the long (Apr - Jul) and the short (Oct - Nov) rainy seasons. However, annual differences in rainfall also affected HBR estimates. The high rainfall in Sèmè in 2010 justified the decrease of *An. gambiae* HBR from 1.31 bites/person to 17.38 in July 2010 against 1.31 to 9.5 in July 2011 (after IRS cessation) (Figure 2B). The high rainfalls in 2010 washed away some breeding sites of *An. gambiae* larvae. Moreover, the rainfalls recorded by ASECNA (Agency for Aerial Navigation Safety in Africa and Madagascar) in 2011 in Adjohoun during the same period were higher than in 2010 (Figure 2A). In return, the HBR obtained in 2011 (after IRS cessation) was higher than that recorded in 2010 (during IRS intervention) (0.19 to 2.18 in July 2011 against 0.31 to 0.44 in July 2010).

An. gambiae s.l. exophily reduced after IRS withdrawal

Figure 3 shows *An. gambiae* exophily during the IRS intervention period and after its withdrawal. While

exophily did not show a significant change after IRS withdrawal in Adjohoun, in the other three districts, a significant decrease was observed ($p < 0.001$) (Figure 3A and B). In Dangbo, the exophily rate decreased from 73% during IRS intervention to 44% after its withdrawal. The exophily rate in Missérété was 80% during IRS and 31% after withdrawal. Similarly, the exophily rate in Sèmè fell from 79% during IRS to 22% after withdrawal.

Anopheles gambiae s.l. longevity increases after IRS withdrawal

A total of 1681 *Anopheles* were dissected to estimate physiological age. The proportion of older female mosquitoes, e.g. those that had oviposited at least once, was significantly higher after IRS withdrawal in all four districts (OR = 3.81[3.01-4.82] 95% CI; $p < 0.001$). During IRS, the parity rate of *An. gambiae* s.l. observed in Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè was respectively 40%, 42%, 45% and 40%. However, after IRS withdrawal,

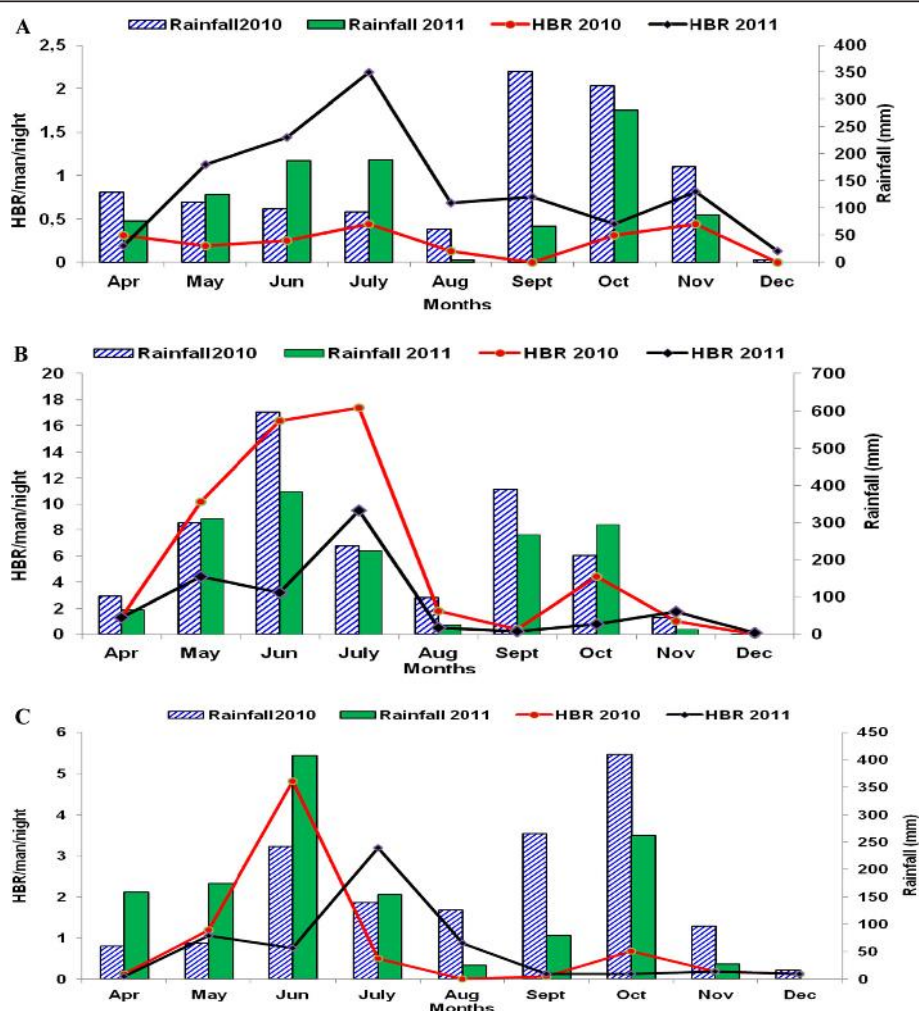
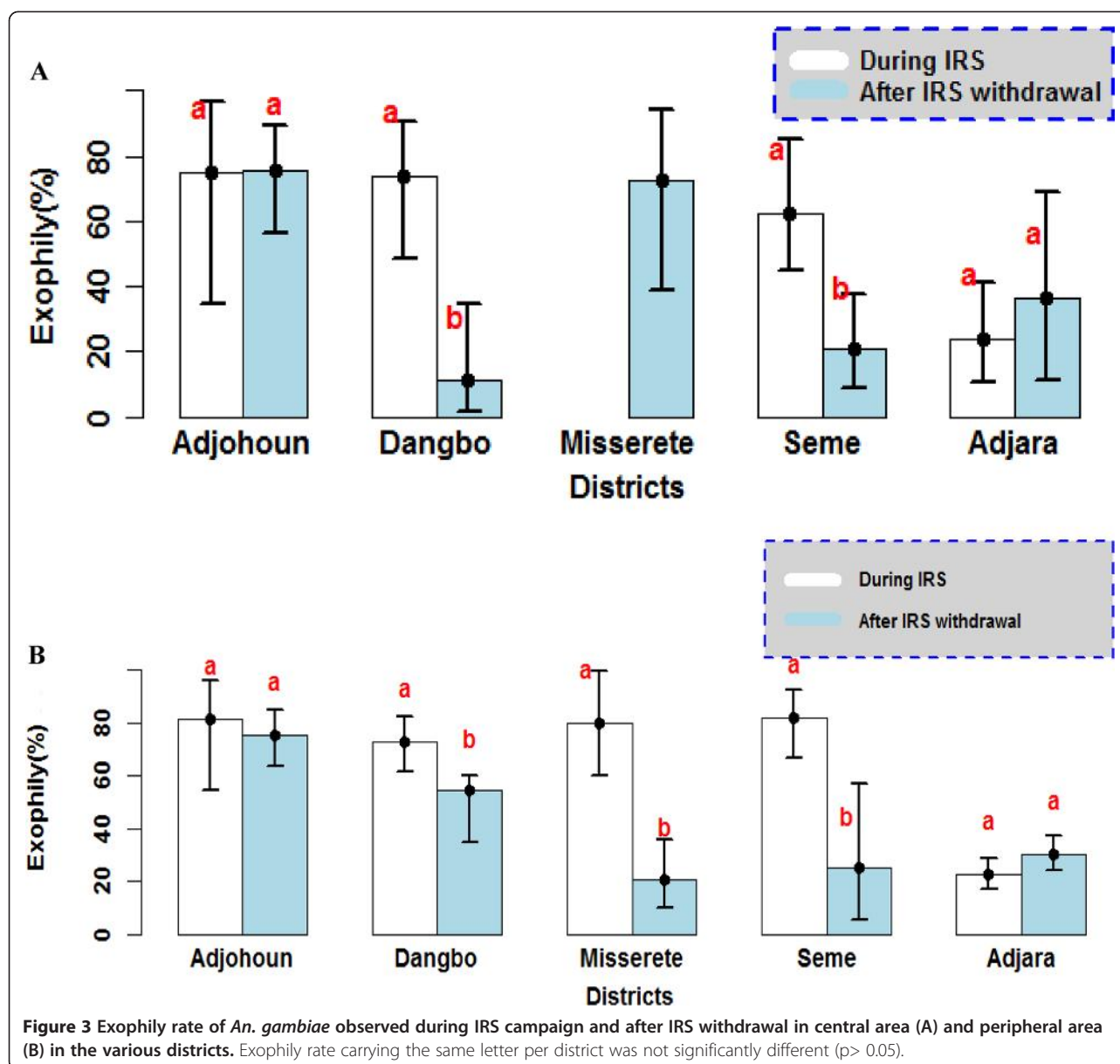


Figure 2 Aggressive variation of *An. gambiae* s.l. density depending on rainfall in Adjohoun (A), Sèmè (B) and Dangbo (C).



parity rates increased: 92%, 88%, 93% and 83% respectively (Figure 4).

In the control area, on the other hand, the parity rate was the same in both periods (OR = 1.13 [0.77-1.65] 95% CI; $p = 0.54$).

Vector blood meal index (BMI) inside the houses increases after IRS withdrawal

The blood feeding rate of *An. gambiae* was respectively 0%, 9%, 25% and 37% in Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè during IRS (Figure 5). BMI increase after IRS withdrawal in all districts (OR = 1.48 [1.1-1.99] 95% CI; $p < 0.001$) (46% in Adjohoun, 60% in Dangbo, 81% in Missérété and 83 in Sèmè).

All mosquitoes showed the same phenomenon: the blood feeding rate obtained after IRS cessation was significantly higher than that recorded during IRS intervention in Dangbo, Missérété and Sèmè districts (OR = 1.65 [1.46-1.86] 95% CI; $p < 0.001$). No significant difference was observed in Adjohoun between blood feeding rates in both periods (OR = 0.93 [0.67-1.27] 95% CI; $p = 0.64$) (Figure 6).

Change in EIRs after IRS withdrawal

During the IRS intervention period, 493 heads and thoraxes from a random selection of females *An. gambiae* s.l. were tested using ELISA CSP to identify the presence of sporozoites. Ten (2.0%) tested positive for *P. falciparum* sporozoite antigen. Nine out of the ten that tested

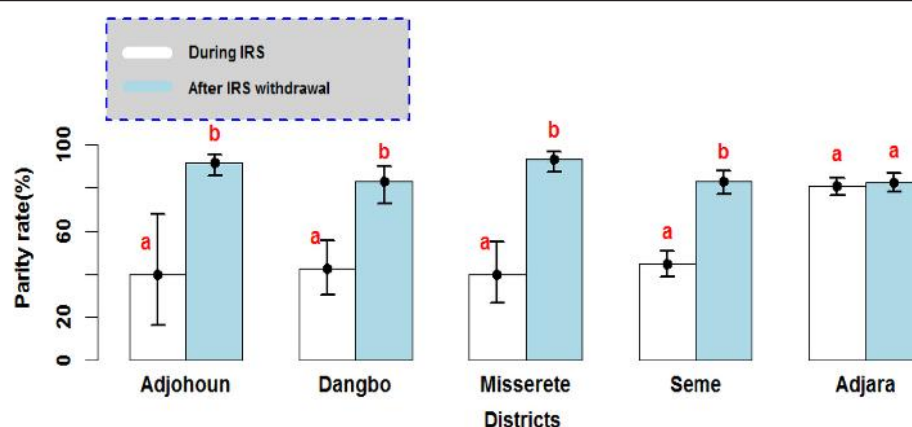


Figure 4 Parity rate of *Anopheles gambiae* observed during the implementation of IRS and after IRS withdrawal. The rate carrying the same letter per district was not significantly different ($p > 0.05$).

positive were collected in April and May during the third IRS campaign. But just a single infected mosquito was caught during the fourth round of IRS (three months later - Aug) (Table 2).

On the other hand, 20 heads and thoraxes out of 688 (2.9%) tested positive after IRS withdrawal ($p = 0.330$).

With the infected mosquitoes collected in April 2010, at the beginning of the third round of IRS, the results show that only one mosquito out of 159 was infected during IRS intervention ($Is=0.0063$) and four out of 195 after IRS withdrawal ($p=0.233$).

In the control area (Adjara), the sporozoite index was high during both periods: 0.091 (32/351) in 2010 and 0.039 (31/790) in 2011.

No difference was observed in sporozoite rates before versus after IRS (data from all sites combined). It is estimated that during the IRS intervention period, each inhabitant of the four districts would receive an average of 13 infected bites over a period of nine months (April – December 2010). A similar rate was observed after IRS

cessation with 10.40 infected bites during the same period (Table 2). When these data are examined by site, the EIR in Adjohoun and Missérété after IRS withdrawal was higher than that observed during the IRS intervention period (9 infected bites/person in Adjohoun after IRS withdrawal against 4 during IRS intervention period; in Missérété, 15 infected bites/person after IRS withdrawal against 3 during the intervention). But it was rather the contrary that was observed in Sèmè and Dangbo after IRS cessation (Table 2).

Discussion

Difficult decisions, such as the one to withdrawal IRS from an area, must be taken by National Malaria Control Programs when faced with demands that exceeds the availability of resources for control. Providing an alternative, proven and effective vector control intervention, such as LLINs, to replace IRS can improve, albeit not completely, the negative consequences of IRS withdrawal. The challenge is especially great in situations like

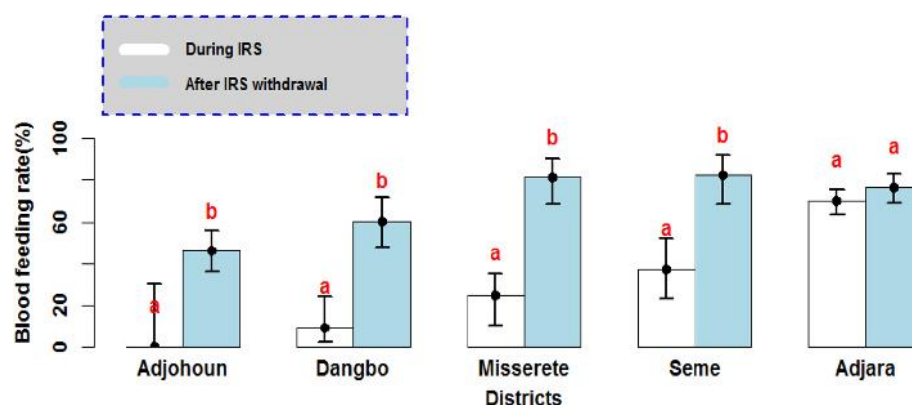


Figure 5 Blood feeding rate of *Anopheles gambiae* observed during IRS implementation and after IRS withdrawal. The rate carrying the same letter per district was not significantly different ($p > 0.05$).

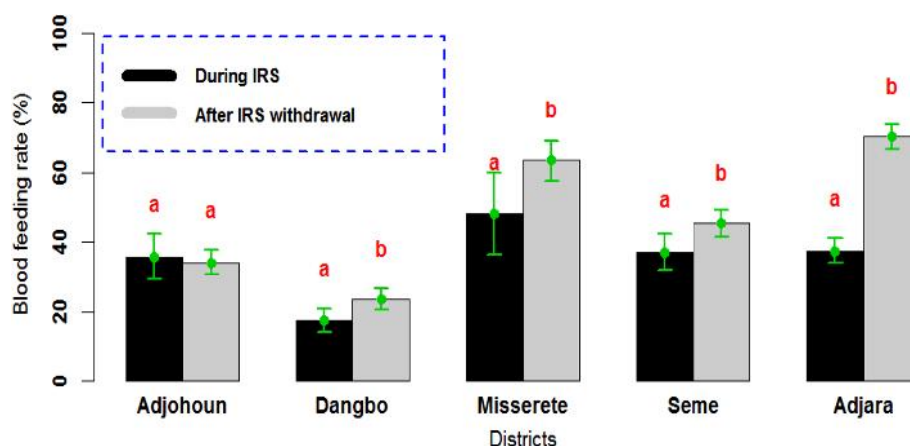


Figure 6 Blood feeding rate of *Culicidae* observed during IRS implementation and after IRS withdrawal. The rate carrying the same letter per district was not significantly different ($p > 0.05$).

Ouémé Plateau District, where the transmission season is long and the entomological inoculation rate is high [24]. Evaluating the impact of IRS withdrawal and replacement with high coverage LLINs to inform this issue is an important objective of entomology monitoring and evaluation. The example of IRS withdrawal in Southern Benin provides a good case in point. It is costly, and difficult to implement IRS without assistance from external partners. Nonetheless, this intervention is highly effective and requires little in terms of compliance from the community. The problem with IRS is; can it be sustained independently? In the case of Ouémé there was a concerted effort to document the impact of LLINs and to reissue the population of Ouémé department, as well as the NMCP that the alternative, universal coverage with LLINs following withdrawal of IRS, would provide a similar level of protection from malaria.

However, in this case, entomological indicators of malaria transmission increased significantly after IRS withdrawal /LLIN distribution. LLINs are proven and effective, however impact also depends on the existence of a strong 'net culture' in the community. For example, proper use (compliance with nightly use of sleeping under nets) and care of nets is a key behavior change that must take place if LLIN interventions are to be as effective as IRS. High coverage with LLINs is also necessary. Unfortunately, in this study there was no assessment of LLIN use at the community level to evaluate how well communities adapted to the unique aspects of the LLIN.

This study suggests that in Ouémé department multiple entomologic measures of malaria transmission increased, raising the risk of transmission, at a time when a new intervention, universal coverage with LLIN, was introduced, after IRS withdrawal. The HBR increased following withdrawal of IRS and hanging of LLINs could

not initially be kept during the IRS campaign despite the distribution of treated nets to every household. Vector biting density increased in three of the assessment districts after withdrawal of IRS (Adjohoun, Dangbo and Missérété). The lower HBR observed in Sèmè after withdrawal, an exception to the pattern, could be explained by the fact that the breeding sites and the *An. gambiae* larvae had been washed away by waters from the heavy rains in that district in 2011. Such a high rainfall was not observed in the other districts. The HBR drop also observed after IRS withdrawal in the control area, was probably due to a higher rainfall in 2010 than in 2011. This reduction of HBR obtained in the control area may be due not only to changes in rainfall but also the increase of LLIN coverage, which could contribute to the reduction of HBR and the sporozoite rate during the two periods. It can be concluded that the withdrawal of IRS and distribution of LLINs is associated with an increase in HBR.

HBR in Sèmè decreased after withdrawal, which contradicts the pattern in the other sites. However, rainfall in this district was lower after withdrawal than before. We speculate that this shift in rainfall, not seen at the other sites, may be responsible for the HBR decrease following withdrawal.

An increase in malaria transmission was observed in the districts after IRS withdrawal. In Adjohoun and Missérété, the entomological inoculation rate obtained after IRS withdrawal (9 months) was significantly higher ($p < 0.001$) than that obtained during IRS. Such a variation in the transmission level is probably due to the high *An. gambiae* HBR and the large CSP index recorded after IRS withdrawal.

Compared to Adjohoun, Dangbo and Missérété, malaria transmission remained high in Sèmè during both periods. But the EIR in this area after IRS cessation was

Table 2 Entomological inoculation rate (EIR) of *An. gambiae* observed during IRS campaign and following IRS withdrawal

Localities	Variables	During IRS (Apr.-Dec. 2010)				Following IRS withdrawal (Apr.-Dec. 2011)				IDR 95% IC	Comparison EIR/period
		3 rd round of IRS	4 th round of IRS	Total	EIR/ period	April- July	Aug.- Dec.	Total	EIR/ period		
		(Apr.-Jul.)	(Aug.-Dec.)	(Apr.-Dec.)				(Apr.-Dec.)			
Adjohoun central area	Thorax	4	4	8	0	25	16	41	5.2	∞	p<0.001
	Thorax+	0	0	0		1	0	1			
	Is	0	0	0		0.04	0	0.02			
	EIR	0	0	0		0.04	0	0.02			
Adjohoun peripheral area	Thorax	15	10	25	7.33	39	27	66	12.83	1.75 [1.72-1.78]	p<0.001
	Thorax+	2	0	2		2	1	3			
	Is	0.13	0	0.08		0.05	0.04	0.05			
	EIR	0.07	0	0.03		0.07	0.03	0.05			
Dangbo central area	Thorax	13	2	15	0	11	9	20	0	1	p=1
	Thorax+	0	0	0		0	0	0			
	Is	0	0	0		0	0	0			
	EIR	0	0	0		0	0	0			
Dangbo peripheral area	Thorax	93	14	107	19.29	48	17	65	5.23	0.27 [0.27-0.28]	p<0.001
	Thorax+	3	1	4		0	1	1			
	Is	0.03	0.07	0.04		0	0.06	0.02			
	EIR	0.11	0.04	0.07		0	0.02	0.02			
Missérété central area	Thorax	12	5	17	0	38	16	54	3.09	∞	p<0.001
	Thorax+	0	0	0		1	0	1			
	Is	0	0	0		0.03	0	0.02			
	EIR	0	0	0		0.02	0	0.01			
Missérété peripheral area	Thorax	44	32	76	4.82	45	58	103	27.07	5.61 [5.53-5.69]	p<0.001
	Thorax+	1	0	1		4	2	6			
	Is	0.02	0	0.01		0.09	0.03	0.06			
	EIR	0.04	0	0.02		0.15	0.04	0.1			
Sèmè central area	Thorax	80	58	138	36.27	121	9	130	25.85	0.71 [0.71-0.72]	p<0.001
	Thorax+	2	0	2		6	0	6			
	Is	0.03	0	0.01		0.05	0	0.05			
	EIR	0.41	0	0.13		0.2	0	0.1			
Sèmè peripheral area	Thorax	73	34	107	14.73	166	43	209	7.44	0.5 [0.5- 0.51]	p<0.001
	Thorax+	1	0	1		2	0	2			
	Is	0.01	0	0.01		0.01	0	0.01			
	EIR	0.13	0	0.05		0.06	0	0.03			
Adjara central area	Thorax	44	83	127	96.01	15	2	17	8.1	0.08 [0.04-0.17]	p<0.001
	Thorax+	3	6	9		2	0	2			
	Is	0.07	0.07	0.07		0.13	0	0.12			
	EIR	0.45	0.25	0.36		0.06	0	0.03			

Table 2 Entomological inoculation rate (EIR) of *An. gambiae* observed during IRS campaign and following IRS withdrawal (Continued)

Adjara peripheral area	Thorax	120	104	224	536.15	516	257	773	124.2	0.23	p<0.001 [0.19-0.28]
	Thorax+	14	9	23		23	6	29			
	Is	0.12	0.09	0.1		0.04	0.02	0.04			
	EIR	3.83	0.5	1.99		0.61	0.17	0.46			

Thorax +: positive thorax.

Is sporozoïtique.

EIR Entomological Inoculation Rate (infected bite/man/night).

IDR Incidence Density Ratio.

IC Confidence interval.

less than that recorded before withdrawal of IRS. This difference may reflect the high Culicidae nuisance problem in this area. If nuisance biting was exceptionally high, compliance with nightly use of nets may have been better than in other sites. Indeed, after IRS cessation, the use of LLINs proved successful in reducing malaria transmission in this area of high anopheline aggressiveness. This confirms the work of Kelly-Hope *et al.* [2] and Akogbéto *et al.* [14], that nuisance biting improves compliance with LLIN use. Moreover, the results of research in Africa showed that vector control by widespread use of LLINs is a strategy that can reduce malaria morbidity by 50 to 60% and overall mortality by 20% [4,25,26].

It is also important to mention some of the limits of this study namely, the difficulty of comparing longitudinal data without a proper control area where IRS would have been maintained to control for any confounding factors such as climatic conditions or the use of mosquito nets.

The presence of Olyset nets in houses after IRS cessation did not increase the exit rate of *An. gambiae* and *Culex spp* at all. These results show that the excito-repellent effect of permethrin on *An. gambiae* was not remarkable, probably because of the resistance of this vector to pyrethroids. These results are reminiscent of those from N'Guessan *et al.* [8], which showed a decrease in the effectiveness of pyrethroid-treated nets, especially in Benin.

Conclusion

After IRS withdrawal in Ouémé, an alternative vector control intervention, LLINs, was provided to all households in the former IRS target area. However, entomological monitoring and evaluation results for the year prior to withdrawal and the year afterwards, indicate that LLINs did not impact indicators of transmission to the same level as did IRS. Instead a significant increase in several measures of transmission was observed following IRS withdrawal in most of the sites. The human biting rate increased in Adjohoun, Dangbo and Misséréte but decreased in Sèmè. Also, the decrease in

transmission, observed in the control area (Adjara), reflected a rainfall pattern than was not characteristic of the other sites. In summary, IRS cessation resulted in EIR increase in three of the districts, a decrease in *An. gambiae* exophily, and increased vector longevity (parity). The overall increase in measures of transmission observed following withdrawal of IRS and introduction of LLINs points to a need for information, education and communication activities at the community level in order to reduce the risk of increasing transmission that may accompany similar changes in vector control strategy. Furthermore there is a need for ongoing monitoring of transmission, using entomological techniques, following withdrawal to IRS in order to verify impact and avoid resurgence of malaria due to differences in the impact of LLINs on transmission.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RO, RA, GG and MA designed the study. RO, VG, RG, AS and OO carried out the field activities. RO and FO analyzed the data. RO drafted the manuscript. MA, MS, RO and RA critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgment

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative), which financially supported this study through USAID. We thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) and the team of CREC for their technical assistance during field work and the laboratory. We also thank the people of Adjohoun, Dangbo, Misséréte and Sèmè for their collaboration.

Received: 4 March 2013 Accepted: 11 March 2013

Published: 16 March 2013

References

1. World Health Organization: *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed 21. 05. 2012).
2. Kelly-Hope L, Ranson H, Hemingway J: *Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes*. *Lancet Infect Dis* 2008, **8**:387-389.
3. Protopopoff N, Van Herp M, Maes P, Reid T, Baza D, D'Alessandro U, Van Bortel W, Coosemans M: *Vector control in a malaria epidemic occurring within a complex emergency situation in Burundi: a case study*. *Malar J* 2007, **6**:93.
4. Aregawi MW, Ali AS, Al-mafazy AW, Molteni F, Katikiti S, Warsame M, Njau RJA, Komatsu R, Korenromp E, Hosseini M, Low-Beer D, Bjorkman A, D'Alessandro U, Coosemans M, Otten M: *Reductions in malaria and*

- anaemia case and death burden at hospitals following scale-up of malaria control in Zanzibar, 1999–2008. *Malar J* 2011, **10**:46.
5. O'Meara WP, Mangeni JN, Steketee R, Greenwood B: **Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa.** *Lancet Infect Dis* 2010, **10**:545–555.
 6. Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ: **Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:591–596.
 7. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna 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.
 8. N'Guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:99–206.
 9. Padonou GG, Sèzonlin M, Ossè R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbéto 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.
 10. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Act Trop* 2007, **101**:207–216.
 11. Djouaka R, Irving H, Tukur Z, Wondji CS: **Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin.** *PLoS One* 2011, **6**(11):e27760.
 12. 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 *An. Arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon.** *Mol Ecology* 2008, **17**(4):1145–55.
 13. Pinto J, Lynd A, Vicente JL, Santolamazza F, Randle NP, Gentile G, Moreno M, Simard F, Charlwood JD, Rosario V, Caccone A, Della Torre A, Donnelly MJ: **Multiple origins of knockdown Resistance mutations in the afrotropical mosquito vector *Anopheles gambiae*.** *PLoS One* 2007, **2**:e1243.
 14. Akogbéto M, Padonou G, Bankolé H, Kindé Gazard D, Gbédjissi G: **Dramatic decline of malaria transmission after implementation of large-scale Indoor Residual Spraying using bendiocarb in Bénin, West Africa, an area of high *Anopheles gambiae* resistance to pyrethroids.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**(4):586–593.
 15. Ossè R, Aikpon R, Padonou G, Oussou O, Yadouleton A, Akogbéto M: **Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:163.
 16. Ministère de Santé: *Annuaire des statistiques sanitaires 2009.* Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2010.
 17. Ministère de la Santé: *Annuaire des statistiques sanitaires.* Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2010.
 18. Akogbéto MC, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A: **Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin.** *West Africa. Malar J* 2010, **9**:204.
 19. Wirtz RA, Ballou WR, Schneider I, Chedid L, Gross MJ, Young JF, Hollingdale M, Diggs CL, Hockmeyer WT: ***Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli*.** *Exp Parasitol* 1987, **63**:166–172.
 20. Bar-Zeev M, Self LS: **A note on the use of window traps as a tool for evaluating insecticides.** *Mosq News* 1966, **26**:205–207.
 21. Gillies MT, De Meillon D: **The Anophelinae of Africa South of the Sahara.** *Publ South Afr Inst Med Res* 1968, **54**:343.
 22. Gillies MT, Coetzee MA: **Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara, 2nd edn.** *Publ South Afr Inst Med Res* 1987, **55**:143.
 23. Detinova TS, Gillies MT: **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 Organ* 1964, **30**:23–28.
 24. Padonou GG, Sèzonlin M, Gbédjissi GL, Ayi I, Azondekon R, Djénontin A, Bio- Bangana S, Oussou O, Yadouleton A, Boakye D, Akogbéto 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* 2011a, **3**(4):59–68.
 25. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong Schellenberg JR, Keita K, Gomez P, Shenton FC, Hill AG, David PH, Fegan G, Cham K: **A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of the Gambia, west Africa.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **2**:37–44.
 26. Binka FN: **Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana; a randomized controlled trial.** *Trop Med Int Health* 1996, **1**:47–154.

doi:10.1186/1756-3305-6-73

Cite this article as: Ossè et al.: 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. *Parasites & Vectors* 2013 **6**:73.

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



Long Lasting Insecticidal Nets use, efficacy and physical integrity in a high vector resistance to pyrethroids area six months after a nationwide campaign in southern Benin, West Africa

Razaki A. Ossè^{1,2*}, Rock Aïkpon^{1,2}, Arthur Sovi^{1,2}, Gil Germain Padonou^{1,2}, Frédéric Oké-Agbo¹, Virgile Gnanguenon¹, Martin Akogbéto^{1,2}

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

²Faculte des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Benin.

*Corresponding author

Email address: ossraz@yahoo.fr

Tel: (229) 97689285.

Fax: (229) 21308860.

Abstract

Although effective malaria control measures such as long lasting insecticidal nets have been promoted, relatively little is known about their coverage dimension. However, usage varies among households, and such variation in actual usage may seriously limit the potential impact of nets. Moreover, the efficacy of these measures against *An. gambiae* in Ouémé department is unknown. The objective of this study was to investigate LLINs coverage and use, and their efficacy against *An. gambiae* in Ouémé department after the mass free distribution. A post survey campaign was undertaken in January 2011 to assess the effect of campaign six months after LLINs free distribution in southern Benin. A questionnaire has been provided to heads of 1,600 households randomly selected from four districts. Despite LLINs use reaching more than 80%, coverage was low at 50.87%. A perforation rate (14%) of Olyset after only 6 months of use was not low. Bioassays revealed inefficiency of Olyset toward the local population of *An. gambiae* only 6 months of use. Free distribution of LLINs rapidly improved LLINs coverage in communities. The rapid wear observed associated with low efficiency raises the problem of the choice of impregnated materials in a context of high vector resistance to insecticides.

Keywords: LLINs, coverage, use, wear, efficacy, *An. gambiae*, survey.

Introduction

Malaria is a severe public health issue, causing roughly 216 million cases of disease and 655,000 deaths per year (WHO, 2011). Most victims are children under five living in sub-Saharan Africa (WHO, 2011). Malaria is transmitted by Anopheles mosquitoes, and because there is currently no vaccine available, vector control is one of the most important means of malaria prevention. Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) are effective tools for malaria prevention and can significantly reduce severe disease and mortality due to malaria, especially among children under five in endemic areas (Lengeler, 2004).

In the recent decade, many countries across sub-Saharan Africa are rapidly increasing insecticide-treated nets (ITNs) coverage through several strategies including, social marketing (Noor, 2007; Grabwosky, 2007), free distribution to target groups (Beer, 2010; Grabwosky, 2010), and more recently, free universal population-

based distribution campaigns target the entire population at risk (Beer, 2010; Teklehaimanot, 2007). If the results are below what is expected, this is due to several factors. In addition to the extension of resistance to pyrethroids in malaria vectors which represents a serious obstacle to the implementation and use of LLINs in Africa (Corbel et al., 2007; Yadouleton et al., 2010), significant problems remain, endangering the sustainability goals and achievements. Indeed, in recent years, the National Malaria Control Program (NMCP) in African countries has invested heavily in the acquisition and distribution of LLINs for malaria control. However, monitoring the use of these materials is often overlooked.

The use of insecticide-treated nets is a major component of malaria prevention. A meta-analysis by the Cochrane group of 22 studies that used random sampling revealed that sleeping under an ITN can decrease the morbidity and the mortality due to malaria in children under five, respectively by 50% and 17% (Lengeler, 2004). In communities with ITNs coverage over 60%, a group effect occurs and people who do not use the ITNs, receive similar protection in comparison with those who use them (Hawley et al., 2003; Russell et al., 2010). Mass ITN distribution campaigns target all persons at risk for malaria, particularly in high transmission settings, have the advantage of rapidly achieved high community-level coverage which benefits everyone in the community and not just those who own and sleep under nets (Teklehaimanot, 2007). This strategy also has the potential to achieve equity in mosquito net ownership and use as shown by a number of studies in different settings (Noor, 2007; Beer, 2010); however, the level of achievement depends largely on specific context settings and the effectiveness of the distribution strategy. It is, therefore, important to assess equity in mosquito net ownership and use after each mass distribution in a new setting.

Benin is currently engaging in free mass distributions of LLINs, a type of net that is factory-treated with insecticide and designed to maintain efficacy against mosquito vectors for at least 3 years. In Ouémé department, after IRS withdrawal in 2011, the NMCP with the support of USAID, distributed LLINs in July 2011 to the inhabitants of the areas of this department previously under IRS intervention in order to limit the recovery of transmission. But the free distribution of LLINs to people is just not for solving social problems created by the cessation of IRS. The big challenge is their use by the communities. That is why the first goal of this study was to determine the

utilization rate of nets distributed. The nets distributed are Olyset, impregnated with permethrin. However, mosquitoes have developed a strong resistance against this product. It is for this reason that, after six months of use, we found it important to determine the effectiveness of Olyset on local populations of *An. gambiae*. So, we propose to identify transactions about these nets and their physical integrity, namely the degree of wear. In addition, the resistance of malaria vectors to pyrethroids represents a potential liability for the success of vector control programs in Benin. As the *kdr* mutation that confers vector resistance to pyrethroids is involved in this resistance, it is therefore important to know the impact of this mutation on the efficacy of Olyset currently in use in Benin as part of vector control.

Methods

Study area

The study area is located in Ouémé Department and includes four districts: Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè (Figure 1), an area of approximately 1000km². The total population is 310,400. There are approximately 65,000 households with 62,890 children aged 0 to 5 years, spread in 174 villages (INSAE, 2004). In 2010, the cumulative incidence of malaria was estimated at 11.2% and 12.6%, respectively in the Departments of Plateau and Ouémé (MS, 2011). Each district includes two different settings: the plateau area, characterized by the presence of temporary mosquito breeding sites and the valley area, characterized by the presence of permanent mosquito breeding sites associated with numerous pools and swamps. The entire region is characterized by a sub-equatorial climate, with two dry seasons (August-September and December-March) and two rainy seasons (April-July and October-November). The average annual rainfall is 1500 mm with a relative humidity of 70 ± 5% and an average monthly temperature ranging from 23°C to 32 °C.

Sampling

Selection of study sites

We used a sampling plan level by associating each district with a uniform ponderation, followed by a simple random sample of households. Using probability proportional size (PPS) sampling methodology, we first selected two boroughs per district. We then used PPS to select two villages per borough. Thus, the boroughs of Adjohoun and Démè, Dangbo and Kessounou, Katagon and Missérété,

Agblangandan and Djègbé were selected respectively in the districts of Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè. The purpose of each of the 2 ponderations is to meet the requirement of representativeness of our sample.

Sample size

In view of our objectives and the aim to have a good estimation of the parameters measured by the survey, we decided to visit 96 households per village with a margin of 5% to compensate for contingencies such as non-response due to errors and other registration. Thus, 100 households were visited per village, 400 households per district and a total of 1,600 households for all the study area.

LLIN coverage, use and the degree of wear

Households were interviewed about LLINs ownership and their use as means to prevent malaria. To evaluate the coverage of Olyset distributed by the NMCP in July 2011, in each district, we determined the number of people who declared having received Olyset NMCP 2011 and the number of people who do not receive. According to the principle of one net for two people, the coverage rate was calculated as the ratio of the number of Olyset NMCP 2011 available in households by the number of Olyset that should be present.

The evaluation of utilization rate of the Olyset distributed by NMCP in 2011 requires knowledge of the number of Olyset actually in use in households. People who use them are those who reported having slept under ITNs the previous night of the survey. To calculate this rate, we divided the number of respondents reported sleeping under NMCP Olyset 2011 the previous night over the total number of respondents who reported having received it. A rate of usage over 80% was considered satisfactory. In a household, any net hung or not folded meant it has been used the previous night of the survey, and is supposed to be a net in use.

The physical aspect of each net is evaluated. The number and size of the holes in the nets were recorded and classified. The holes and tears observed were classified as (I) small holes size (hole that would allow a thumb to pass through), (II) middle holes size (more than a hole as in (I) but not large enough to allow a hand to pass through), (III) large holes size (hole larger than the fist).

Surveys

The survey was conducted 6 months after the campaign in Ouémé department in January 2012 during the dry season. It is a cross-sectional study based on

quantitative and qualitative questionnaire. The quantitative questionnaire had targeted to 1,600 individuals, in particular adult male and female heads of households (family unit). The respondents' consent was sought and gained by explaining the aims of the study. The questionnaire was administered to them by trained interviewers. The questionnaire focused on the knowledge, attitudes and practices of respondents on the quality of the implementation of LLINs and their use. Individuals who could not read or write or understand French language were interviewed in the local language of the Ouémé region. Direct observations on the field allowed us to record the types of nets used by communities in the four districts, their setting, their use and their state after six months of use in order to assess the physical durability of these nets. The information gained is recorded on a form. Surveyors identified, counted and examined each type of nets that were found during the investigation. The purpose of the sociological survey is to assess the state of the nets in terms of both efficiency and utilization, and to assess the sustainability of the nets sampled.

Mosquitoes

The susceptible strain "Kisumu" of *An. gambiae* originate from Kenya and bred in the insectary of the Entomological Research Centre of Cotonou (CREC) was used for the bioassays. A local population of *An. gambiae* collected as larvae and raised to adulthood in the insectary was also used.

WHO cone assay

Twenty nets (10 Olyset distributed in July 2011 and 10 Permanets which are in use for 1-2 years: 2009-2010) from the study area were randomly selected and submitted to the efficacy test (cone test) to verify the presence of insecticide residues on the fibers. Four other nets (2 new untreated nets, 1 unused Olyset, 1 unused Permanet) were also tested and used as negative and positive controls.

Cone tests were performed according to the WHO protocol (WHO, 2005). Cones were placed on different sides of LLINs test: 5-10 young females aged 2-5 days of *Anopheles gambiae* Kisumu and wild *Anopheles gambiae* were introduced into each cone. Mosquitoes were in contact with the different sides for 3 minutes, then were removed using an aspirator. Once transferred in sterile cups, they were provided with sugar solution (sugar solution to 10%) and maintained at $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a relative humidity of $80 \pm 10\%$ for 24 hours to assess delayed mortality. After 24 hours, the

mortality rates were determined for each strain of mosquitoes. Tests were considered as invalid and repeated when control mortalities exceeded 20%. When control mortalities were less than 20%, but exceeded 5%, a correction of mortality was made using Abbot's formula (1975). Survivors and dead specimens from field bioassays were kept in different Eppendorf tubes and passed PCR to find the different mechanisms involved in the resistance to insecticides.

Knock down resistance (*kdr*) diagnostic

DNA was extracted from field samples of *An. gambiae* mosquitoes (survivors and dead from the cone tests) and was used to genotype samples for the *kdr* "Leu-phe" allele, using the PCR-based method of Martinez-Torres et al. (1998).

Data processing and analysis

Data obtained from the survey were checked and recorded using Epi Info version 6 and Microsoft Office Excel 2007 for Windows. Simple descriptive statistics such as frequency and percentage of variables were computed and cross-tables were performed using R software version 2.11.1. A chi-square test for the comparison of proportions was performed to compare the proportions of each variable related to each region.

Summary procedure base packages of this software were used to perform the frequency distribution of *kdr* mutations. Then the Fisher's exact test was used to compare allele frequencies of *kdr* mutations in the dead and the survivors. The same test was used to compare mortality rates observed for the different genotypes. The level of significance was 0.05.

Ethical clearance

This paper used data from the Ouémé post mosquito net free distribution campaign survey conducted on the behalf the National Malaria Control Program. Because this was part of the programmatic activity, ethical clearance was exempted. Informed consent was obtained from each participant.

Result

Nature of nets recorded

During our survey in the four districts, various kinds of nets were found. The majority of LLIN recorded were Olyset distributed in July 2011 by the NMCP (59.3%: 998 Olyset from a total of 1682 registered) (Figure 2) and 2% of other Olyset. LLINs like PermaNet (20.9%) and some unidentified but treated nets (17.8%) were also found.

In the district of Sèmè, the distribution rate of Olyset NMCP reported is low: 15.6% against 29.6% in Adjohoun, 26.1% in Dangbo and 28.5% in Missérété district (Figure 2).

Household LLIN coverage and use

Table 1 shows the coverage rate of Olyset distributed in July 2011 in the four districts. In total, 1996 Olyset should be distributed to 3924 people (children and adults). Thus, 50.87% of this population has received the new Olyset meaning 1 Olyset for 1.9 person. In Adjohoun and Missérété districts, the rate was higher, respectively, 70.14% (1 Olyset for 1.4 person) and 60.90% (1 Olyset for 1.6 person). However, the coverage rate was low in Dangbo district (47.93%: 1 Olyset for 2.1 persons) and very low in Sèmè (29.57%: 1 Olyset for 3.4 persons). But in these two latter districts, if we took into account the other nets available before the distribution campaign in July 2011, the coverage would be improved: 1 Olyset for 1.16 person in Sèmè (86.06%) and 1 Olyset for 1.33 person in Dangbo (75.30%). Among 998 Olyset distributed, 816 were regularly used. The usage rate was 81.76% (Figure 3). This rate was high in all localities visited except Missérété where it was less than 80% (Figure 3).

Households LLIN position and location

In Adjohoun, Dangbo and Sèmè districts, more than 82% of Olyset NMCP received by the populations were in use. But at Missérété, the percentage of Olyset in use was lower (below 70%) (Table 2); 92.35% of the Olysets NMCP not in use were stored. Overall, in all 4 districts, 81.68% of Permanets and other types of Olyset were in use.

Wear on Olyset after 6 months of use

After six months of use, 14% of Olyset NMCP were found with tears and holes (Figure 4). The frequency of mosquito holes varied from one district to another: 4.91% in Missérété, 10.81% in Adjohoun, 18.59% in Sèmè and 24.52% in Dangbo (Figure 4). Of the 139 Olyset found with holes, 557 holes were recorded average 4 holes per Olyset. The holes of size I, II and III represent respectively 27.11%, 41.29% and 31.60% of all the holes. In Adjohoun and Missérété districts, holes size II were the most recorded, respectively 55.23% and 75.51% (Figure 5). In both districts, there was a significant difference between the frequency of these holes and the holes of size I and III ($p < 0.05$). In Sèmè, the frequency of holes size III (47.15%) on the Olyset NMCP was significantly higher than the holes size II (33.33%) and size I

(19.52%) ($p < 0.05$). But in Dangbo, frequencies of holes size I (37.5%) and size III (34.37%) were almost the same ($p > 0.05$) and were significantly higher compared to the frequency holes size II ($p < 0.05$) (Figure 5).

Effectiveness of Olyset after 6 months of use

More than 400 specimens of *An. gambiae* Kisumu (susceptible reference strain) were exposed to Olyset after 6 months of use. Most Olyset tested were effective. However, one of them (1/10) gave a mortality rate less than 80%, the threshold of bio-efficacy of ITNs on susceptible mosquito strains (Figure 6). However, for the other types of nets that were in use for more than 6 months, especially mosquito nets of type Permanet 2.0, the mortality rates of *An. gambiae* Kisumu were below 65.12% (Figure 7). With the resistant population (local *An. gambiae*), there was a remarkable decline in the effectiveness of two types of nets (Olyset NMCP and Permanet). The mortality rate recorded was between 0 and 36.36% for Olyset after 6 months of use (Figure 6), and between 0 and 11.76% with Permanets in use for 2 years (Figure 7).

Kdr genotyping

The allele frequency of the *kdr* mutation in the tested population (154 individuals, including 26 deaths and 128 live) was 90.26%. The frequencies in dead and alive mosquitoes were respectively 94% and 89.53%. No significant difference in allele frequency of this mutation was observed between dead mosquitoes and those alive ($p = 0.4752$) (Table 3). As the *kdr* mutation is recessive, we grouped the genotypes SS and RS and we compared the mortality rates observed in these individuals with those observed in individuals with genotype RR. The mortality rate of mosquitoes RS and SS genotype was 10%, and 17.74% for RR genotype. These rates were not significantly different ($p = 0.45$) (Table 4).

Discussion

The large-scale introduction of LLINs has become a priority for malaria prevention. Access to universal coverage of LLINs and proper use of these nets are a challenge for an effective control against malaria in sub-Saharan Africa. Many countries are already investing in the free distribution of mosquito nets. Actually, the overall coverage is below the WHO target to reach at least 80% of people at risk or suffering from malaria (WHO, 2008). According to a study by the UNDP (United Nations, 2009), the success in achieving the objective of the sixth MDGs (Objective of the Millennium Development Goals) and other global targets for malaria depends on

public awareness about the value of human health, the use of treated mosquito nets and the provision of effective access to nets.

This survey showed that the Olyset LLIN average coverage in the department of Ouémé in 2011 is generally good with a rate of 50.87% (one Olyset for 1.9 person), which corresponds to the expectations of the NMCP. But, the Olyset coverage rate was especially low in Dangbo (1 Olyset for 2.1 persons) and very low in Sèmè (1 Olyset for 3.4 persons). In 2001, before the national campaign distribution of LLINs in southern Benin, only 4.3% of homes owned an ITN and 2.4% of children under 5 were sleeping under insecticide treated nets (Kinde-Gazard et al., 2004). The significant increase in coverage after the distribution of LLINs campaigns is quite logical and has been previously recognized (Matovu et al., 2009, Skarbinski et al., 2007; Thwing et al., 2008). However, the coverage rate obtained is lower than those observed in households in Kenya (68%), Niger (70%) and Mali (81%) after the national campaign distribution (Hightower et al., 2010; Thwing et al., 2008; Cervinskaskas et al., 1997).

The use of Olyset in turn is better in the whole population (81.76%) except Missérété, where the Olyset use is lower than 80% (74%). This high use of LLINs observed among populations of the four districts during the dry season can be explained by the presence of permanent breeding spots and swamps in those areas, causing a permanent nuisance of Culicidae. These rates are higher than those recorded by Ahorlu et al. (1997) and Toe et al. (2009) in previous studies in West Africa during the same period (dry season). Indeed, these studies that were conducted in Ghana and Burkina Faso showed that people were less motivated to use the nets during the dry season with high temperatures at night.

The physical barrier provided by LLINs is very important. It is the first factor of personal protection against mosquito bites and we must ensure that they retain this physical integrity. Adjohoun, Dangbo and Sèmè showed that more than 10% of Olyset were torn after only 6 months of use, so there is an accelerated degradation of nets fiber. The degradation was increased in areas where lake water is permanently available (Adjohoun, Dangbo and Sèmè). The proximity with water and high anopheline densities are some of the reasons of the extensive use of nets and their regular washing. LLINs fibers were thereby weakened and this reduces their durability. Indeed, when children urinate or oil stains nets, these nets were

systematically washed. In other hand, in some communities, another factor contributing to accelerate the degradation of LLINs are the types of beds (the racks) and the use of burning lamps. The degradation is less pronounced in Missérété. Indeed, in this locality, nets sustained less pressure due to the lower use rate in comparison with the other districts. In a sociological study conducted in 2005 in the framework of Pal + program, residents of Kétonou, a district of high nuisance of mosquitoes like Dangbo and Sèmè located along lake Nokoué, said that in their area, people “eat and sleep” in nets. If this statement is true, it shows the frequent contact that might exist between man and mosquito net in some environments. The results of the sociological survey at that time showed more than 95% of the population regularly used their nets. Additional nets were also available for visitors.

The percentage of holed LLINs and the size of their holes vary from one district to another. The presence of large holes constitutes a big problem because according to Hill et al. (2006), once LLINs are holed, they lose their protection. But, to reinforce the effectiveness of holed LLINs and to increase then lifetime, we suggest to provide repair kits to communities to repair with large holes. Preliminary works showed that ITNs were effective even if they were holed. Nowadays, due to the high level of resistance of mosquitoes to insecticides, these data must be updated.

In our study area, the acceptability of LLINs is good. The majority of LLINs distributed by the NMCP were found hung in households. The LLINs which were not found hung were stored or given to other family members. This observation was also done in Niger (Thwing et al., 2008).

The results obtained in this study show a low efficacy of Olyset against wild population of *An. gambiae*. As a matter of fact, the mortality rates observed after exposure specimens of wild *An. gambiae* to Olyset were very low, confirming the resistance of these mosquitoes to pyrethroids previously reported by several authors (Akogbéto and Yacoubou, 1999; Etang et al., 2003; Corbel et al., 2007; Yadouléton et al., 2010). These low mortality rates are due to fact that pyrethroids affect sodium channel and vectors carrying the *kdr* mutation. This target is changed and the insecticide is no longer the channel's specific receptor and therefore cannot act. However, the dead mosquitoes were nevertheless recorded among the individuals carrying the *kdr* mutation, indicating that this is probably not the only port of the *kdr* mutation that determines the resistance of vectors. It was shown that other

mechanisms, including enzymatic mechanisms were involved in this resistance (Djouaka et al., 2008). If this decrease in efficiency was related to the resistance, it also is possible that the demand of LLINs in the tropics cause a decrease of rigor of the production control of these LLINs before leaving industries. In addition, some sampled nets stay long in health facilities in inadequate conditions before being used. During this long period, it is possible that the active ingredient in the insecticide content lost some of its effectiveness.

Permanets inefficiency, one to two years after their use, may be due not only to their usage time but also to some wash soaps used by recipients. In fact, the majority of Permanets removed (9/10) were washed with detergents (Kogui and Klin) since their acquisition. However, previous studies showed that some washing soaps have a negative impact on the effectiveness of insecticide-treated nets (Azondékon et al., 2007 unpublished).

The results of this study relativize the idea of the concept of "long-lasting" of nets under field conditions. Indeed, a perforation rate (14%) of Olyset after only 6 months of use was not low. One wonders if it is the material used in the manufacture of the net that is in question, or the early perforations are due to a lack of care and maintenance in households. Nets were distributed free of charge to people regularly and could be considered as a vulgar tool and lose their value. The rapid wear associated with low efficiency raises the problem of the choice of materials impregnated in a context of high vector resistance to insecticides. Each year, we propose a new formulation of insecticide solution to control resistant mosquitoes or a new type of ITN with longer duration of action. But on the field, new tools behave as much the same way as the previous tools.

Conclusion

Overall, access to universal coverage based on one Olyset for two people during the distribution of LLINs in July 2011 was reached in the department of Ouémé. Taking into account other nets rather than Olyset, this access is exceeded. However, in Sèmè and Dangbo districts, Olyset NMCP coverage is not complete. It is interesting that the NMCP review its strategy of distributing nets to bring all districts towards universal coverage. The results show a decrease in efficacy of Olyset towards the local mosquito populations after only 6 months of use. The concept of LLINs as defined by the designers did not take into account certain realities of mosquito

resistance to insecticides and the various pressures that may undergo the use of nets in communities.

Today, LLINs are freely given to the public in many countries. This gratuity certainly improves their possession but does not guarantee effective home use. It is the awareness and involving of the social human potential that can yield results beyond our expectations and induce the perpetuation of the use of mosquito nets at the community level.

Competing interests

The authors declare that no competing interests exist.

Acknowledgements

The authors thank the « President's Malaria Initiative » of the US government for funding this study. We thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) and the team of CREC for their technical assistance during field work. Also, many thanks to the people of Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè for their collaboration.

References

- Abbott W (1975). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Economic. Entomol.*, 18(4): 265-267.
- Ahorlu CK, Dunyo SK, Afari EA, Koram KA, Nkrumah FK (1997). Malaria related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control. *Trop. Med. Int. Health.*, 2 (5): 488-99.
- Akogbéto M and Yakoubou S (1999). Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 92: 123-30.
- Azondékon R & Vigninou E (2007). Contrôle de qualité des moustiquaires imprégnées commercialisées ou distribuées au Benin. *Mémoire de fin de cycle, EPAC/UUAC*, 80 p.
- Beer N, Ali AS, de Savigny D, Al-Mafazy AW, Ramsan M, Abass AK, Omari RS, Björkman A, Källander K (2010). System effectiveness of a targeted free mass distribution of long lasting insecticidal nets in Zanzibar, Tanzania. *Malar. J.*, 9:173.

Cervinskas J, Berti P, Desrochers R, Mandy J, Kulkarni M (2008). Évaluation de la possession et de l'utilisation des moustiquaires imprégnées de l'insecticide long durée (MILDs) au Mali huit mois après la campagne intégrée de décembre 2007: Rapport Final. Ottawa: HealthBridge Canada. November 30. Disponible sur l'internet à <http://www.healthbridge.ca/assets/images/pdf/Malaria/Final%20Mali%20Report%20nov%2030.pdf> (http://www.healthbridge.ca/reports_e.cfm#Malaria)

Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard J, Rowland M (2007). Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop.*, 101(3): 207-216.

Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway, Strode C (2008). Expression of cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BCM. Genomics.*, 9:538doi:10.1186/1471-2164-9-538.

Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D (2003). Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J. Med. Entomol.*, 40: 491- 497.

Grabowsky M, Nobiya T, Selanikio J (2007). Sustained high coverage of insecticide-treated bednets through combined Catch-up and Keep-up strategies. *Trop. Med. Int. Health.*, 12: 815-822.

Grabowsky M, Farrell N, Hawley W, Chimumbwa J, Hoyer S, Wolkon A, Selanikio J (2010). 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.*, 10:1151-1160.

Hawley WA, Phillips-Howard PA, ter Kuile FO, Terlouw DJ, Vulule JM, Ombok M, Nahlen BL, Gimnig JE, Kariuki SK, Kolczak MS, Hightower AW (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):121-7.

Hightower A, Kiptui R, Many A, Wolkon A, Leigh Vanden Eng J, Hamel M, Noor A, Sharif SK, Buluma R, Vulule J, Laserson K, Slutsker L, Akhwale W (2010). Bed net ownership in Kenya: the impact of 3.4 million free bed nets. *Malar. J.*, 9:183.

Hill J, Lines J, Rowland M (2006). Insecticide-treated nets. *Adv. Parasitol.*, 61:77–128. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61003-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61003-2)

INSAE (2004). Fichier village Ouémé. 29 p.

Kinde-Gazard D, Gbenou D, Tohon C, Da Silva C, Nahum A, 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.* (2):CD000363.

Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect. Mol. Biol.*, 7:179–184.

Matovu F, Goodman C, Wiseman V, Mwengee W (2009). How equitable is bed net ownership and utilisation in Tanzania? A practical application of the principles of horizontal and vertical equity. *Malar. J.*, 8: 109.

Ministère de la Santé (2011). Annuaire des statistiques sanitaires 2011. Direction de la Programmation et de la Prospective, Cotonou, Bénin.

Noor AM, Amin AA, Akhwale WS, Snow RW (2007). Increasing coverage and decreasing inequity in insecticide-treated bed net use among rural Kenyan children. *PLoS. Med.*, 4:e255.

OMS (2005). Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11, 18 p.

Padonou GG, Sezonlin M, Osse R, Aizoun N, Oke-Agbo F, Oussou O, Gbedjissi G, Akogbeto M (2012). 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.*, 5:72.

Russell TL, Lwetoijera DW, Maliti D, Chipwaza B, Kihonda J, Charlwood JD, Smith TA, Lengeler C, Mwanyangala MA, Nathan R, Knols BGJ, Takken W, Killeen GF (2010). Impact of promoting longer-lasting insecticide treatment of bed nets upon malaria transmission in a rural Tanzanian setting with pre-existing high coverage of untreated nets. *Malar. J.*, 9:187.

Skarbinski J, Massaga JJ, Rowe AK, Kachur SP (2007). Distribution of free untreated bednets bundled with insecticide via an integrated child health campaign in Lindi

Region, Tanzania: lessons for future campaigns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76 (6): 1100-6.

Teklehaimanot A, Sachs JD, Curtis C (2007). Malaria control needs mass distribution of insecticidal bednets. *Lancet.*, 369: 2143-2146.

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(6): 827-34.

Toe LP, Skovmand O, Dabire KR, Diabate A, Diallo Y, Guiguemde TR, Doannio JM, Akogbéto M, Baldet T, Gruenais ME (2009). Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. *Malar. J.*, 8: 175.

United Nations (2009). The Millennium Development Goals Report 2008. Accessed at www.un.org on August 17, 2009.

World Health Organization (2008). World Malaria Report 2008. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

WHO (2011). World Malaria Report 2011. Geneva, Switzerland: World Health Organization. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed 21.05.2012)

Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto MC (2010). Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar. J.*, 9: 83.

Table 1: Coverage rate of Olyset NMCP per district

Districts	Boroughs	Other Olyset	Olyset NMCP (I)	Other nets	Permanet	Total	N people Visited	N Olyset NMCP which should be distributed (Ix2)	Coverage rate (%) &95% CI	Coverage rate (%) / district
ADJOHOUN	Adjohoun	1	198	25	32	256	568	396	69,72 [66 73]	70,14
	Deme Dangbo	7	98	26	42	173	276	196	71,01 [65 76]	
DANGBO	Centre	5	96	16	59	176	499	192	38,48 [34 42]	47,93
	Kessounou	3	165	35	31	234	590	330	55,93 [52 60]	
MISSERETE	Katagon	0	88	21	38	147	405	176	43,46 [39 48]	60,90
	Missérété	0	197	20	25	242	531	394	74,20 [70 77]	
SEME	Djregbe	17	59	120	25	221	497	118	23,74 [20 27]	29,57
	Agblangandan	0	97	37	99	233	558	194	34,77 [31 38]	
Total		33	998	300	351	1682	3924	1996	50,87 [49 52]	

Table 2: Position and place of nets in households per district

Types of nets	Localities	Position of LLINs		Place of LLINs		
		suspended		unsuspended		Total
		N	% & IC 95%	Suitcase	On rope	
Olyset NMCP			82,77 [77,98-			
	Adjohoun	245	86,90]	47	4	51
	Dangbo	225	86,54 [81,78-90,44]	32	3	35
	Missérété	194	68,07 [62,31-73,45]	86	5	91
	Sèmè	137	87,82 [81,63-92,51]	16	3	19
Other Olyset	Adjohoun	8	100 [63,00-100,0]	0	0	0
	Dangbo	8	100 [63,00-100,0]	0	0	0
	Missérété	0	0	0	0	0
	Sèmè	14	82,35 [56,57-96,20]	3	0	3
Permanet	Adjohoun	59	79,73 [68,78-88,19]	13	2	15
	Dangbo	81	90 [81,86-95,33]	9	0	9
	Missérété	50	79,37 [67,30-88,53]	12	1	13
	Sèmè	107	86,29 [78,96-91,81]	17	0	17
Others	Adjohoun	47	92,16 [81,12-97,82]	2	2	4
	Dangbo	48	94,12 [83,76-98,77]	3	0	3
	Missérété	25	60,98 [44,50-75,80]	16	0	16
	Sèmè	125	79,62 [72,46-85,62]	30	2	32
			81,68 [79,74-			
Total		1373	83,50]	286 (92,86%)	22 (07,14%)	308

N: number; IC: Confidence interval.

Table 3: Allele frequencies of the *kdr* mutation observed in *An. gambiae* (dead and survivors) after exposure to Olyset

Status of mosquitoes	<i>Kdr</i> mutation					p
	Total	RR	RS	SS	Frequencies (%)	
Survivors	129	102	27	0	89,53	0,48
Dead	25	22	3	0	94	
Total	154	124	30	0	90,26	

Table 4: Mortality rate of *Anopheles gambiae* exposed to Olyset according to genotypes for the *kdr* mutation

Genotypes	N tested	N dead	Mortality rate (%)	p
RR	124	22	17,74	0,45
RS+SS	30	3	10,00	

Figure 1: Map of study area

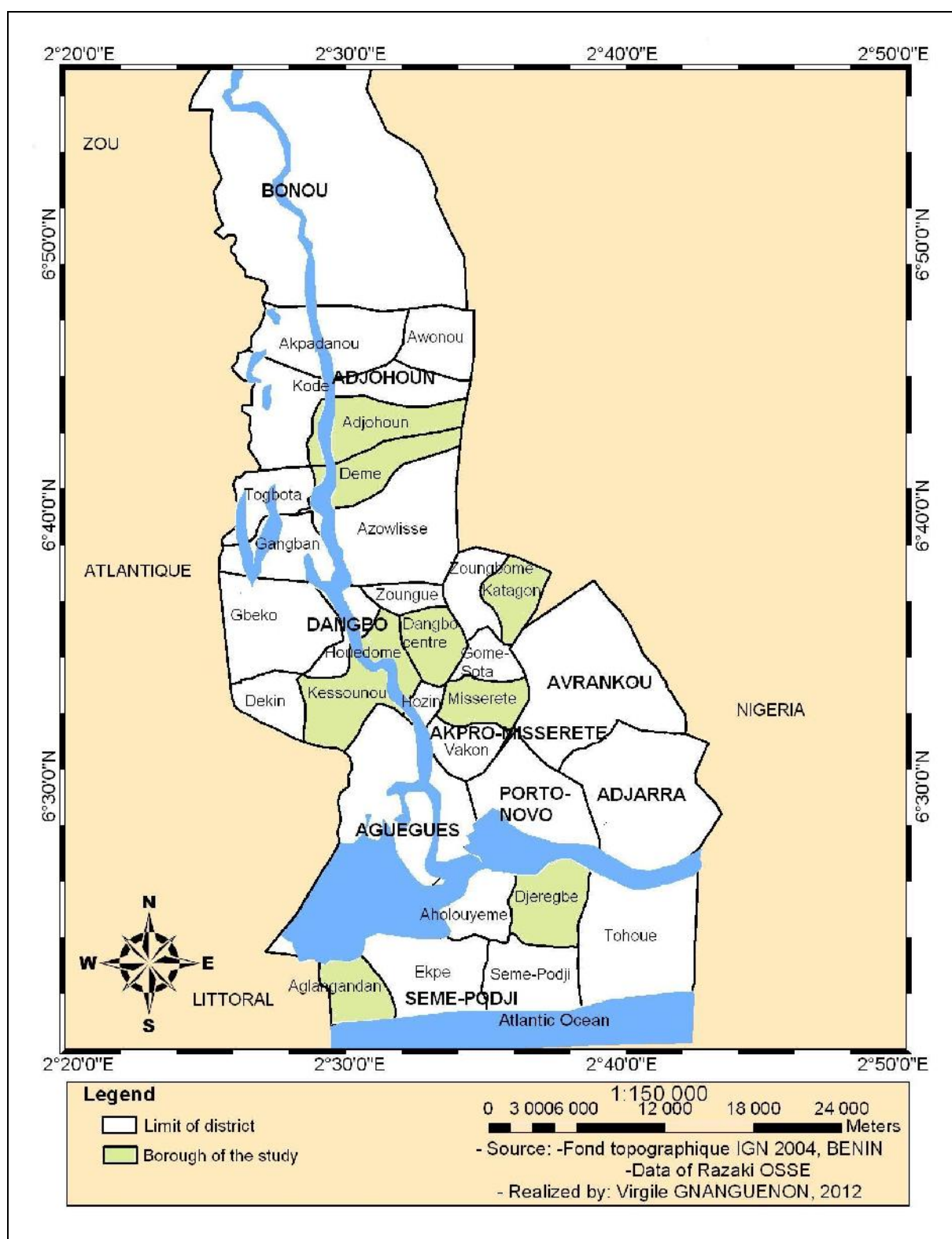


Figure 2: Frequency of types of nets faced by district

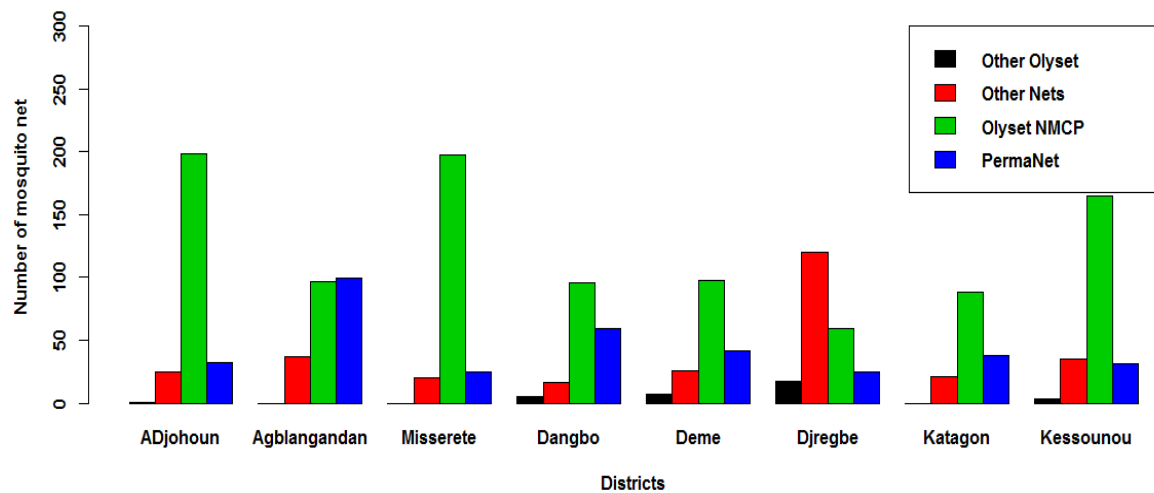


Figure 3: Use rate of Olyset NMCP by district

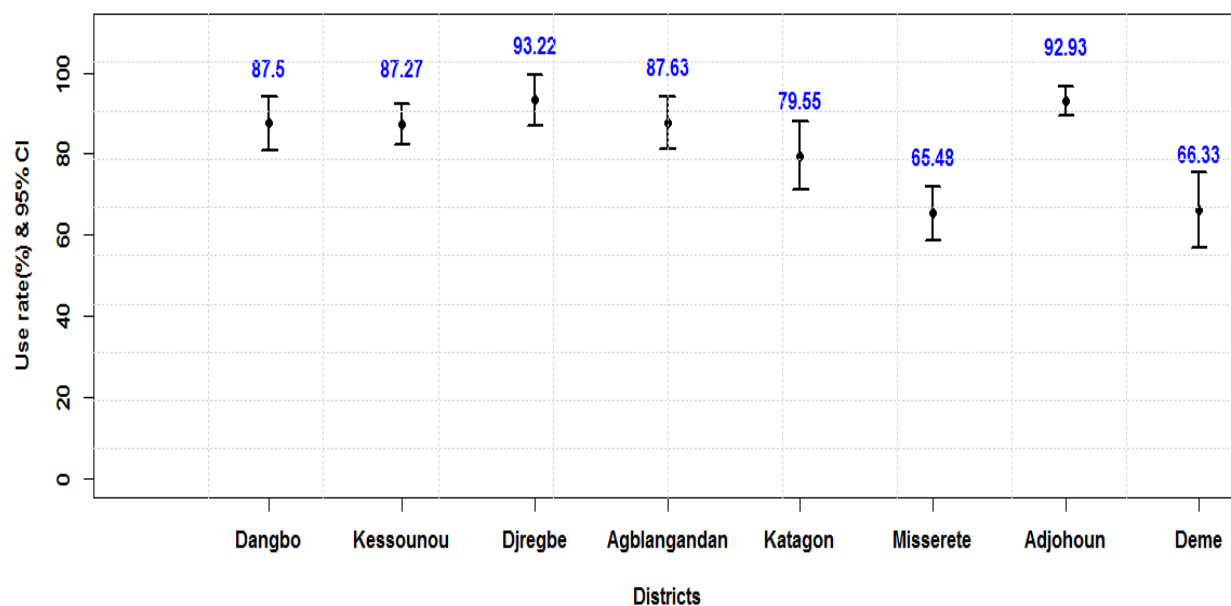


Figure 4: Frequency of nets holes in the different districts

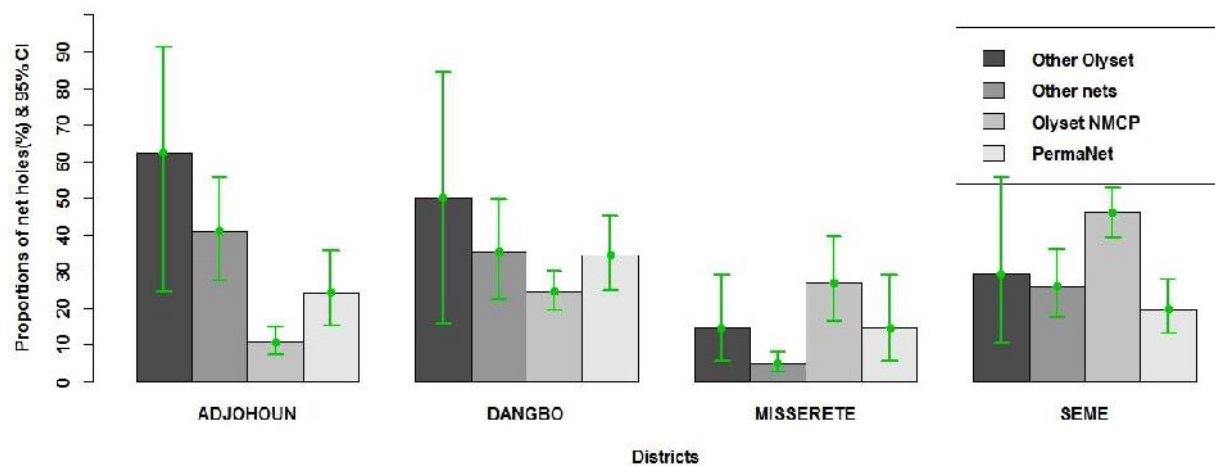
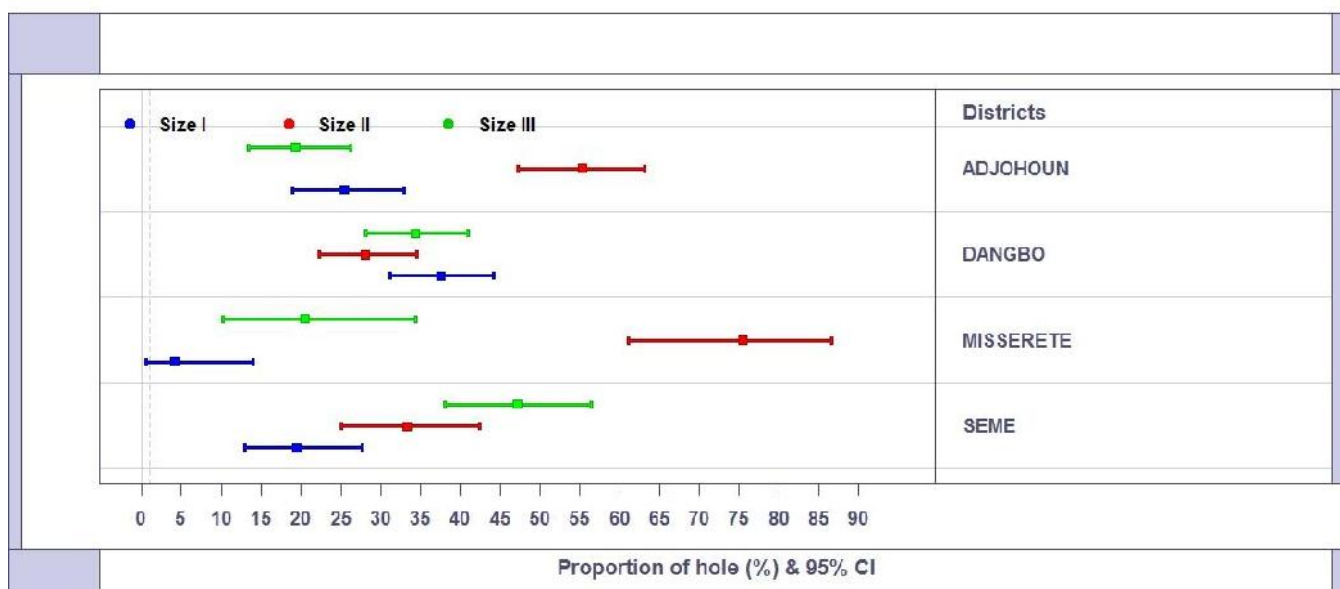


Figure 5: Frequency of hole types met on the Olysets NMCP in the various districts



A scatter plot showing the mortality rate (%) for *Anopheles gambiae* across two locations: Kisumu and Local population. The y-axis represents the mortality rate in percentage, ranging from 0 to 100. A green dashed horizontal line at 80% indicates a threshold. Data points for Kisumu are black, and data points for the Local population are red.

Location	Mortality rate (%)
Kisumu	58
Kisumu	98
Kisumu	99
Kisumu	93
Kisumu	95
Kisumu	98
Kisumu	100
Kisumu	82
Kisumu	95
Kisumu	92
Local population	36
Local population	19
Local population	0
Local population	0
Local population	8
Local population	0
Local population	2
Local population	0

A scatter plot showing the mortality rate (%) for *Anopheles gambiae* across two populations: Kisumu and Local population. The y-axis represents the mortality rate in percentage, ranging from 0 to 100. A horizontal dashed green line at 80% indicates a threshold. The Kisumu population shows higher mortality rates, with most points above 20%, while the Local population shows much lower mortality rates, mostly below 10%.

Population	Mortality rate (%)
Kisumu	56
Kisumu	57
Kisumu	31
Kisumu	41
Kisumu	25
Kisumu	25
Kisumu	65
Kisumu	11
Kisumu	10
Kisumu	44
Local population	0
Local population	2
Local population	0
Local population	0
Local population	12
Local population	0
Local population	0
Local population	2
Local population	0

RESEARCH

Open Access

Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin

Gil Germain Padonou^{1,2*}, Michel Sezonlin², Razaki Ossé^{1,2}, Nazaire Aizoun^{1,2}, Frédéric Oké-Agbo¹, Olivier Oussou¹, Ghélus Gbédjissi² and Martin Akogbéto^{1,2}

Abstract

Background: In Benin, Indoor Residual Spraying (IRS) and long-lasting insecticidal nets (LLINs) are the cornerstones of malaria prevention. In the context of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids, The National Malaria Control Program (NMCP) has undertaken a full coverage of IRS in a no-flood zone in the Oueme region, coupled with the distribution of LLINs in a flood zone. We assessed the impact of this campaign on phenotypic resistance, *knr* (knock-down resistance) and *ace-1^R* (insensitive acetylcholinesterase) mutations.

Methods: Insecticides used for malaria vector control interventions were bendiocarb WP (0.4 g/m²) and deltamethrin (55 mg/m²), respectively for IRS and LLINs. Susceptibility status of *An. gambiae* was assessed using World Health Organization bioassay tests to DDT, permethrin, deltamethrin and bendiocarb in the Oueme region before intervention (2007) and after interventions in 2008 and 2010. *An. gambiae* specimens were screened for identification of species, molecular M and S forms and for the detection of the West African *knr* (L1014F) as well as *ace-1^R* mutations using PCR techniques.

Results: The univariate logistic regression performed showed that *knr* frequency has increased significantly during the three years in the intervention area and in the control area. Several factors (LLINs, IRS, mosquito coils, aerosols, use of pesticides for crop protection) could explain the selection of individual resistant *An. gambiae*. The *Knr* resistance gene could not be the only mechanism of resistance observed in the Oueme region. The high susceptibility to bendiocarb is in agreement with a previous study conducted in Benin. However, the occurrence of *ace-1^R* heterozygous individuals even on sites far from IRS areas, suggests other factors may contribute to the selection of resistance other than those exerted by the vector control program.

Conclusion: The results of this study have confirmed that *An.gambiae* have maintained and developed the resistance to pyrethroids, but are still susceptible to bendiocarb. Our data clearly shows that selection of resistant individuals was caused by other insecticides than those used by the IRS and LLINs.

Keywords: IRS, LLIN, Bendiocarb, Deltamethrin, Resistance, *Kdr*, *Ace-1^R*, *Anopheles gambiae*, Benin

* Correspondence: pagergil@yahoo.fr

¹Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin

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

Background

Anopheles gambiae Giles (Diptera: Culicidae) is the major malaria vector in West Africa. In Benin it mainly transmits *Plasmodium falciparum* which is responsible for malaria [1]. *An.gambiae* exists in two distinct molecular forms, referred to as 'M' and 'S' based on the variation observed in molecular markers [2]. In sub-Saharan Africa, insecticide treated nets (ITNs) and indoor residual insecticide spraying (IRS) are the cornerstones of malaria vector control [3]. These vector control methods aim to reduce morbidity and mortality caused by malaria. ITNs and IRS have each been shown to be highly effective methods of malaria vector control in their own right. A recent review of the evidence of cost and consequences of large-scale vector control for malaria concluded that both ITNs and IRS are highly cost effective vector control strategies [4]. ITNs have been the mainstay of vector control in many countries in which the disease is endemic and where infrastructure limits or precludes the implementation of IRS [5]. Unfortunately the resistance of *An.gambiae* to insecticides used for malaria vector control has occurred. This resistance has been associated with all insecticidal compounds used for insect vectors of human disease, including African malaria vectors [6]. The ongoing spread of insecticide-resistant genes, such as the well-characterized *kdr* mutations [7,8] in populations of the major African malaria vectors, *An. gambiae* and its sibling species *An. arabiensis* [9-12], can seriously jeopardize the efficacy of vector control programs [13]. It has been shown that in West and West-Central Africa, the L1014F allele was frequent in the S molecular form of *An. gambiae* [9,14,15], whereas only few M form populations from the gulf of Guinea presented *kdr*-w alleles at low frequencies [14,15], except in a few urban and peri-urban coastal areas where it reached high frequencies [16,17]. Several recent studies conducted in Benin [18-21] have also indicated that *An.gambiae* is highly resistant to pyrethroids and DDT, but not to bendiocarb. It is in this context that the National Malaria Control Program (NMCP) has undertaken a full coverage of the IRS in no-flood zones in the Oueme region coupled with the distribution of mosquito treated nets in flood zones. In the situation of vector resistance to pyrethroids, the ability to use other families of insecticides is one of the alternatives available for the malaria vector control. Thus, bendiocarb WP, which gave good results in experimental huts [20], was chosen by the NMCP for the IRS at the community level. Following the first spraying campaign implemented (July/August 2008), three other cycles (March/April 2009, March/April 2010, July/August 2010) of treatment were conducted in the Oueme region. Despite the residual activity of

bendiocarb which was 4 months on cement surfaces [20], the number of rounds in 2008 and 2009 was dependent on financial resources available. IRS was not implemented in the flood zone because of the presence of water bodies, which could be at risk of contamination by insecticides. Therefore, 48,819 LLINs (Long-Lasting Insecticidal Nets, Permanet 2.0) were distributed to 47,524 households, with particular attention to children under-five and pregnant women, in October 2008 and May 2009. A quantity of 35,120 kg of deltamethrin 100% (719.4 mg per net) was contained in 48,819 LLINs distributed in the flood zone. For house spraying, a total of 128,132 kg of bendiocarb 80% was sprayed onto the walls of 166,910 human dwellings to protect a population of 512,491 in a no-flood zone.

Under these conditions, it is possible that the level of initial resistance has changed. Elsewhere in East Africa, no selection effect from the long-term use of ITNs on phenotypic resistance was noticed [22,23], whereas other studies reported a rapid increase of *kdr* mutation after four years of ITNs community use in Kenya [24] and in Equatorial Guinea [17] following a large-scale insecticide residual spraying (IRS) program. There was a similar case in West Africa, where an increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation at the end of 2005 [25] was reported. Other studies have shown the effect of insecticide treated nets (ITNs) with pyrethroids on *An. gambiae* populations and the possible selection of *kdr* alleles either in laboratory experiments [26] or experimental huts trials [27]. In Benin, the susceptibility levels of populations of *An. gambiae* to carbamates and organophosphates, the association of the reported high *kdr* frequency with the resistance phenotype, and the occurrence of other possible mechanisms of resistance are poorly understood. The present study aimed to report the first case of the impact of the three years of large scale of IRS and LLINs interventions on phenotypic resistance, *kdr* and *ace-1^R* alleles in natural populations of *An. gambiae* s.l. from southeast Benin. The results provide crucial information about potential effects of wide-scale IRS and LLIN coverage on *kdr* and *ace-1^R* mutation selection and possible effects on phenotypic resistance to deltamethrin and bendiocarb in order to improve the malaria vector control programs.

Methods

Study area

The study area is located in the Southeast of Benin (West Africa) and includes four districts of the Oueme region: Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme (Figure 1). The four districts covered 977 km² and an estimated

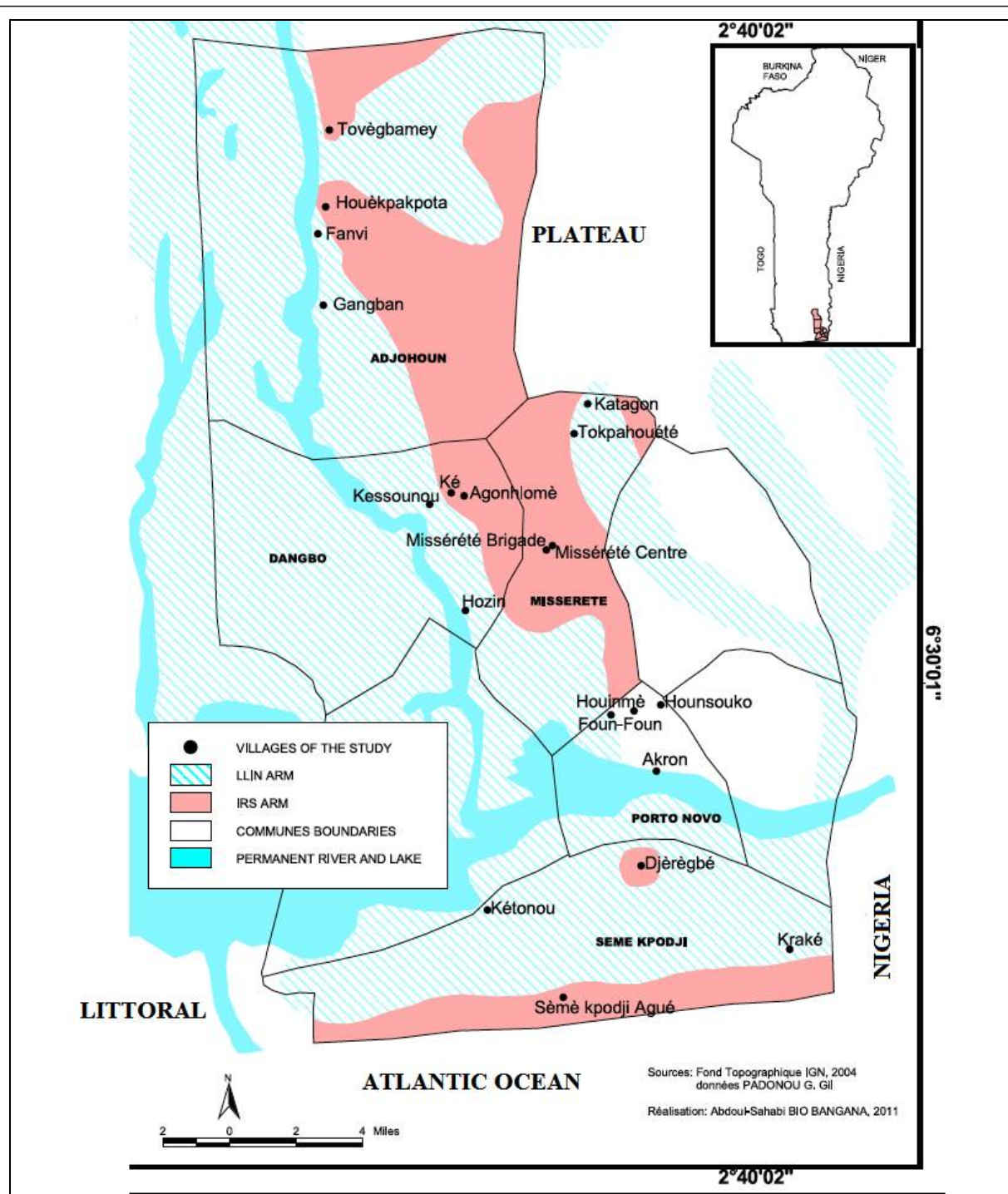


Figure 1 Map of the study area.

64,799 households. Oueme region has a sub-equatorial type climate with a monthly average temperature ranging from 20°C to 34°C and an annual average rainfall between 1,300 and 1,700 mm. Malaria transmission is stable in the Oueme region, which is irrigated by the

river Oueme, Lake Nokoue and the lagoon of Porto-Novo. These streams determine two ecological zones in the Oueme region: a plateau zone and a flood zone. In the present study, the plateau zone is referred to as the "IRS area", and the flood zone is called "LLIN area". An

estimated distance between 5 and 7 km separated the plateau and the flood areas. This distance was sufficient enough to prevent migration of mosquitoes from one area to another. The density of the human population was as high in IRS areas as in the flood zone, so that mosquitoes do not need to fly far away for blood feeding [28]. According to RTI, the coverage rate of IRS was more than 90% for each of the first three rounds.

In a context where universal access to LLINs was promoted, it was not easy to find a good control area. However, Porto-Novo, an area that presents the same ecological and geographical characteristics as the four districts mentioned above was chosen as control.

There is no IRS and free distribution of LLINs in Porto-Novo. Nevertheless some people who had bed nets, especially children and pregnant women, used them, but the proportion of consistent users was low. Before IRS implementation and the free distribution of LLINs, a baseline study of phenotype resistance with *kdr* and *ace-1^R* frequencies in *An.gambiae* populations was carried out in the study area. The baseline data is shown here for a comparison before and after interventions.

Insecticides used for IRS and ITNs

Bendiocarb 80%WP (Wettable powder) was selected for spraying onto the walls in IRS area. The application dose was 0.4 g/m² of bendiocarb on walls of houses. The four applications were implemented by volunteers selected from the local community and trained by the Research Triangle Institute (RTI) team, the implementing partner of the U.S. Agency for International Development. Nets distributed in the flood zones (LLIN area) were PermaNet 2.0. PermaNet 2.0 is a WHO recommended polyester LLIN coated with the pyrethroid deltamethrin to a target dose of 55 mg/m² ($\pm$ 25%).

Study design and mosquito collections

The mosquito sampling was conducted before the implementation of the IRS and LLIN free distribution, to provide baseline data on *kdr* and *ace-1^R* mutation frequency, whereas other collections were carried out during two years after interventions (in 2009, 13 months after the first round of IRS and 11 months after the first LLIN distribution; in 2010, 24 months after the first round of IRS and 23 months after the first LLIN distribution). To carry out this sampling, four villages, including two in the IRS area and two in the LLIN area were randomly selected in each district and two human dwellings were chosen per village for mosquito collection using human landing catches (HLC). Similarly, four villages were chosen in the control area that had received no intervention (two as IRS control area and two as LLIN control area). Adult mosquitoes were

collected twice a month with one collector located inside and another outside in each village. Mosquito collections were carried out twice a month, during three months in the wet season (September to November) in 2007, 2009 and 2010. The same human dwellings were used for HLC during the study and their characteristics were the same throughout the study. Female *An. gambiae* species were morphologically identified using morphological keys [29] and put into microtubes with dessicant, and then stored between -20 and -28°C in the laboratory before processing. Additionally in the same period of wet season in 2007, 2009 and 2010, some larval samples were simultaneously collected. Ten of the previous villages including two in each district of Dangbo and Misserete IRS area, two in each district of Adjohoun and Seme LLIN area, two in the control area were taken into account. In each village selected *An. gambiae* larvae and pupae were collected using the dipping method on several breeding sites (brick pits, pools, marshes, streams, ditches, pits dug for plastering traditional huts, puddles of water, water pockets caused by the passage of cattle and gutters) near human dwellings where the conditions of blood meals are available for Anopheles. The larvae and pupae were kept in separated labeled bottles related to each locality. Some of the larval samples were reared up to adult emergence at the CREC (Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Benin) insectary under standard conditions (25 $\pm$ 2°C; 80% $\pm$ 4% Relative Humidity), for further bioassay tests. A strain of *An. gambiae* (Kisumu) was used as reference strain to compare the susceptibility levels of the field populations.

Species identification

All mosquitoes collected by HLC and all live and dead specimens of *An. gambiae* from the bioassay test were subjected to the *An. gambiae* species specific PCR assays for species identification [30]. Aliquots of DNA extracted from PCR positive specimens of *An. gambiae* s.s. were subjected to PCR assays for identification of the molecular 'M' and 'S' forms [31].

PCR detection of the *kdr* and *ace.1^R* mutations

Polymerase chain reaction diagnostic test for detection of *kdr* "Leu-phe" mutation was carried out on *An. gambiae* mosquitoes as described by Martinez-Torres *et al.* [7]. The PCR-RFLP diagnostic test was used to detect the presence of G119S mutation (*ace.1^R* gene) as described by Weill *et al.* [32].

Insecticide susceptibility test

The insecticide susceptibility test was carried out before and after the interventions in two districts (Dangbo and Misserete) of the IRS area and in two others districts

(Adjohoun and Seme) for the LLIN area. Female mosquitoes aged 2-5 days old were exposed to diagnostic doses of various insecticides for susceptibility tests using insecticide-impregnated papers, as described by the standard WHO testing protocol [26]. The following insecticides were tested: deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%). The emphasis was also put on deltamethrin, because of a distribution of PermaNets by the NMCP in the swampy area. The use of DDT is justified by the detection of cross-resistance between pyrethroids and organo-chlorine in *Anopheles* populations [9]. Bendiocarb (carbamate) was the insecticide used in the IRS area situated far from flood zone. For each district, five test tubes were used: one untreated paper as a control and four treated papers to expose mosquitoes. Control tubes contained filter papers impregnated with silicon oil (insecticide carrier) only, whereas treated papers were impregnated with diagnostic doses of insecticide plus carrier. An average of twenty-five mosquitoes were introduced into each tube. Females of *An. gambiae* used in this study were exposed for one hour to insecticide-treated papers and monitored at different time intervals (10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) to record the "knock-down" times. After 1 hour exposure, mosquitoes were transferred into holding tubes and provided with cotton wool wet with a 10% honey solution. Mortalities were recorded after 24 hours and the susceptibility status of the population was graded according to the WHO recommended protocol [33]. Dead and surviving mosquitoes from this bioassay were kept separately in Carnoy solution at -20°C for further molecular characterization.

Statistical analysis

Using R software version 2.11.1 [34], a univariate logistic regression, was performed with *kdr* frequency as the dependent variable and the year as a covariate with ANOVA test to determine the association of *kdr* frequency (dependent variable) on the one hand with the localities and also with the years 2007, 2009 and 2010 (covariates) on the other hand. This regression has also been used to appreciate the *kdr* frequency in the intervention areas compared to the control areas. This was the same to test the association between mortality rates (dependent variable) to insecticides and localities (covariates). The ANOVA test was used to assess this association. The Wald test has been used to compare *kdr* frequency and mortality rates in the intervention areas with the control areas. To compare the *ace-1* frequency between the intervention areas and the control areas we used the Fisher exact test (Genepop software) [35] as the gene is rarely observed in mosquitoes tested. Similarly the comparison of the *kdr* and *ace-1* frequencies

from one year to another in each locality was performed using Fisher's exact test and chi-square test. A Kendall correlation test was used to study the correlation between mortality rates and survivors to deltamethrin with *kdr* frequency. The significance level was set at 5%.

Ethical approval

This study received the approval of the Ministry of Health and the National Ethics Committee. The voluntary mosquito collectors gave their consent before participating in the study. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive treatments of malaria. They were all vaccinated against yellow fever.

Results

Species and molecular forms of *Anopheles gambiae*

Species and molecular forms of *An. gambiae* s.l. collected from 2007-10 by HLC are shown in Table 1. During this study, *An. gambiae* s.s. was the only member identified in the *An. gambiae* complex. The analysis showed that all *An. gambiae* s.s. collected were molecular M form. No S form was found during the study period.

Kdr and *ace-1^R* frequencies in *An. gambiae* s.l. collected by HLC

The *kdr* mutation was the main mechanism of pyrethroid resistance identified in all localities from 2007 to 2010. Univariate logistic regression, performed with *kdr* frequency as the dependent variable and year as a covariate with ANOVA test, showed for the whole IRS area, that the *kdr* frequency was associated with the time ($p < 0.05$) and decreased significantly in 2009 compared to 2007 ($OR = 0.756 < 1$; $p < 0.05$). However, it has increased significantly in 2010 compared to 2009 ($OR = 8.120 > 1$; $p < 0.05$). Conversely, in the LLIN area, the increase in *kdr* frequency was not significant in 2009 compared to 2007 ($OR = 1.295 > 1$; $p > 0.05$) but it was significant in 2010 compared to 2009 ($OR = 5.107 > 1$; $p < 0.05$). Indeed, the *kdr* gene frequencies observed were similar in 2007 and 2009 in Dangbo, Misserete, Adjohoun and Seme LLIN area but had significantly increased in 2010 (Table 1). In the control area the level of *kdr* gene frequencies was very high and stable from 2007 to 2010 ($p > 0.05$). The *ace-1^R* mutation was 0% from 2007 to 2009 in all localities. But in 2010, heterozygous (RS) individuals of *ace-1^R* mutation were detected in all localities 24 months after the first round of IRS, except in Adjohoun, Seme LLIN and control LLIN. This variation (0-13%) was significant in Seme IRS in contrast to insignificant increase ($p > 0.05$) noticed in the localities of Control IRS, Dangbo IRS, Misserete IRS and Dangbo LLIN. A univariate logistic regression with ANOVA test showed that the increase

Table 1 Species identification, molecular forms, *kdr* and *ace-1^R* frequencies in *An.gambiae* s.l. collected by HLC

Table 1. Species identification, molecular forms, <i>kdr</i> and <i>ace.1^R</i> frequencies in <i>Anopheles sinensis</i> collected by IRS												
Species				Molecular forms		<i>kdr</i> mutation (M form)			<i>ace.1^R</i> mutation (M form)			
Localities	Years	N	Ag	M form	RR	RS	SS	<i>kdr</i> f	RR	RS	SS	<i>ace.1^R</i> f
Control IRS	2007	22	22	22	20	2	0	0.95 ^a	0	0	22	0 ^a
	2009	21	21	21	18	3	0	0.92 ^a	0	0	21	0 ^a
	2010	39	39	39	35	04	0	0.95 ^a	0	5	34	0.06 ^a
Adjohoun IRS	2007	74	74	74	28	34	12	0.61 ^a	0	0	74	0 ^a
	2009	122	122	122	48	56	18	0.62 ^a	0	0	122	0 ^a
	2010	24	24	24	21	3	0	0.94 ^b	0	0	24	0 ^a
Dangbo IRS	2007	150	150	150	85	59	6	0.76 ^a	0	0	150	0 ^a
	2009	263	263	263	133	115	15	0.72 ^a	0	0	263	0 ^a
	2010	68	68	68	65	3	0	0.98 ^b	0	4	64	0.03 ^b
Misserete IRS	2007	89	89	89	58	31	0	0.83 ^a	0	0	89	0 ^a
	2009	129	129	129	86	35	8	0.80 ^a	0	0	129	0 ^a
	2010	46	46	46	43	3	0	0.97 ^b	0	2	44	0.02 ^b
Sèmè IRS	2007	122	122	122	109	1	12	0.90 ^a	0	0	122	0 ^a
	2009	190	190	190	143	17	30	0.80 ^b	0	0	190	0 ^a
	2010	22	22	22	19	3	0	0.93 ^a	0	6	16	0.13 ^b
Control LLIN	2007	150	150	150	110	40	0	0.87 ^a	0	0	150	0 ^a
	2009	101	101	101	90	11	0	0.95 ^b	0	0	101	0 ^a
	2010	43	43	43	38	5	0	0.94 ^b	0	0	43	0 ^a
Adjohoun LLIN	2007	52	52	52	14	30	8	0.56 ^a	0	0	52	0 ^a
	2009	24	24	24	8	16	0	0.67 ^a	0	0	24	0 ^a
	2010	17	17	17	15	2	0	0.94 ^b	0	0	17	0 ^a
Dangbo LLIN	2007	124	124	124	66	54	4	0.75 ^a	0	0	124	0 ^a
	2009	96	96	96	50	40	6	0.73 ^a	0	0	96	0 ^a
	2010	58	58	58	55	3	0	0.97 ^b	0	3	55	0.02 ^a
Sèmè LLIN	2007	72	72	72	60	0	12	0.83 ^a	0	0	72	0 ^a
	2009	44	44	44	31	12	1	0.84 ^a	0	0	44	0 ^a
	2010	7	7	7	7	0	0	1 ^a	0	0	7	0 ^a

Ag: *An. gambiae*; *kdr* f: *kdr* frequency; *ace.1^R* f: *ace.1^R* frequency. Numbers in the same column sharing the same superscript do not differ significantly ($p > 0.05$)

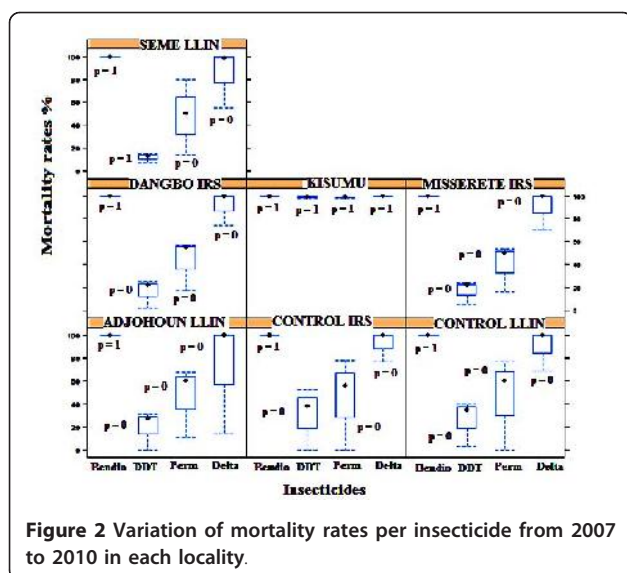
of *kdr* frequencies is associated with the intervention areas and similarly with the control area ($p < 0.05$). As the *ace-1^R* allele was rarely observed in mosquitoes tested, the Fisher exact test, revealed that the *ace-1^R* frequency was similar in the intervention communities compared to the control area ($p > 0.05$).

Insecticide susceptibility

The susceptibility of adult mosquitoes (reared from larval collection) to permethrin (0.75%), deltamethrin (0.05%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%) from 2007-10 is presented in Figure 2. The resistance status of the mosquitoes was based on the decrease in the mortality rates according to WHO criteria. From 2007-10, the susceptible strain Kisumu of *An. gambiae* displayed mortality rates above 98% for the 4 insecticides tested (Figure 2). The 24 h post-exposure mortality rate of *An. gambiae* s.l from all localities showed resistance to

DDT, permethrin and deltamethrin. In contrast, these mosquitoes were highly susceptible to bendiocarb with a mortality rate more than 99% (Figure 2). Univariate logistic regression, performed with mortality rate as the dependent variable and localities as a covariate with ANOVA test, showed that the phenotypic resistance to DDT and pyrethroid was associated with the localities ($p < 0.05$). Indeed, logistic regression performed, showed a decrease of mosquito

susceptibility for permethrin (OR = 0.70 [0.51 - 0.95]), $p < 0.05$, deltamethrin (OR = 0.27 [0.15 - 0.51]), $p < 0.05$ and DDT (OR = 0.16 [0.11-0.24]), $p < 0.05$ in Seme LLIN and for DDT (OR = 0.54 [0.39 - 0.75]), $p < 0.05$ in Adjohoun LLIN. This finding was similar to Misserete IRS for permethrin (OR = 0.53 [0.39 - 0.72]), $p < 0.05$, deltamethrin (OR = 0.27 [0.15 - 0.51]), $p < 0.05$ and DDT (OR = 0.47 [0.34 - 0.66]), $p < 0.05$, to Dangbo IRS for permethrin (OR = 0.63 [0.47 - 0.84]), p



< 0.05) and DDT (OR = 0.51 [0.37 - 0.71]), $p < 0.05$) compared to the control IRS area. Concerning the mortality rate of *An. gambiae* to deltamethrin (OR = 0.51 [0.26 - 1]) and permethrin (OR = 0.82 [0.6 - 1.12]) in Adjohoun they were similar ($p > 0.05$) to the control LLIN area. The susceptibility to bendiocarb did not

change in the LLINs and IRS areas compared to the control area ($p > 0.05$).

Kdr and *ace.1^R* frequencies in survivors and dead (susceptible) *An. gambiae* s.l. to insecticides

Ace-1^R mutation was not detected in 2 survivors and all 200 randomly drawn dead mosquitoes from the reared strain of *An. gambiae* s.l. specimens which were scored for the allele. The *kdr* genotyping performed on dead and surviving mosquitoes to deltamethrin showed that 100% of them were *An. gambiae* s.s M form. During the study period, *kdr* frequencies in alive and dead mosquito specimens from Dangbo IRS, Misserete IRS, Seme LLIN and Control area have been relatively high and has not varied significantly ($p > 0.05$) (Tables 2, 3). *Kdr* frequencies were respectively in the range of 0.78-0.91 for alive and 0.72-0.90 for dead mosquitoes (Tables 2, 3). Whereas in the Adjohoun LLIN area, it was stable at 0.60-0.64% in 2007-09 and varied to 0.83 in 2010 for live specimens (Table 2). This is the same with the *kdr* allelic frequencies in dead mosquitoes, specimens which were in the range of 0.67-0.66% in 2007-09 and varied to 0.77 in 2010 (Table 3). The correlation coefficients between the *kdr* frequency in survivors and mortality rates to deltamethrin were respectively -0.54 ($P > 0.05$),

Table 2 *Kdr* frequency in surviving *An.gambiae* s.l. population 24 h post-exposure to insecticides

Locality	Years	Number of survivors tested	Species Ag	Molecular forms M	<i>kdr</i> mutation			
					RR	RS	SS	<i>kdr</i> frequency (%)
Control area (Plateau zone)	2007	27	27	27	21	6	0	0.89 ^a
	2009	30	30	30	24	6	0	0.90 ^a
	2010	25	25	25	22	3	0	0.86 ^a
Control area (Flood zone)	2007	25	25	25	21	4	0	0.92 ^a
	2009	28	28	28	23	5	0	0.91 ^a
	2010	25	25	25	22	3	0	0.82 ^a
Adjohoun (LLIN area)	2007	50	50	50	22	20	8	0.64 ^a
	2009	30	30	30	11	14	5	0.60 ^a
	2010	24	24	24	16	8	0	0.83 ^b
Dangbo (IRS area)	2007	58	58	58	37	17	4	0.78 ^a
	2009	60	60	60	38	22	0	0.82 ^a
	2010	25	25	25	19	6	0	0.88 ^a
Misserete (IRS area)	2007	56	56	56	40	16	0	0.86 ^a
	2009	30	30	30	23	6	1	0.87 ^a
	2010	22	22	22	18	4	0	0.91 ^a
Seme (LLIN area)	2007	54	54	54	49	1	4	0.92 ^a
	2009	21	21	21	19	2	0	0.95 ^a
	2010	25	25	25	20	5	0	0.90 ^a

Ag: *An. gambiae*; Numbers in the same column sharing the same superscript do not differ significantly ($p > 0.05$)

Table 3 *Kdr* frequency in dead *An.gambiae* s.l. population 24 h post-exposure to insecticides

Locality	Years	Number of dead tested	Species Ag	Molecular forms M	<i>kdr</i> mutation			
					RR	RS	SS	<i>kdr</i> frequency (%)
Control area (Plateau zone)	2007	27	27	27	20	7	0	0.87 ^a
	2009	30	30	30	22	8	0	0.87 ^a
	2010	25	25	25	20	3	2	0.86 ^a
Control area (Flood zone)	2007	25	25	25	20	5	0	0.90 ^a
	2009	28	28	28	20	8	0	0.86 ^a
	2010	25	25	25	19	3	3	0.82 ^a
Adjohoun (LLIN area)	2007	50	50	50	21	25	4	0.67 ^a
	2009	30	30	30	15	10	5	0.66 ^a
	2010	24	24	24	14	9	1	0.77 ^b
Dangbo (IRS area)	2007	58	58	58	33	19	6	0.73 ^a
	2009	60	60	60	34	22	4	0.75 ^a
	2010	25	25	25	15	6	4	0.72 ^a
Misserete (IRS area)	2007	56	56	56	39	17	0	0.85 ^a
	2009	30	30	30	22	6	3	0.81 ^a
	2010	22	22	22	18	4	3	0.80 ^a
Seme (LLIN area)	2007	54	54	54	45	5	4	0.88 ^a
	2009	21	21	21	15	5	1	0.83 ^a
	2010	25	25	25	19	4	2	0.84 ^a

Ag: *An. gambiae*; Numbers in the same column sharing the same superscript do not differ significantly ($p > 0, 05$)

-0.43 ($P > 0. 05$) and 0.84 ($P < 0.05$) in 2007 year, 2009 and 2010.

Discussion

The results have shown that *An. gambiae* s.s. M form was the major malaria vector species biting in the Oueme region. This corroborates previous reports [21] of the anopheline distribution in southeast Benin, which explained the absence of the S molecular form by the ecological characteristics of the Oueme region that did not support its selection. The findings have also shown that *kdr* gene frequencies were stable from 2007 to 2009 in the LLIN area but had significantly increased in 2010. Despite the LLIN distribution, the cause of this stability of *kdr* gene frequencies from 2007 to 2009 is unknown, because the same results were obtained in the control area that has not benefited from the distribution of LLINs. But, a similar trend reported by a study in Bioko between 1998 and 2001 showed no evidence of *kdr* in the *An. gambiae* s.s. population despite the use of pyrethroid-impregnated bednets [36]. It was on the basis of this study that the decision was made to implement IRS with a pyrethroid insecticide in Bioko [37]. However, in 2010, a significant increase of *kdr* mutation frequency

was observed in Dangbo, Misserete, Adjohoun and Seme LLIN around 23 months after the first LLIN distribution, and 16 months after the second. This increase was corroborated with the strong correlation (correlation coefficient $R^2 = 0.84$; $P < 0.05$) between the *kdr* frequency and the survival rate obtained among the *An. gambiae* s.l. populations tested with deltamethrin. Indeed the main mechanism of resistance to pyrethroids is the mutation Leu 1014F *kdr* allele in Benin. Recent studies have shown that this mutation is expanding in the South [21,38] and North Benin [38]. This high mutation could explain the resistance to deltamethrin in *An. gambiae* collected from HLC and breeding sites of all localities including the control area, in 2010, two years after the implementation of vector control. Similarly, the resistance to permethrin and DDT has been maintained and became higher. These findings corroborate previous studies that had reported resistance of *An. gambiae* to DDT and permethrin in Benin [18,21,39] and in Ethiopia [40] to DDT, permethrin and deltamethrin. Although suspected, the selective pressure exerted by the promotion of mosquito nets by the Ministry of Health and the free distribution of LLINs in the Oueme region, causing the *kdr* increase within *An. gambiae*

populations is doubtful. Because the findings showed a significant decrease in deltamethrin mortality rates from 85% to 46% in LLIN area and 32% to 22% in IRS area and control area. Other previous studies have shown that the selection of resistance to pyrethroids in the populations of malaria vectors was due to the extensive use of LLIN [41,42]. Hence, resistance selection in the *An. gambiae* population to deltamethrin seemed most likely to have been developed as a consequence of exposure of adult mosquitoes to this insecticide from LLINs distributed in LLIN areas. Moreover, the high domestic pyrethroid use [18,21], the contamination of soil by using pesticides for crop protection [18] in the Oueme region, could justify the resistance to deltamethrin in control and IRS areas who had not benefited from the distribution of LLINs. This hypothesis was supported by previous studies in Mali that showed an increase in *kdr* frequencies in the absence of any wide-scale control program [12]. This diversity of factors (LLINs, IRS, mosquito coils, aerosols, use of pesticides for crop protection) that select individual resistant *An. gambiae* could also explain the spatial variation of low susceptibility of mosquitoes to insecticides. *Kdr* resistance gene was not the only mechanism of resistance observed in the Oueme region. This could justify the highest *kdr* frequency observed among the strain susceptible to deltamethrin. According to previous studies in Benin, high activity of esterases and oxidases was detected in populations of *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus* resistant to pyrethroids [26]. Hence, further investigations are required to determine the role of *kdr* in conferring resistance and the presence of other resistance mechanisms involved in the different classes of insecticides [43]. Indeed, when exposed to several insecticides, *An. gambiae* develops a resistance to these chemicals through several mechanisms of adaptation. Therefore, major challenges to malaria control in Africa must include the monitoring of resistance of mosquitoes to insecticides, but should also involve the education of people on the appropriate use of insecticides.

After four rounds of bendiocarb IRS from 2008 to 2010, *An. gambiae* remained susceptible to bendiocarb. This finding is in agreement with a previous study conducted in Benin [20,21,44] and in Bioko where the number of *An. gambiae* s.s. exiting through window traps were significantly reduced and remained low with subsequent IRS rounds with a bendiocarb [4]. This susceptibility of *An. gambiae* to bendiocarb may be explained by the absence of individual homozygous RR in the Oueme region. In *Culex pipiens* populations the *ace-1* mutation has been associated with a high fitness cost [45] and the same may be true in *An. gambiae* s.s. as the frequency of the *ace-1* mutation in mosquito populations declines rapidly after a few generations in the

absence of selection pressure from organophosphates or carbamates insecticides [46]. Similarly, Djogbenou *et al.* reported that the main cost of resistance found for *An. gambiae* mosquitoes homozygous for the G119S mutation was that they were significantly more likely to die during pupation than their susceptible counterparts [47]. But after the fourth round of IRS in 2010 heterozygous (RS) individuals of *ace-1* mutations were detected in a few localities, with a significant variation (0-13%) of *ace-1* frequency in Seme IRS in contrast to insignificant increase ($p > 0.05$) noticed in the localities of Control IRS, Dangbo IRS, Misserete IRS and Dangbo LLIN. This occurrence of heterozygous individuals, in the intervention area in 2010 could be attributed to a high selection pressure, because two rounds of IRS had been carried out that year. However, the occurrence of heterozygous individuals even at sites far from the sprayed areas, suggests other factors than those exerted by the vector control program. The *ace-1* mutation may have migrated from treated to untreated areas, explaining the parallel increase in those areas. Conversely, the greater frequency of *ace-1* mutation in *An. gambiae* specimens in Seme IRS, despite the fact that they are interspersed by at least 5 km with untreated control area and LLIN area, may suggest a possible migration of *ace-1* mutation to untreated areas. If migration is restricted, the selection pressure in the untreated areas may be caused by other than the one induced by IRS. Indeed, recent studies [18,48] showed that this region has a different bioclimatic characteristic with high rainfall (1,500 mm annually), where insecticides are extensively used for agriculture. This suggests that selection of resistant individuals has been caused by insecticides used for other purposes apart from those used by the IRS, although it is difficult to identify the specific activity with the present study.

Conclusion

The results of this study have confirmed that natural populations of *An. gambiae* in the Oueme region have maintained and developed their resistance to pyrethroids, but are still susceptible to bendiocarb. In Africa the pyrethroid resistance had highly increased in *An. gambiae* populations. This increase coincided with the period where chemical vector control was deployed with unprecedented levels of coverage in Africa. In this context there was selection of resistant individuals in the treated areas (LLINs and IRS), however, in untreated or control areas, the selection of resistance recorded may have been caused by unknown factors other than LLINs and IRS. These findings have important implications for malaria vector control programs using IRS and LLIN. Firstly, assessment and monitoring of resistance to pyrethroids and bendiocarb in malaria vector control should

be a priority to help correct the current malaria preventive activities and guide in the selection of insecticides to use in the future for malaria vector control in Benin. Secondly, strategies for resistance management [49,50] should be implemented to delay the development or expansion of insecticide resistance by the rotation or the mixture of different classes of insecticides with different target sites. Thirdly, it is necessary to implement a dialogue and partnerships between the fields of health and agriculture in order to coordinate the appropriate use of insecticides with reciprocal benefits for both parties.

Acknowledgements

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative), which financially supported this study through USAID and RTI. The authors would like to thank Adango Arnaud, Houndeton Geraldo, Koudonoukpo Sebastien, Azondekon Roseric for their technical assistance apopulations of Adjohoun, Dangbo, Seme, and Misserete for their collaboration.

Author details

¹Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin. ²Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin.

Authors' contributions

GGP, MS, RO and MA designed the study. GGP, NA and OO carried out the experiments. GGP and FO analyzed the data. GGP and MS drafted the manuscript. MA, GG and MS critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 12 February 2012 Accepted: 10 April 2012

Published: 10 April 2012

References

1. Akogbeto M, Chippaux JP, Coluzzi M: Le paludisme urbain côtier à Cotonou (Republique du Benin). *Revue Epidemiologie et Sante Publique. Rev Epidemiol Sante Publique* 1992, **40**:233-239.
2. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sideen-Kiamos I, Louis C: Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 2001, **10**(1):19-23.
3. Curtis CF, Myamba J, Wilkes TJ: Comparison of different insecticides and fabrics for antimosquito bednets and curtains. *Med Vet Entomol* 1996, **10**:1-11.
4. Kleinschmidt I, Schwabe C, Shiva M, Segura JL, Sima V, Mabunda SJA, Coleman M: Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *AmJTrop Med Hyg* 2009, **81**(3):519-524.
5. Roll Back Malaria Partnership: *Consensus Statement on Insecticide-Treated Netting and Indoor Residual Spraying* Geneva, World Health Organization; 2004 [http://rbm.who.int/partnership/wg/wg_LLIN/docs/RBMWIN StatementVector.pdf].
6. Hemingway J, Ranson H: Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 2000, **45**:371-391.
7. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
8. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH: Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 2000, **9**:491-497.
9. Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P: Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 1999, **15**:53-59.
10. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabiré KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Chandre F: The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health* 2004, **9**:1267-1273.
11. Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C, Nwane P, Chouaibou M, Ndjemai H, Simard F: First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *AmJTrop Med Hyg* 2006, **74**(5):795-797.
12. Tripet F, Wright J, Cornel A, Fofana A, McAbee R, Meneses C, Reimer L, Slotman M, Thiemann T, Dolo G, Traoré S, Lanzaro G: Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (kdr) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. *AmJTrop Med Hyg* 2007, **76**:81-87.
13. Chouaibou M, Etang J, Brevault T, Nwane P, Hinzoumbe CK, Mimpfoundi R, Simard F: Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop Med Int Health* 2008, **13**:476-486.
14. Kristan M, Fleischmann H, Della Torre A, Stich A, Curtis CF: Pyrethroid resistance/susceptibility and differential urban/rural distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana. *Med Vet Entomol* 2003, **17**:326-332.
15. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, Della Torre A: Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J* 2008, **7**:74.
16. Tia E, Akogbeto M, Koffi A, Toure M, Adja AM, Moussa K, Yao T, Carnevale P, Chandre E: Pyrethroid and DDT resistance of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) in five agricultural ecosystems from Côte-d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* 2006, **99**:278-282.
17. Reimer LJ, Tripet F, Slotman M, Spielman A, Fondjo E, Lanzaro GC: An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Mol Biol* 2005, **14**:683-688.
18. Akogbeto M, Yakoubou S: Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **92**(2):123-130.
19. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.
20. Akogbeto MC, Padonou GG, Gbenou D, Irish S, Yadouleton A: Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J* 2010, **9**:204.
21. Padonou GG, Sezonlin M, Gbedjissi GL, 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**(4):59-68.
22. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Mount DL, Roberts JM, Mwangi RW: Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Med Vet Entomol* 1996, **10**:71-79.
23. Kulkarni MA, Malima R, Mosha FW, Msangi S, Mrema E: Efficacy of pyrethroid-treated nets against malaria vectors and nuisance-biting mosquitoes in Tanzania in areas with long-term insecticide-treated net use. *Trop Med Int Health* 2007, **12**:1061-1073.
24. Stump AD, Atieli FK, Vulule JM, Besansky NJ: Dynamics of the pyrethroid knockdown resistance allele in western Kenyan populations of *Anopheles gambiae* in response to insecticide-treated bed net trials. *AmJTrop Med Hyg* 2004, **70**:591-596.
25. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB: Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J* 2008, **7**:189.
26. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F: Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J* 2004, **3**:22.

27. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM: **Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes.** *Malar J* 2005, **4**:25.
28. Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL: **Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with Bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids.** *AmJTrop Med Hyg* 2011, **85**(4):586-593.
29. Gillies MT, De Meillon B: *The Anophelinae of Africa south of the Sahara* Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg; 1968, 54.
30. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH: **Identification of single specimens of *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction.** *AmJTrop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
31. Favia G, Della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti J, Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: **Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation.** *Insect Mol Biol* 1997, **6**:377-383.
32. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie M, Raymond M: **The unique mutation in *Ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect Mol Biol* 2004, **13**:1-7.
33. World Health Organisation: **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces.** Document WHO/CDS/CPC/MAL/98.12 Geneva, Switzerland 1998 [http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CDS_CPC_MAL_98.12.pdf].
34. R Development Core Team: **R A language and environment for statistical computing.** 2.11.1. ed. Vienna Austria 2010.
35. Raymond M, Rousset F: **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** *J Heredity* 1995, **86**:248-249.
36. Berzosa PJ, Cano J, Roche J, Rubia JM, Garcia L, Moyano E, Guerra A, Mateos JC, Petracca V, Do Rosaria V, Benito A: **Malaria vectors in Bioko island (Equatorial Guinea): PCR determination of the members of *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae) and pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in *An. gambiae sensu stricto*.** *J Vector Ecology* 2002, **27**:102-106.
37. Sharp BL, Ridl FC, Govender D, Kuklinski J, Kleinschmidt I: **Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko.** *Equatorial Guinea Malar J* 2007, **6**:52.
38. Djègbè 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.
39. 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.
40. Balkew M, Ibrahim M, Koekemoer LL, Brooke BD, Engers H, Aseffa A, Gebre-Michael T, Elhassen I: **Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from villages in central, northern and south west Ethiopia and detection of *kdr* mutation.** *Parasit Vectors* 2010, **3**(1):40.
41. Lines JD: **Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes, a look at the evidence.** *Parasitol Today* 1988, **4**:17-20.
42. Protopopoff N, Verhaeghen K, Van Bortel W, Roelants P, Marcotty T, Baza D, D'Alessandro U, Coosemans M: **A high increase in *kdr* in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**:1479-1487.
43. Yewhalaw D, Wassie F, Steurbaut W, Spanoghe P, Van Bortel W, Denis L, Tessema DA, Getachew Y, Coosemans M, Duchateau J, Speybroeck N: **Multiple insecticide resistance: an impediment to insecticide-based malaria vector control program.** *PLoS One* 2011, **6**(1):16066.
44. Djogbenou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F: **Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey.** *Med Vet Entomol* 2009, **69**:160-164.
45. Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C: **Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation?** *Genetica* 2001, **112**:287-296.
46. Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M: **Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**(4):1056-1067.
47. Djogbenou L, Noel V, Agnew P: **Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation.** *Malar J* 2010, **9**:12.
48. Yadouleton WA, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard Kinde D, Akogbeto CM: **Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin.** *Malar J* 2010, **9**:83.
49. Ngufor C, N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Vigninou E, Asidi A, Akogbeto M, Rowland M: **Combining indoor residual spraying with chlorfenapyr and long-lasting insecticidal bed nets for improved control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*: an experimental hut trial in Benin.** *Malar J* 2011, **10**:343.
50. Corbel V, Henry MC: **Prevention and control of malaria and sleeping sickness in Africa: where are we and where are we going?** *Parasit Vectors* 2011, **4**:37.

doi:10.1186/1756-3305-5-72

Cite this article as: Padonou *et al.*: Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasites & Vectors* 2012 **5**:72.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Full Length Research Paper

Relationship between the presence of *kdr* and *Ace-1* mutations and the infection with *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s. in Benin

Razaki Ossè^{1,2*}, Virgile Gnanguenon¹, Michel Sèzonlin², Rock Aïkpon^{1,2}, Gil Padonou^{1,2}, Anges Yadouléton¹ and Martin C. Akogbéto^{1,2}

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

²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey Calavi, Benin.

Accepted 26 November, 2012

Several published reports have been devoted to insecticide resistance in *Anopheles gambiae* in Africa. However, there are still not enough published reports about the impact of insecticide resistance on malaria transmission. In this study, we proposed to investigate the presence of the circum-sporozoite antigen of *Plasmodium falciparum* in *A. gambiae* carrying *kdr* and *Ace-1* genes. *A. gambiae* (3,112) were analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), circum-sporozoite protein (CSP) test. The DNA from these samples was extracted and a polymerase chain reaction (PCR) was performed using *kdr* and *Ace-1* markers. We used Chi-square statistical test to determine the relationship between the resistance genotypes and the rates of infections with *P. falciparum*. The results showed that the *kdr* allele was found at a very high frequency (0.80 on average) in the 14 populations of *A. gambiae* s.s. sampled in spite of their molecular forms (M or S). The *Ace-1* gene was also observed in some localities, but at a low frequency (0.3 on average). The ELISA-CSP tests performed on parous females carrying the *kdr* gene showed that there was no significant difference between the allele frequencies of infected and non-infected females. *kdr* and *Ace-1* resistance genes did not affect the *A. gambiae* s.s. infection with *P. falciparum*.

Key words: Resistance, mutation, *P. falciparum*, circum-sporozoite protein (CSP).

INTRODUCTION

Malaria is regarded as the most important parasitic diseases responsible for high morbidity and mortality (Gentilini, 1991). The recent WHO world malaria report 2011 (WHO, 2011) showed an estimated 216 million malaria cases worldwide in 2010 of which 81% occurred in Africa. In Benin, malaria is endemic and seasonal throughout the year. Overall malaria represents 37% of the hospital consultations and it is one of the first causes of morbidity and mortality recorded in hospitals. Pregnant women and children under five are the most vulnerable

persons at risk (PNLP, 2007). Malaria is mainly transmitted in tropical Africa by *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* (Louise et al., 2009; Djénontin et al., 2010a). In the past, *A. gambiae* s.l. was considered as a unique species, but cytogenetic studies based on chromosomal inversions showed that it is rather a complex made of seven species presenting the same morphological patterns (Hunt et al., 1998). Among the seven sibling species, *A. gambiae* s.s. and *A. arabiensis* are responsible for 90% of malaria transmission in the African tropics (Mouchet et al., 2004). *Plasmodium falciparum* (Pf) is the most virulent parasite species which causes severe and complicated malaria. Infection by *P. falciparum* is reported worldwide in Central and Latin America, Asia and South East Asia, Pacific Islands and

*Corresponding author. E-mail: ossraz@yahoo.fr. Tel: (229) 97689285. Fax: (229) 21308860.

Sub-Saharan Africa where *P. falciparum* is predominant (WHO, 2009).

To date, there has not been any available vaccine against malaria, yet the possible anti-malaria chemoprophylaxis still remain absolutely restrictive; therefore, vector control would essentially be the primary means of malaria prevention. The two main control methods against *Anopheles* vectors are Indoor Residual Spraying (IRS) and Long Lasting Insecticidal Treated Nets (LLINs) (OMS, 2006). But the longstanding use of insecticides, especially in agricultural areas, has led to the development of insecticide-resistant strains in the midst of the vector populations (Akogbéto and Yakoubou, 1999; Chandre et al., 1999a; Diabaté et al., 2001). The resistance mechanism developed by *Anopheles* vectors to insecticides is mainly due to a target genetic mutation called *kdr* mutation. The mutation results in both the reduction of "knockdown" and the lethal effect of pyrethroids used for mosquito net treatment (Chandre et al., 1999b; Corbel et al., 2004). The reports of Fanello et al. (2001) and Weill et al. (2000) in West Africa showed the presence of *kdr* mutation in the S molecular form of *A. gambiae* s.s. In Benin, and later in many West African countries, the *kdr* mutation was detected in both the S and M molecular forms of *A. gambiae* s.s. (Akogbéto, 2001; Djènontin et al., 2010b) at a very high frequency (Djègbé et al., 2011). Resistance to carbamates and organophosphates, due to the glycine to serine substitution at position 119 (G119S) in the gene that encodes for acetylcholinesterase 1 (*Ace-1*) (Weill et al., 2003) was also reported in *A. gambiae* s.s. from West Africa (Djogbénou et al., 2008a; Weill et al., 2004). This G119S mutation is found in association with resistance in the M and S molecular forms (Ahoua et al., 2010), and sequence comparison between forms at this locus suggests a unique mutational event that co-occurs in both forms through introgression from the S form (Djogbénou et al., 2008b).

In a recent study from Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) (Gnanguenon et al., 2013), it was shown that the *A. gambiae* specimens carrying *kdr* resistance gene, especially the RR genotypes (resistance homozygotes), were more likely to pass through the holes of LLINs better than the sensitive SS (susceptible homozygotes). Actually, the number of mosquitoes analyzed through this study was only indicative. Hence, the author suggested that the study will need to be carried out on a more significant sample size from several localities. Previous reports have shown that *kdr* resistant mosquitoes stay longer in contact with the nets despite the excito-repellent effect of the insecticide treatment. This fact appears to be an advantage in tackling *kdr* resistant mosquitoes for further control measures of this particular strain.

In addition, the impact of insecticide resistance in malaria vectors on the efficacy of Insecticidal Treated

Nets (ITNs) and IRS has been reported in experimental huts in South Benin by N'guessan et al. (2007). This report showed a high survival rate of resistant *A. gambiae* from huts with either ITNs or an IRS treatment. Contrastingly in the susceptible area of North Benin, the mortality rate of *A. gambiae* was above 90% in treated huts. Similarly, a most recent report by Asidi et al. (2012) confirmed a loss of household protection from ITNs in areas of South Benin where *A. gambiae* is pyrethroid resistant. To date, the impact of vector resistance at operational level has not yet been observed where ITNs and IRS are being widely used (Henry et al., 2006). If the insecticide resistance has an impact on the vector control operations, then resistant mosquitoes would be more infected than susceptible mosquitoes in areas where the selection pressure by LLINs or IRS is high. As a matter of fact, the resistant mosquitoes were supposed to be older since the susceptible mosquitoes were more exposed to the lethal dose of impregnated materials and get killed subsequently.

In this study, we evaluated the strength of association between mosquitoes carrying a resistance allele and the presence of circum-sporozoite protein (CSP) within the two molecular forms M and S of *A. gambiae* s.s. We then investigated the presence of circum-sporozoite antigens of *P. falciparum* in some females of *A. gambiae* collected from several localities of Benin. The females carrying sporozoites were then genotyped and compared to uninfected control samples from the same population. A contingency table helped to show if there was a strong association between the risk of infection in both molecular forms (M and S) and the resistance genotype.

METHODOLOGY

Study areas

This study was conducted from 2009 to 2011 during both dry and rainy season in 14 localities selected from the transect south to north which includes the major ecological systems and various agricultural practices throughout Benin: Sèmè, Dangbo, Adjohoun, Adjara, Missérété and Tori-Bossito located in a cereal zone in the South of Benin; Bamè located in a rice zone in the center of Benin; Pehunco, Kouandé, Cobly, Boukoubé, Tangiéta and Toukountouna located in a cotton and cereal growing area in high altitude of northwest Benin; Malanville, a rice growing zone in North Benin at the boarder of Niger Republic (Figure 1).

The diversity of ecological facies was taken into account in order to collect both M and S molecular forms of *A. gambiae* with related frequencies of RR, RS and SS resistance genotypes for comparison. Moreover, it was not obvious at the beginning to find a great number of *A. gambiae* infected with *P. falciparum* in the current context of widespread use of treated nets by the populations. But we thought we could increase our chance of finding an area where *A. gambiae* infection rate would be relatively high by varying the ecological areas.

In the localities of the south and center, the climate is characterized by a low temperature (23°C). The average annual temperature is 27°C with an annual rainfall mean varying from 820

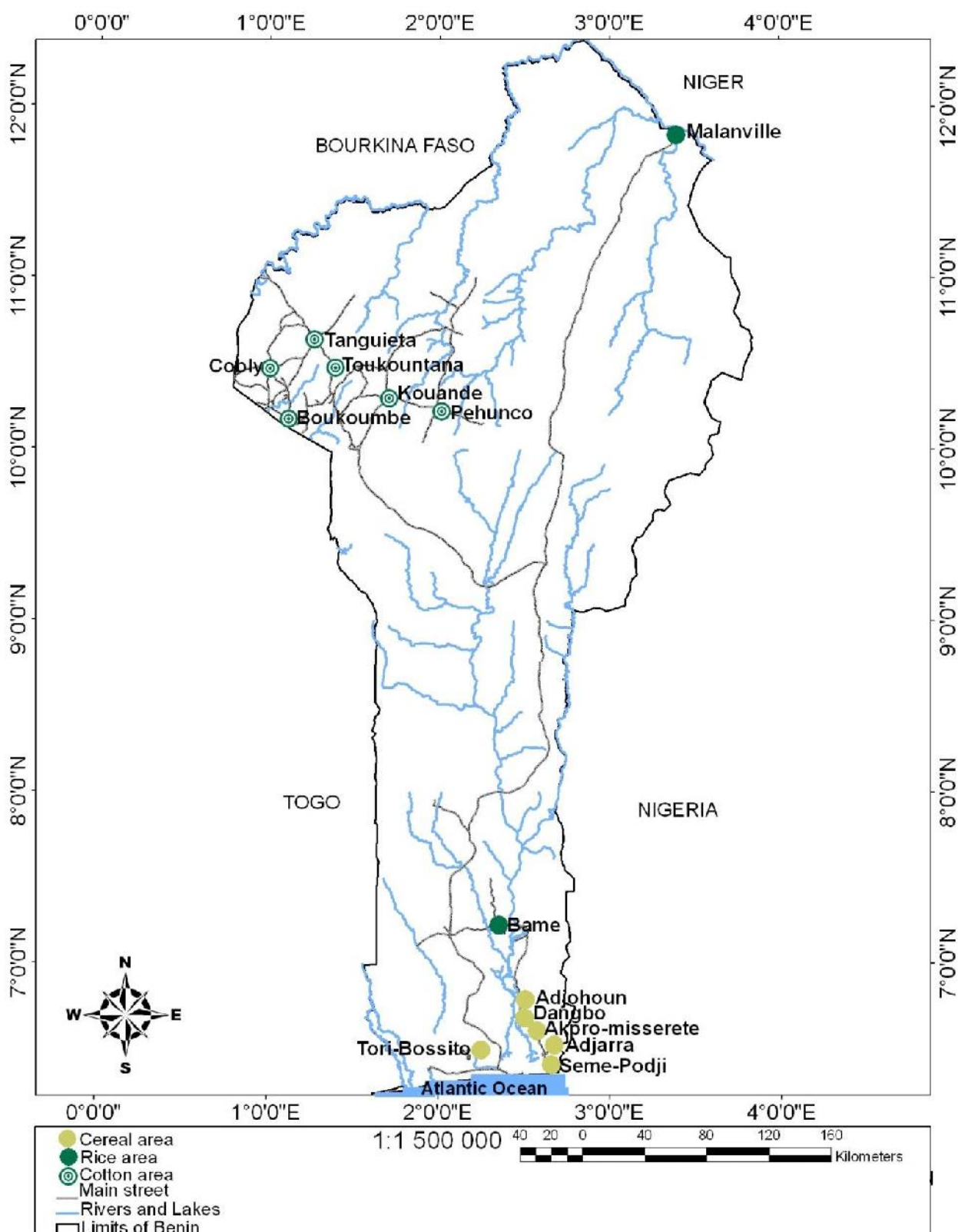


Figure 1. Map of Benin showing the localities in the northern and the southern sites of the study area.
Source: Fond topographique IGN 2004, Benin, Razaki OSSE and Virgile Gnanguenon.

Table 1. Frequency of *kdr* alleles and genotypes observed in the M and S forms of *A. gambiae* s.s. in North and South Benin.

Locality	<i>kdr</i> mutation L1014F									
	M Form			Frequency		S Form			Frequency	
	RR	RS	SS	R (%)	S (%)	RR	RS	SS	R (%)	S (%)
Sèmè	64	3	0	97.76	2.24	-	-	-	-	-
Dangbo	120	3	0	98.78	1.22	-	-	-	-	-
Adjohoun	117	55	13	78.1	21.9	4	10	0	64.28	35.72
Adjara	148	3	0	99	1	-	-	-	-	-
Missérété	41	2	0	97.67	2.33	-	-	-	-	-
Tori-Bossito	247	78	45	77.29	22.71	27	16	29	48.61	51.39
Bamè	175	62	2	86.19	13.81	2	0	0	100	0
Pehunco	-	-	-	-	-	10	14	0	70.83	29.17
Kouandé	-	-	-	-	-	24	2	0	96.15	3.85
Cobly	-	-	-	-	-	15	4	0	89.47	10.53
Boukoumbé	-	-	-	-	-	9	16	0	68	32
Tanguiéta	-	-	-	-	-	22	3	1	90.38	9.62
Toukountouna	-	-	-	-	-	12	9	3	68.75	31.25
Malanville	33	27	18	59.61	40.39	4	0	0	100	0
Total	945	233	78	84.51	15.49	129	74	33	70.33	29.67

to 1,200 mm. By contrast in the north, the climate is characterized by a long dry season from November to April and one rainy season from May to September. The average temperature is about 27°C with an annual rainfall of 750 mm.

Mosquito collection

The mosquitoes analyzed were collected using three sampling methods: (1) human landing catches (HLC), (2) indoor pyrethrum spray catches (PSC), and (3) window-traps (WT) installed at the windows of selected houses.

For the HLC collection, two villages were selected per site and two houses per village to collect mosquitoes. The collection was carried out twice a month by adult volunteers who have given their informed consent. In each house, a collector was positioned inside and another outside. They caught any mosquitoes that landed on their legs with an aspirator from 9.00 p.m to 5.00 a.m. Considering the risk of malaria transmission, the collectors were given an antimalarial prophylaxis as a prevention against malaria. During the course of this study, all mosquito collectors were monitored for any malaria symptom noticed, an immediate parasitological test would take place followed by an antimalarial treatment if necessary.

For the indoor pyrethrum spray catches, we used pyrethrum spray and white canvas spread on the floor to collect knocked down mosquitoes from 7 to 9 a.m.

Regarding to the WT collection mentioned earlier, four bedrooms were selected in each of the villages chosen for the study. The window-traps used were made of a mesh of terylene (synthetic fiber) mounted on a cubical iron frame with an edge measuring 30 cm, with 1 side drawn into a funnel to direct mosquitoes into the trap (Bar-Zeev and Self, 1966). The trap was fixed to a plywood sheet that could be fitted to window frames of differing sizes. The traps were placed before dusk and emptied of mosquitoes at 7 a.m.

Laboratory processing of mosquitoes collected

The collected mosquitoes were identified using a morphological

identification key of Coluzzi (1964). The specimens of *A. gambiae* were stored separately according to the locations they were collected from, then labeled and conserved in Eppendorf tubes containing silica gel. The whole Eppendorf tubes were stored in a freezer at -20°C before any further analyses.

Any mosquito that was to undergo the enzyme-linked immunosorbent assay-CSP test (ELISA-CSP) as well as the polymerase chain reaction (PCR) test was divided in two parts: the head-thorax was kept to process ELISA-CSP and the abdomen left to perform PCR. The search for the circum-sporozoite antigen of *P. falciparum* was carried out following the method of Wirtz et al. (1987). The carcasses (abdomen, legs and wings) of each mosquito were used to identify molecular forms and genotypes of *kdr* and *Ace-1* mutations according to the protocols described by Favia et al. (2001), Martinez-Torres et al. (1998) and Weill et al. (2004), respectively.

Data analysis

The genotype differentiation between the vectors that tested positive and negative to the ELISA-CSP test regarding *kdr* and *Ace-1* mutations was tested using Fisher's exact test with GENEPop software. Chi square test was used to reveal if there was any possible association between *A. gambiae* s.s. that tested positive to CSP and the resistant genotypes for *kdr* and *Ace-1* mutations.

RESULTS

Allele frequency of *kdr* and *Ace-1* mutations in the M and S molecular forms

A total of 3,112 females of *A. gambiae* from different localities were analyzed. The two M and S molecular forms of *A. gambiae* s.s. were identified with a complete predominance of the M form (93.04%, n=1,975) in the

Table 2. Positivity indexes in CS of *P. falciparum* regarding the M and S forms of *A. gambiae* s.s.

Locality	Total tested	M form		S form	
		CS+	CS+ (%)	CS+	CS+ (%)
Sèmè	175	9	5.14	-	-
Dangbo	207	17	8.21	-	-
Adjohoun	226	10	4.42	-	-
Adjara	334	13	3.89	-	-
Misséréte	75	4	5.33	-	-
Tori-Bossito	534	35	6.55	-	-
Bamè	424	29	6.84	-	-
Pehunco	105	-	-	3	2.86
Kouandé	76	-	-	9	11.84
Cobly	352	-	-	15	4.26
Boukoumbé	180	-	-	3	1.67
Tanguiéta	46	-	-	4	8.7
Toukountouna	56	-	-	4	7.14
Malanville	322	14	4.35	1	0.31
Total	3,112	131	5.7	39	4.77

localities of Southern Benin, while the S form (94.87%, n=815) was found to be more frequent in the northern localities, except Malanville which showed a higher rate of the M form (95.12%, n=322) (Table 1). A sample of 1,492 individuals belonging to the two molecular forms was analyzed with PCR for *kdr* mutation. The allele frequency of this mutation varied from 59.61 (Malanville, n=78) to 99% (Adjara, n=151). The *kdr* frequency was 84.51% regarding the M molecular form specimens from the southern sites of Benin and 70.33% of the S form was mainly recorded in the specimens from the northern sites (Table 1). The susceptibility of each of the two forms for *kdr* mutation was calculated using the proportion *kdr* frequency in the M and S forms relative to the localities where the two populations were found in sympatry. Thus, in Malanville (Northern Benin), the frequency was higher in the S form (100%, n=4) than the M form (59.61%, n=78), which is in agreement with the results of a large number of published reports from West Africa (Dabiré et al., 2008). On the other hand, it was contrastingly different in the South Benin sites of Adjohoun where 78.10% of the M form (n=185) and 64.28% of the S form (n=14) ($P<0.05$) was recorded. Similarly, in Tori-Bossito (Southern Benin), 77.29% of the M form (n= 70) and 48.61% for the S form (n=72) ($P<0.05$) were recorded (Table 1). The *Ace-1* mutation was only observed in the localities of Adjara, Sèmè, Pehunco, Cobly and Toukountouna at a very low frequency varying from 2.63 (Cobly, n=19) to 10.41% (Toukountouna, n=24). The average frequency for the M form was 3% and 3.71% for the S form.

Positivity index of the circum-sporozoite antigen of *P. falciparum* in the M and S forms of *A. gambiae*

The results of the ELISA-CSP tests (Table 2) showed a mean positivity index of 5.46% for *An. gambiae* s.s. which varies from one locality to another. It was 1.67% in Boukoumbé against 11.84% in Kouandé. The positivity index in *A. gambiae* s.s. with M molecular form reached 5.70% varying within localities where 3.89% was recorded in Adjara and 8.21% in Dangbo. In the S molecular form individuals, the mean positivity index of CSP from the northern sites was 4.77% varying from 0.31% in Malanville to 11.84% in Kouandé. There was no significant difference in sensitivity between the M and S forms for CSP *P. falciparum* ($P>0.05$).

Genotypes and “presumed phenotype” of *kdr* and *Ace-1* genes in the *A. gambiae* s.s. tested either positive or negative for the CS antigen of *P. falciparum*

Table 3 of the results show the relationship between the presence of *kdr* and *Ace-1* resistance genes and the positive-testing for the CS antigen of *P. falciparum* in *A. gambiae* s.s. The results in this table help to compare the genotypes and the presumed phenotypes (susceptible or resistant) for *kdr* and *Ace-1* mutations among *A. gambiae* s.s. individuals that tested positive or negative for the CSP antigen of *P. falciparum*. No association was found between the resistant (or sensitive) genotype and the

Table 3. Genotypes and presumed phenotypes ([R], [S]) of *kdr* and *Ace-1* mutations in the *A. gambiae* s.s tested positive and negative for the CS antigen of *P. falciparum*.

Locality	CSP	<i>kdr</i> mutation L1014F					P	<i>Ace-1</i> mutation G119S					P
		RR	RS	SS	[R]	[S]		RR	RS	SS	[R]	[S]	
Sèmè	(+)	8	1	0	8	1	0.87	0	0	9	0	9	0.67
	(-)	56	2	-	56	2		0	3	10	3	10	
Dangbo	(+)	17	0	-	17	0	0.93	0	0	7	0	7	0.93
	(-)	103	3	-	103	3		0	3	68	3	68	
Adjohoun	(+)	6	1	3	6	4	0.97	0	0	2	0	2	1
	(-)	115	64	10	115	74		0	0	8	0	8	
Adjarra	(+)	12	1	0	12	1	0.87	0	1	12	1	12	0.87
	(-)	136	2	-	136	2		0	4	23	4	23	
Missérété	(+)	3	1	-	3	1	0.74	0	0	4	0	4	1
	(-)	38	1	-	38	1		0	0	39	0	39	
Tori-Bossito	(+)	15	10	10	15	20	0.21	-	-	-	-	0	-
	(-)	259	84	64	259	148		-	-	-	-	0	
Bamè	(+)	26	3	0	26	0	0.25	-	-	-	-	0	-
	(-)	151	59	2	151	61		-	-	-	-	0	
Pehunco	(+)	2	1	0	2	1	0.57	0	2	0	2	0	-
	(-)	8	13	-	8	13		0	2	22	2	22	
Kouandé	(+)	3	1	-	3	1	0.76	0	0	4	0	4	1
	(-)	21	1	-	21	1		0	0	22	0	22	
Cobly	(+)	8	2	-	8	2	0.96	0	1	9	1	9	0.87
	(-)	7	2	-	7	2		0	0	9	0	9	
Boukoubé	(+)	0	2	-	0	2	-	0	0	2	0	2	1
	(-)	9	14	-	9	14		0	0	23	0	23	
Tanguiéta	(+)	3	0	-	3	0	0.86	0	0	3	0	3	1
	(-)	19	3	1	19	3		0	0	17	0	17	
Toukountouna	(+)	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0.69
	(-)	11	8	3	11	11		0	4	18	4	18	
Malanville	(+)	10	4	2	10	6	0.37	-	-	-	-	0	
	(-)	27	23	16	27	38		-	-	-	-	0	
Total	(+)	114	28	15	114	15	0.87	-	5	53	5		1
	(-)	960	279	96	960	96		-	16	237	16		

presumed phenotype of the vectors and their positive-tests to CSP ($P>0.05$).

With the *Ace-1* gene, there was no significant difference

between the resistant (or sensitive) genotype and the presumed phenotype of the vectors and their positive-tests to CSP ($P>0.05$).

DISCUSSION

The study of mosquitoes as vectors and the transmission process were an important preliminary not only to understand the epidemiology of malaria but also to implement an efficient and targeted control of these vectors (Omumbo et al., 2005).

The results of this research have shown that *kdr* gene (*Leu-Phe*) was found at a very high frequency (0.80 on average) in *A. gambiae* s.s. populations regardless of the forms (M or S). The development of the resistance to different insecticides used in public health, particularly, the class of pyrethroids, has been reported in Côte d'Ivoire (Elissa et al., 1993), Kenya (Vulule et al., 1999), Nigeria (Awolola et al., 2008), Cameroun (Etang et al., 2003) and Benin (Takken et al., 2003; Djènontin et al., 2009; Yadouleton et al., 2011) during the last decade. The *kdr* mutation plays a tremendous role in the development of *A. gambiae* resistance to dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) and pyrethroid insecticides in Africa as reported by numerous authors (Ranson et al., 2000; N'Guessan et al., 2010). The development of resistance mechanisms in malaria vectors is well reported (Enayati et al., 2003), but the factors leading to the selection of resistance remain unknown especially in rural areas where the production of cereals does not require the use of insecticides. However, it is obvious that the development of resistance is related to both the bio-ecology of mosquito vectors and the intensity of the selection pressure exerted by the use of insecticides in public health and agriculture. In our opinion, any pressure on a mosquito, be it a larvae or an adult, could trigger off a defensive reaction from the mosquito that could create a mechanism to control such a pressure in a far future.

The *kdr* mutation was initially detected in the cotton areas, first in the midst of populations including the S molecular form of *A. gambiae* s.s. before spreading in the M molecular form by introgression (Weill et al., 2000). The results obtained in Malanville, Northern Benin where *kdr* frequency was higher in S form than in M form, were consistent with this hypothesis even if the number of S form is low. This recalls the work of Djogbenou et al. (2010) and Djègbé et al. (2011) in Benin who showed the predominance of M form in Malanville, probably because of the abundance of rice fields irrigated by the Niger River. However, if this hypothesis is true, then the contrasting data showing the highest frequency of *kdr* gene in the M form in Adjohoun and Tori-Bossito in the south would still be unexplained. Presumably it could have occurred by a long term effect of adaptation to bioecological changes further to the appearance of *kdr* mutation in Southern Benin. Owing to the short period of its life cycle and the quickness of mosquito reproducibility, the transfer of *kdr* gene into the M form could have developed and spread very quickly (Yadouleton et al., 2010).

Besides the resistance to pyrethroids, a low resistance of *A. gambiae* s.s. to carbamates (*Ace-1*) was also noticed. A similar level of resistance was reported by Djogbénou et al. (2008b) and Yadouleton et al. (2010). This early onset of *Ace-1* gene is to be carefully considered with great interest since National Malaria Control Program in Benin has been using Bendiocarb for IRS during the past 5 years as part of its malaria control strategies. This situation remains a serious concern as the exertion of selection pressure could increase and spread the level of *Ace-1* gene later in the near future. Therefore, it appears urgent to set up an in country resistance monitoring framework where WHO bioassay kits could be performed. The baseline data would be initially collected and compared later on with those from areas treated with Bendiocarb to monitor the development of *Ace-1* gene and vectors susceptibility. This monitoring will greatly contribute a better management of insecticide resistance in malaria vectors and a correct choice of products for an effective malaria transmission control.

Our research showed that *A. gambiae* s.s. is the main malaria vector in Benin with a positivity index in CS of *P. falciparum* of 11.84 varying from one locality to another.

In a recent field study (Gnanguênon et al., 2013), it was shown that the *kdr* gene enables *A. gambiae* populations carrying this mutation to pass through the holes of treated nets. Similarly, it is probable that the *A. gambiae* s.s. carrying *kdr* mutation are more likely to transmit malaria since they are resistant to insecticides and live longer than susceptible mosquitoes which do not carry the mutation (Rivero et al., 2010). It is important to mention that susceptible mosquitoes are theoretically considered more vulnerable whenever in contact with external aggressions (LLINs, IRS). Yet, the ELISA-CSP tests performed on parous females carrying the *kdr* mutation and the ones not carrying it showed the same level of *P. falciparum* infection. This result is in agreement with the report by Koffi et al. (2002) in Côte d'Ivoire. These results corroborate also with those of Vézilier et al. (2010) who showed in specific experimental conditions that esterase and acetylcholinesterase-based insecticide resistance did not have a clear effect on the infection rate of *Plasmodium relictum* or oocyst burden in *Culex pipiens* mosquitoes. Moreover, recent works showed that insecticide resistance levels in wild *Culex quinquefasciatus* mosquitoes are negatively correlated with the density of the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*, and the parasite development is blocked at the L1 stage in laboratory mosquitoes selected for artificially high levels of insecticide resistance (McCarroll and Hemingway, 2002; Curtis, 2001).

Conclusion

Malaria is transmitted by two molecular forms of *A. gambiae* s.s. populations in Benin where the M form is

mostly located in southern forest and humid savanna areas and the S form in the northern dried savanna areas. The two forms are resistant to insecticides especially DDT and pyrethroids. The main resistance mechanism identified in both forms is the *kdr* mutation with a high frequency recorded in the S form as well as the M form conversely to reports from Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Mali and other countries of the region.

The hypothesis stating that *A. gambiae* s.s. populations carrying *kdr* mutation are more likely to transmit malaria, was not verified in the present study. Therefore, there was no significant difference in positive-testing for CSP of *P. falciparum* in the *A. gambiae* with RR, RS and SS genotypes ($P>0.05$). Our findings showed that there is no association between the presence of *kdr* gene and *P. falciparum* infectivity. In addition, the M and S molecular forms have the same sensitivity towards the malaria parasite.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the President's Malaria Initiative of the US government for funding this study.

REFERENCES

- Ahoua Alou LP, Koffi AA, Adja MA, Tia E, Kouassis PK, Kone M, Chandre F (2010). Distribution of ace-1R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cote d'Ivoire. *Malar. J.* 9:167.
- Akogbéto M (2001). Etude entomologique sur la transmission du paludisme côtier Lagunaire au Bénin. *Trop. Med. Heal.* 6:845-847.
- Akogbéto M, Yakoubou S (1999). Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyréthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 92:123-130.
- Asidi A, N'Guessan R, Akogbéto M, Curtis C, Rowland M (2012). Loss of Household Protection from Use of Insecticide-Treated Nets against Pyrethroid-Resistant Mosquitoes, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1101-1106.
- Awolola TS, Oduola OA, Strode C, Koekemoer LL (2008). Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. from Nigeria. *Trop. Med. Hyg.* 103:1139-1145.
- Bar-Zeev M, Self LS (1966). A note on the use of window traps as a tool for evaluating insecticides. *Mosq. News* 26:205-7.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbéto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P (1999a). Situation de la résistance aux pyréthrinoides chez *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull. WHO* 77:230-234.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P, Guillet P (1999a). Current distribution of pyrethroid resistance gene (*Kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation for the Mopti form. *Parassitologia* 41:319-322.
- Coluzzi M (1964). Morphological divergences in the *Anopheles gambiae* complex. *Malar. J.* 25:197-232.
- Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbéto M, Hougard J, Guillet P (2004). Dosage-dependent effects of permethrin treated net on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar. J.* 3:22-30.
- Curtis CF (2001). Insecticide resistance and mosquito-borne disease. *Lancet* 357:656-656.
- Dabire KR, Diabate A, Djogbenou L, Ouari A, N'guessan R, Ouedraogo JB, Hougard JM, Chandre F, Baldet T (2008). Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar. J.* 7:188.
- Diabaté A, Baldet T, Ido K, Dabiré R, Guiguemba T (2001). Sensibilité aux pyréthrinoides d'*An. gambiae* s.l. dans les hydro-aménagements au Burkina Faso: Implications opérationnelles dans la lutte contre le paludisme. *Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR*.
- Djègbè I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, Akogbéto M, Corbel V (2011). 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.* 10:261.
- Djènonatin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudénoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F (2010a). Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vector in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): a pre-intervention study. *Parasit. Vectors* 3:83-84.
- Djènonatin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Penneretier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F (2009). Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate- treated plastic wall sheeting and pyrethrinoid-treated bed nets. *Malar. J.* 8:233-236.
- Djènonatin A, Chandre F, Chabi J, N'Guessan R, Baldet T, Akogbéto M, Corbel V (2010b). The indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethrinoid-resistant malaria vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83:266-270.
- Djogbenou L, Chandre F, Berthomieu A, Dabire R, Koffi A, Alout H, Weill M (2008a). Evidence of introgression of the ace-1(R) mutation and of the Ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS. One* 3:e2172.
- Djogbenou L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbéto M, Hougard JM, Chandre F (2008b). 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.* 78:298-302.
- Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbéto M (2010). Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Trop.* 114:116-122.
- Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K (1993). Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* 73:291-294.
- Enayati A, Vatandoost H, Ladonni H, Townson H, Hemingway J (2003). Molecular evidence for a *kdr*-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Entomol.* 17:138-144.
- Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D (2003). Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J. Med. Entomol.* 40:491-497.
- Fanello C, Della Torre A (2001). Distribution du gène *kdr* dans les formes chromosomiques et moléculaires des *Anopheles gambiae* s.s. en Afrique Occidentale. *Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR*.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect. Mol. Bio.* 10:19-23.
- Gentilini M (1991). Généralités sur le paludisme. Paris 2: Ellipses/Aupelf.
- Gnangnon V, Aikpon R, Gbédjissi G, Azondekon R, Oké-Agbo F, Sovi A, Ossè R, Padonou G, Akogbéto MC (2013). Effect of holes on long lasting insecticide-treated nets (PermaNet and Olyset) on main vector contact. *Parasit. Vectors*. (In press).
- Henry M, Diallo F, Bordes J, Ka S, Pradines B, Diatta B (2006). Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:146-151.
- Hunt RH, Coetzee M, Fettene M (1998). The *Anopheles gambiae* complex: A new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92:231-235.
- Koffi AA, Tia E, Carnevale P, Chandre F (2002). Rapport final Projet

- MIM1-Equipe de Côte d'Ivoire: Bouaké.
- Louise A, Kelly-Hope L, Ellis McKenzie F (2009). The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar. J.* 8:19-20.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Berge J, Devonshire A, Guillet P, Pasteur N, Pauron D (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*Kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect. Mol. Biol.* 7:179-184.
- McCarroll L, Hemingway J (2002). Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32:1345-1351.
- Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. (Eds) John Libbey Eutotext 428.
- N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Chabi J, Akogbéto M, Rowland M (2010). Control of Pyrethroid and DDT-resistant *Anopheles gambiae* by Application of Indoor Residual Spraying or Mosquito Nets Treated with a Long-lasting Organophosphate Insecticide, Chlorpyrifos-methyl. *Malar. J.* 9:44.
- N'Guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M (2007). Reduced efficacy of insecticides-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethrinoid resistance area, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* 13:199-206.
- OMS (2006). Lutte antivectorielle et protection individuelle. Suisse : Genève.
- Omumbo JA, Guerra CA, Hay SI, Snow RW (2005). The influence of urbanization on measures of *P. falciparum* infection prevalence in East Africa. *Acta. Trop.* 93:11-21.
- Programme National de Lutte contre le Paludisme (2007). Plan stratégique de lutte contre le paludisme au Bénin 2006-2010. Benin: Cotonou.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Xang X, Hemingway J, Collins FH (2000). Identification of a novel mutation in the sodium voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* associated with resistance to pyrethroids insecticides. *Insect. Mol. Biol.* 9:491-497.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S (2010). Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog.* 6(8), pii:e1001000.
- Takken W, Scott TW, Bogers RJ (2003). Ecological Aspects for Application of Genetically Modified Mosquitoes. Springer 244.
- Vézilier J, Nicot A, Gandon S, Rivero A (2010). Insecticide resistance and malaria transmission: infection rate and oocyst burden in *Culex pipiens* mosquitoes infected with *Plasmodium relictum*. *Malar. J.* 9:379.
- Vulule J, Beach R, Atieli F, McAllister J, Brogdon W, Roberts J, Mwangi R, Hawley W (1999). Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med. Vet. Entomol.* 13:239-44.
- Weill M, Chandre F, Bengues C, Manguin S, Akogbeton M, Pasteur N, Guillet P, Reymond (2000). The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect. Mol. Biol.* 9:451-452.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M (2003). Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nat.* 423(6936): 136-137.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect. Mol. Biol.* 13:1-7.
- WHO (2009). World Malaria Report 2009. World Health Organization, Geneva.
- WHO (2011). World Malaria Report 2011. Geneva, Switzerland: World Health Organization. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed 21.05.2012)
- Wirtz R, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell G, Burkot T, Schneider I, Esser K, Beaudoin R, Andre R (1987). Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull. WHO* 65:39-45.
- Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, Dabiré R, Aikpon R, Akogbéto MC (2011). Cotton pest management strategies on the selection of pyrethrinoid resistance in *Anopheles gambiae* populations in Northern Benin. *Parasit. Vectors* 3:145-148.
- Yadouleton A, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbéto M (2010). Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar. J.* 9:83-88.



Characterization of mosquito fauna in the sanitary district Ouidah-Kpomasse-Tori Bossito in Benin

Sahabi Bio-Bangana^{1,2*}, Christophe Houssou³, Razaki Ossé¹, Patrick Edorh², Luc Djogbénou¹, Claude C.A. Ahouangninou¹, Michel Boko^{2,3}, Martin Akogbéto¹

¹*Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou Rép. du Bénin. Téléphone (229) 21330825*

²*Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable. 03 BP 1463 Jéricho-03 Rép. du Bénin. Téléphone (229) 97 08 11 06 Télécopie (229) 21305550*

³*Laboratoire Pierre PAGNEY "Climat, Eau, Ecosystème et Développement" (Laceede) 03 BP 1122 Jéricho Cotonou Rép. du Bénin*

Received: 29 March 2012

Revised: 16 May 2012

Accepted: 17 May 2012

Key words: Culicidienne fauna, specific richness, abundance, diversity and equal distribution.

Abstract

The characterization of culicid fauna in 28 villages of the health district Ouidah Kpomassè and Tori-Bossito was carried out during five months (October and December 2007, January, March and May 2008). Adults mosquitoes were collected by human landing caught from 22:00 PM to 06:00 AM. 44693 adult mosquitoes were caught. 29 species were identified in the 28 hamlets by taxonomic studies. The specific richness varies between 8 species (Agokon) and 19 species (Agadon), while abundance vary between 688 individuals (Hèkandji) and 4577 individuals (Kindjitokpa). Five species are common on the whole of the 28 sites: *Aedes aegypti*, *Culex annulioris*, *Culex gr. decens*, *Culex quinquefasciatus* and *Mansonia africana*. The maximal index of equitability was 0, 47 in Dokanmey showing a large spatial heterogeneity in the 28 localities. The differences noted between the 28 communities would be related to differences in the biotic and abiotic conditions in the area.

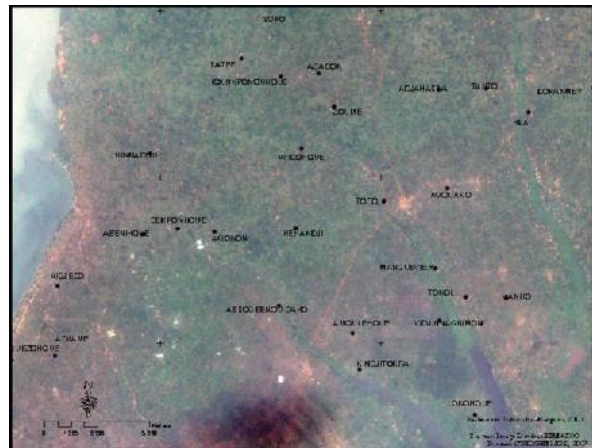
*Corresponding Author: Sahabi Bio-Bangana ✉ biobanganaa@yahoo.fr

Studies from Hamon and *et al.*, (1954) as well as the exhaustive revision of the African species by Gilles & De Meillon (1968) and Gilles & Coetzee, (1987) remain until now the relevant base of documentation on taxonomy, the biology and the distribution of Culicidae in Africa. (Diagne, 1994).

Anopheles gambiae is the disease vector frequently studied in Africa. However, knowing the biogeography of these mosquitoes can provide us useful information for better understanding of their diversities, interactions etc.). Furthermore on their viability or not of their settlements (individual number and genetic diversities); their evolution (progression, regression).

climatic and ecological conditions are favourable to the proliferation of these mosquitoes.

Rural character of this area in addition to the abundance of many dregs, made of this medium a framework favourable to the development of Anophelinae, Culicinae and Aedinae. In addition, the aspect of the dwellings and the worship lifestyle of the population could support the development of the mosquitoes.



Many entomological studies were carried out these last years by the Entomological Research centre of Cotonou, for the majority in little before prospected areas or not, in particular the area of Grand Popo, Malanville and Ketonou, within the framework of epidemiological studies on malaria and the filarioses (Djènontin, 2009). Within the framework of the Research project in Entomology, Formation and Strategies of preventions (REFS), entomological and epidemiologic studies were led in 28 hamlets of the health district Ouidah- Kpomassè- Tori Bossito from October to December 2007 and January to May 2008.

Within the framework of this project, it is question of using the indices of diversity, abundance and the equal distribution with other parameters to gather the 28 hamlets in 4 categories of 07 hamlets. Each category will receive a specific intervention to create anthropic disturbances being able to lead to the fall of specific

diversity and the abundance of the mosquitoes with an ultimate aim of carrying out interventions targeted against the vectorial diseases.

Materials and methods

Site of study

The present study was done from October 2007 to May 2008 in the district of Ouidah-Kpomassè and Tori Bossito (3°87' N and 11°52' E), located at the south-west of Benin (Map 1). This area is largely cleared and the original Equatorial forest does not exist anymore but in small islands of negligible extension. Currently, the vegetation is characterized by a shrubby bush, associated with more or less dense settlements of palm trees with oil, which one finds on the plates either in a natural state, or in industrial plantations (District of Gakpé). However, one can distinguish a certain number of quite distinct vegetable formations: coconuts; a bush pre-littoral consisted of tufts of rhizophora on the current cord which finishes with the coastal lagoon; the marshy savanna more or less formed of loudetia and various cyperaceous in the low area; the shrubby thicket with prevalence of *Eleasis guineensis*; classified plantations and forests. Apart from the hydromorphe grounds located in bottoms marshy dregs, the health district of Ouidah-Kpomassè and Tori Bossito is dominated by the ferralitics grounds. The hydrographic network is dense, made of many marshy dregs and river among which the Toho lake, the Couffo river which is thrown in the Aheme lake. The health district of Ouidah-Kpomassè and Tori Bossito belongs to the subequatorial field and its climate of the subequatorial type, shows two seasons of rains (September-November and March-June) which alternate with two dry seasons (February-December and July-August). This climate is characterized by the abundance of the rains (1200 mm/year); such precipitations are very favourable to the existence of mosquitoes. They indeed represent the independent factor of immersion of the breeding sites with mosquitoes and they are mainly responsible for the main part of the surfaces of hatching (Kermogant,

1906). An annual average temperature contrasted between 27 and 31°C according to the seasons and annual thermal amplitude of 3, 5°C.

Sampling of the hamlets.

The hamlets of intervention were selected from March to June 2007, following a census of 850 hamlets covering the whole area of Ouidah-Kpomassè and Tori Bossito. These hamlets were selected according to well defined criteria (hamlet not having health centre, population considered ranging between 350 at 400 inhabitants, variation of at least 2 km between two hamlets, grouped dwellings and geographically accessible).

Larval prospection

Every 6 weeks, a larval prospection campaign was organized in a radius of 500 meters of each of the 28 hamlets of studies. The larval density of each breeding sites was measured using Bruce-Chwatt (1985) method.

Capture and Identification of anthropophiles mosquitoes

Research method consists in mosquito capturing during the months of October 2007, December 2007 and January 2008 on voluntary individuals using Human Landing Catch (HLC). Adults mosquitoes were collected during 2 nights consecutive in each of the 28 selected hamlets. The collection of the mosquitoes was made by waked up volunteers placed outside and inside 4 dwellings chosen by hamlet from 22:00 to 6:00 of following day (Djènonin and Al, 2010). The captured mosquitoes were identified by using the taxonomic key of determination of Gilles & De Meillon (1968) and Gilles & Coetzee (1987).

Data analysis

The simplest index to measure the biodiversity is the number S of categories decreases by 01 so that a collection including/understanding only one category

has a null biodiversity. This index is written: $Hr = S - 1$ and is called richness (Pavoine, 2005).

The relative abundance $P_k = \frac{nk}{N}$ or $(nk =$ effectif of the species of row k, $N =$ total effectif) of each species as defined by Barbault (1992) was calculated; The index of diversity of Gini Simpson:

$$H_{G-S}(p) = 1 - \sum_{k=1}^S p_k^2.$$

allowed us to express the diversity (Simpson, 1949).

The equitability $Es = Is - \frac{1}{(S-1)}$ enabled us to

define the equal distribution of effectives between the present species. Just like the index of diversity of Gini Simpson, Es lies between 0 and 1 (Barbault, 1992). Software PASW version 18.0 enabled us to test with the test of correlation of Pearson the relations between precipitations and the number of adults of mosquitoes on one hand and the relations between the number of adults and the number of larval breeding sites on the other hand.

Results

Specific richness of culicidienne in the health district of Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito

From October 2007 to May 2008, we recorded 29 species of Culicidae in the 28 hamlets (Table 1). All species belong to two sub families (Culicinae and Anophelinae) and to seven genus (Aedes, Anopheles, Coquillettia, Culex, Ercmapodites, Mansonia and Uranotenia). The sub family of Culicinae (22 species) is approximately three times richer in species than that of Anophelinae (7 species). The Culex genus is richer in species (11 species) than the Anopheles genus (7 species); Aedes (6 species); Mansonia (2 species); Coquillettia (1 specie); Ercmapodites (1 specie) and Uranotenia (1 specie) (Table 1). From these species of mosquitoes, 05 (belonging to the subfamily of Culicinae) were captured in all 28 hamlets. It is about:

Aedes aegypti, *Culex annulioris*, *Culex gr. decens*, *Culex quinquefasciatus* and *Mansonia africana*.

Evolution of the specific richness according to the biotope

The specific richness or number of species varies from one village to another. The strongest specific richness was recorded in Agadon (19 species) follow-up of: Hla (18 species); Adjahassa and Soko (17 species) follow-up of Manguévier (16 species); Satré and Wanho (15 species); Agouako, Ayidohoué, Kindjitokpa, Guézohoué, Hounkponouhoué and Tanto (14 species); Adjamè and Dokanmey (13 species); Zoumè, Assogbénou Daho, Hélandji and Hinmadou (12 species); Aidjèdo, Amouléhoué, Abénihoué, Dékponhoué, Lokohoué and Tokoli (11 species). The lowest specific richness were observed in Tokoli Vidjinnagnimon (10 species); Agokon and Todo (8 species). This variation of the richness in the 28 hamlets would be related to the diversity of the larval breeding sites in the area.

Relative abundance of culicidienne fauna in the health district of Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito

During the study, 44693 mosquitoes were captured. The Culex and the mansonia represent the abundant genus (49. 29% of Culex and 44. 87% of mansonia of the whole of the captured mosquitoes), Aedes and Anopheles are minority (3. 25% for Aedes and 2. 55% for Anopheles). The genus Coquillettia (0. 01%), Ercmapodites (0. 01%) and Uranotenia (0. 00%) are the genus the least met in the area. The relative abundance of culicidienne fauna by species arise as follows: *Ae. aegypti* Linné (1.58%), *Aedes gr. Palpalis* (0.09%), *Aedes gr. Tarsalis* (0.02%), *Aedes luteocephalus* (0.14%), *Aedes sp* (0.09%), *Aedes vittatus* (1.33%), *Anopheles brohierii* (0.002%), *Anopheles coustani* (0.02%), *Anopheles funestus* Gilles (1.30%), *Anopheles gambiae* Gilles (0.72%), *Anopheles nili* Théobald (0.004%), *Anopheles pharoensis* (0.44%), *Anopheles ziemannii* Gruenberg (0.07%), *Culex annulioris* (1.37%), *Culex gr. decens* (29.91%),

Culex nebulosis (6.22%), *Culex quinquefasciatus* (9.81%), *Culex tigripes* Charmoy (0.12%), *Cx sp* (0.06%), *Cx thalassius* (0.06%), *Culex duttoni* Théobald (0.12%), *Culex poicilipes* Théobald (0.04%), *Culex perfuscus* Edwards (0.004%), *Culex fatigans* (1.58%), *Eremapodites gr. Quinquevittatus* (0.01%), *Mansonia africana* (44.84%), *Mansonia uniformis*

(0.02%), *Coquilletidia aurites* (0.01%) and *Uranotenia gr. billinéata* (0.002%).

Evolution of the relative abundance of culicidienne fauna according to the biotope

Table 1. Distribution of mosquitoes abundance, Specific richness, Simpson Indice of diversity and Equal distribution Indice in the health district Ouidah Kpomassè and Tori Bossito from October 2007 to May 2008.

Hamlet	Abundance	Relative abundance	Specific richness	Simpson Indice of diversity	Equal distribution Indice
ADJAME	2446	5.5%	13	0.44	0.36
AGOUAKO	471	1.1%	14	0.53	0.45
AIDJEDO	1471	3.3%	11	0.52	0.42
AMOULEHOUE	3059	6.8%	11	0.53	0.43
ASSOGBENOU	1675	3.7%	12	0.52	0.42
AYIDOHOUÉ	813	1.8%	14	0.47	0.39
ADJAHASSA	1286	2.9%	17	0.49	0.43
DOKANMEY	786	1.8%	13	0.56	0.47
KINDJITOKPA	4577	10.2%	14	0.35	0.28
VIDJINNAGNIMON	2320	5.2%	10	0.55	0.44
GUEZOHOUÉ	1718	3.8%	14	0.38	0.30
HEKANDJI	688	1.5%	12	0.35	0.26
HINMADOU	3282	7.3%	12	0.33	0.24
HLA	2290	5.1%	18	0.24	0.18
AGOKON	795	1.8%	8	0.48	0.33
HOUNKPOUNHOUÉ	1006	2.3%	14	0.35	0.27
ABENIHOUE	3015	6.7%	11	0.32	0.22
DEKPONHOUÉ	1550	3.5%	11	0.39	0.29
MANGUEVIER	2315	5.2%	16	0.21	0.14
SATRE	882	2.0%	15	0.38	0.31
SOKO	1329	3.0%	17	0.39	0.32
TANTO	975	2.2%	14	0.56	0.48
LOKOHOUÉ	2456	5.5%	11	0.46	0.36
TODO	325	0.7%	8	0.51	0.37
TOKOLI	658	1.5%	11	0.46	0.36
WANHO	890	2.0%	15	0.46	0.39
AGADON	1376	3.1%	19	0.46	0.40
ZOUME	239	0.5%	12	0.35	0.26
	44693	100.0%	29		

Relative abundance vary from one hamlet to another. The higher abundance was recorded in Kindjitokpa (10. 2%) while the lowest one was noted in Zoumè (0. 5%). Table 1 in appendix indicates the distribution of this relative abundance in the other hamlets.

Evolution of diversity according to the biotope

It can be interpreted as the probability that two drawn individuals randomly in the sample be different

species. It is included/understood in the interval [0; 1]. Its value decreases with the regularity of the distribution. $H_{G-S}=0$ if only one species has a frequency of 1, $H_{G-S}=1-1/k$ if k present species have the same $P_k=1/k$ frequency. 01 Value is reached for a number k infinite of species, of null frequencies. For an identical regularity, the index of diversity of Gini-Simpson increases with the number of species, Simpson, (1949). Index of Simpson calculated starting from the data

recorded on each locality (H_g -s ranging between 0.21 and 0.56) show that diversity in this area is very variable; the distribution of the index of diversity of Gini-Simpson per hamlet is consigned in Table 1.

Evolution of the equal distribution according to the biotope

The informations obtained with the richness and the indices of diversity are supplemented by the variations of the equal distribution of taxon within the hamlets. The values of equitability and the difference in equitability also make it possible to apprehend seasonal dynamics (Bernez, 2000). The equitability (E_s) lies between 0 (only one species at a frequency of 1) and 1 (all the species have the same frequency). An expression of the equitability is often given starting from the index of diversity of Gini-Simpson ($E_s = 1/S-1$) (Pavoine, 2005). The settlement of the mosquitoes of the 28 prospected sites appears heterogeneous in comparison with the value of the indices of equitability which exceeded 0.47 forever (in Dokanmey). Nevertheless, heterogeneity is more remarkable in Manguévier ($E_s = 0.14$). The distribution of the index of equitability per hamlet is consigned in Table 1.

Table 2. Temporal variation of culicidienne abundance according to rain and the larval breeding sites in the health district Ouidah, Kpomassè and Tori Bossito.

Month	Abundance culicidienne	Rain	Number of Breeding sites
October_2007	18145	125.7	465
December_2007	9133	14.2	309
January_2008	2048	9.9	310
March_2008	2920	80.3	250
May_2008	13230	165.8	530

Relation between precipitation and abundance of the mosquitoes

The test of correlation of Pearson shows that the monthly variations of the adults of Culicidae are strongly correlated with pluviometry in all the 28

hamlets ($r = 0.45$). The Fig. 1 and Table. 2 indicates that the abundance of the culicidae decreases systematically from October to January. It is weak between January and December. It increases in March (a few weeks after the first rains of the year), to reach a second peak in May.

Linear relation between larval breeding sites and abundance of the mosquitoes

The test of correlation of Pearson shows that the monthly variations of the adults of Culicidae are strongly correlated with the frequency of the larval breeding site in all 28 hamlets ($r = 0.68$). Indeed, Fig. 2 and table. 2 indicates that the abundance of the culicidae decreases systematically from October 2007 to January 2008. It is weak between January and December. It increases in March (a few weeks after the filling of the larval breeding sites by the first rains of the year), to reach a second peak in May.

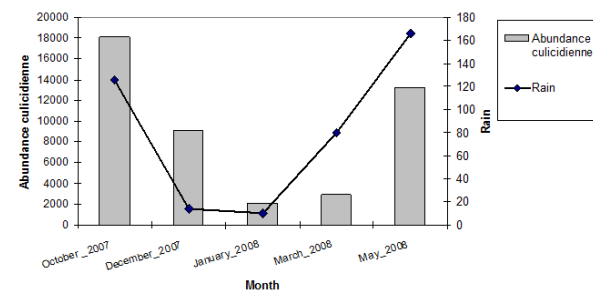


Fig. 1. Temporal variation of culicidienne abundance according to rain.

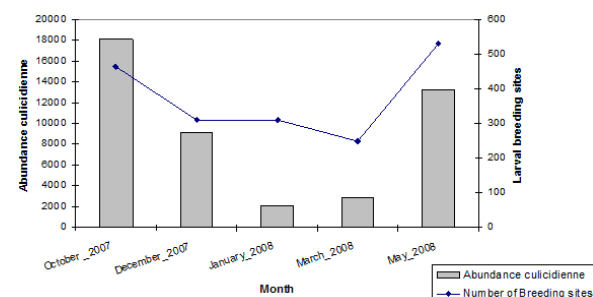


Fig. 2. Temporal variation of culicidienne abundance according to larval breeding sites.

Discussion

The study shows that the mosquito fauna in the 28 hamlets is rich and is diversified. These results

corroborate those of Djènontin et al, (2010) which working in the same site had obtained *Culex gr. decens*, *Mansonia africana*, likes the most abundant species. The weak correlation (0.45) between pluviometry and abundance culicidienne explains a weak link between these two parameters. This correlation does not explain it only the determinants of abundance, since the test of Fisher of the linear model gives a probability of 0.213. Pluviometry explains only 45% of the variation of abundance culicidienne. The strong correlation ($r = 0.68$) between the abundance culicidienne and larval breeding sites explains a strong link between these two parameters. The larval breeding sites explain 68% of abundance culicidienne. The larval breeding sites and pluviometry do not explain alone abundance culicidienne in the area of Ouidah Kpomassè and Tori Bossito. The high abundance of the culicidae in this area would be as related to the favourable conditions as offered the anthropic activities (production of alcohol, water provision in the marshes, instrument of conservation of water not closed) and natural (proliferation of the marshes, depth of the ground water).

The strong specific richness observed in the hamlets of Hla, Adjahassa, Agadon and Soko (between 16 and 19 species) would be related on the depth of the ground water on one hand and the traditional manufacture of alcohol on the other hand. Indeed in this area, the ground water is very deep (65 meters of altitude in Agadon). This situation obliges the populations to preserve water in the barrels, the earthenware jars, basins... etc. To this comes to be added the artisanal manufacture of alcohol which accentuates the requirement of water and thus the stressing of the instruments of conservation of water in these localities and it costs the proliferation of various species of mosquitoes. These results corroborate those of Tsila, 2003 and Patrick, 2010 who working on a lake in Cameroon had noticed that the specific richness and the high abundance of the mosquitoes could be related to the favourable conditions which offered the

anthropic activities (the exploitation of sand on the edges of the domestic Nkolbisson Lake and the excessive deposit of refuse by the bordering populations create favourable conditions with the development of many species of mosquitoes).

A comparative study of the recorded data shows the significant differences in indices of diversity from one site to another. Several biotic and abiotic factors would explain the strong density of mosquitoes observed during the rainy season ($n = 18145$ in October and $n = 13230$ in May) compared to the dry season ($n = 9133$ in December; $n = 2048$ in January and $n = 2920$ in March). Indeed, during May and October, the repeated rains contribute to maintain a ground gorged with water. Such a ground is very favourable to the production of the larval breeding sites, since without hydrous contribution, the mosquitoes cannot develop. This situation added to the argillaceous texture of the ground of this medical area would limit the infiltration of rainwater by places, and maintains for a good period of the rainy season the temporary breeding sites of mosquitoes. Let us also underline that during this period; the sunning is moderated, which would limit the evaporation of water and the evapotranspiration by the plants. After emergence of the larvae and because of the shade of bulky vegetation, the young mosquitoes exophiles do not find any difficulty to colonize their places of rest. These factors are very favourable to the nesting and the proliferation of the mosquitoes in rainy season in opposition to the dry season.

The weak proliferation of the mosquitoes of the *Aedes* genus ($n = 3.25\%$) in a medium however favourable to their development (existence of many larval breeding sites consisted earthenware jars) was confirmed by other researchers. Indeed our results are similar to those of Karch obtained on culicidienne fauna and its harmful effect in Kinshasa in 1990. This situation would be explained by the fact that the captures started as from 10 p.m., hour in which the *Aedes* do not bite any more, their activities being diurnal. (Karch, 1990).

In the same time, the weak proliferation of the anopheles mosquitoes (n=2.55%) would be related to the fact that our research tasks on the capture of the mosquitoes started from October, at which time the temporary and semi permanent breeding sites of these dipterous rarefy.

The *Culex* and *Mansonia* represent the genus the most present in the health district Ouidah- Kpomassè- Tori Bossito. They pose an enormous problem of harmful effect in particular in the majority of the localities. This strong proliferation would be related to the natural factors and anthropic (retaining tanks of rainwater, water resulting from the drainage for the gardening but also to the many hollows and marsh) which maintain a permanent humidity in certain localities of this health district (Bio-Bangana, 2012).

The entomological study undertaken in the health district Ouidah Kpomassè and Tori Bossito in October and December 2007 then in January, March and May 2008 permitted to know specific diversity, the abundance and the equal distribution of the anthropophiles mosquitoes in this area of Benin. These various indices enabled us to obtain several ecological information on the viability or not of the settlements, their distribution. The fight against the mosquitoes in the health district Ouidah Kpomassè and Tori Bossito requires the taking into account of all these elements for the regrouping of the 28 hamlets in 04 groups of 07 hamlets. Anthropic disturbances or unusual factors (various strategies) in the various groups of hamlets will make it possible to make decrease the diversity and the abundance of the mosquitoes in the area. Taking into account all these geographical, cultural and entomological data about culicidian fauna in Tori-Bossito area is important to implement integrated fight method against disease vectors.

Acknowledgments

This work was completed within the framework of component 2 of mobilizing project FSP "Research in

Entomology, Formation and Strategy of prevention: the case of malaria and THA (REFS)". I am grateful to CREC's and IRD's staff for technical assistance.

References

Barbault R. 1992. Ecologie des peuplements (Structure, dynamique et évolution). Masson Eds 272.

Bernez I, Daniel H, Haury J. 2000. Etude des variations des communautés végétales aquatiques sous l'effet de perturbations anthropiques en rivière régulée. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 357/358. 169-189.

Bio-Bangana S, Boko M, Edorh P, Djogbénou L, Ahouangninou CA, Boussari O, Houssou C, Akogbéto M. 2012. Impact of water provision from the marshes on the culicidae proliferation in Tori Bossito, Benin Republic. *Continental J. Sustainable Development* 3, 39 – 46.

Bruce-Chwatt LJ, Zulueta JD. 1985. Essential Malariology: W. Heinemann med. Books Ltd, London 8, 166-209.

Diagne N, Fonteinille D, Konaté L, Faye O, Lamizana MT and al. 1994. Les anophèles du Sénégal, Liste commentée et illustrée, *Bull Soc Path Ex* 267-277.

Djènantin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudénoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F. 2010. *Culicidae* diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasites & Vectors* 3:83 doi:10.1186/1756-3305-3-83

Djènantin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbéto M and Chandre F. 2009. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-

treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets: *Malaria Journal*, **8**:233 doi: 10.1186/1475-2875-8-233.

Gilles M, Coetzee M. 1987. A supplement to Anophelinae of Africa South of the Sahara. South African Institute of Medical Research 135-141.

Gilles M, De Meillon B. 1968. The Anophelinae of Africa south of the Sahara, 2nd ed. South African Institute of Medical Research 131-135.

Hamon J, Chauvet G, Mouchet J. 1963. Quelques aspects de l'écologie des vecteurs du paludisme humain en Afrique, Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Entomologie Médicale et Parasitologie **1**, 5-12.

Karch S, Asidi N, Manzambi Z, Salaun JJ. 1992. La faune anophélienne et le paludisme humain à Kinshasa, Zaïre. Bull. Soc. Path. Ex. **85**, 304-309.

Kermorgant A. 1906. Prophylaxie du paludisme, Annales d'hygiène et de médecine coloniale, Ed Paris 31.

Kindé GD. 2011. Stratégie de mise en oeuvre de la gratuité de la prise en charge des cas de paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans, MS 01-52.

Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde: Paris, p. 428 .

Patrick AN, Eric MB, Philippe B, Sévilor K, Gisèle F, Jean M. 2010. Abondance et diversité de la faune culicidienne à Yaoundé, Cameroun, Entomologie faunistique – Faunistic Entomology **62**, 115-124.

O.M.S. 2006. Prévenir les maladies par des environnements salubres - vers une évaluation de la charge des maladies environnementales: Genève, OMS.

Pavoine S. 2005. Méthodes statistiques pour la Mesure de la biodiversité. Thèse Université Claude Bernard-Lyon I. p. 391.

Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. Nature 163-688.

Tsila H. 2003. Anopheles funestus Gilles 1900: Biologie Ecologie et productivité des larves dans un lac permanent de Nkolbisson (Yaoundé). Mémoire, Diplôme d'Etudes Approfondies, p. 61.

RESEARCH

Open Access

Decreased proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae* s.l. populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa)

Gil Germain Padonou^{1,2*}, Ghelus Gbedjissi², Anges Yadouleton², Roseric Azondekon², Ossé Razack^{1,2}, Olivier Oussou², Virgile Gnanguenon², Aikpon Rock^{1,2}, Michel Sezonlin¹ and Martin Akogbeto^{1,2}

Abstract

Background: In many parts of Africa as in Benin, the main strategies of vector control are based on the scaling-up of Long Lasting Insecticide Treated Nets (LLITNs) and indoor residual spraying (IRS). The need to understand the biological implications of IRS in large scale and full coverage of LLITNs is paramount. It is in this context that the present study was conducted. It aims to evaluate the effect of a large scale IRS using a non-pyrethroid insecticide and full coverage of deltamethrin treated nets on the behavior of *An. gambiae* s.l. in the intervention areas compared to untreated areas used as controls.

Methods: Mosquitoes were collected using human landing catches, pyrethrum spray catches and window exit traps to assess reduction of entry rate, endophily rate, endophagy rate and overall mortality rate in natural populations of *An. gambiae* s.l. before IRS and LLITNs intervention (2007) and after in 2008 and 2010.

Results: In the IRS arm, endophily rate was 67.13% before intervention and 4.5% after intervention, whereas in the control arm it was stable at 51.67% ($P > 0.05$). In the LLITN arm endophily rates also decreased after intervention. After the IRS, no gravid mosquitoes were collected from all treated localities, but LLITN performance was not that spectacular. The proportion of mosquitoes biting indoors in the IRS arm decreased from 67.09% before intervention to 42.85% after intervention, compared to a low but significant decrease (71.31% to 57.46%) in the LLITN arm. The use of vector control tools and behavior of the host would be the main factors that modify the behavior of taking a human blood meal observed on *An. gambiae* s.l. inside human dwellings.

Conclusion: The impact on the behavior of *An. gambiae* s.l. observed with the bendiocarb used in IRS was highly effective compared with the free distribution of LLITNs in terms of mortality and the decrease of proportions of indoor feeding. Despite this efficacy, there is a need for complementary tools and research of alternative strategy oriented on effective health education, and the use of powerful tools such as IRS, LLITNs, larviciding and repellents.

Keywords: IRS, LLITNs, Bendiocarb, Deltamethrin, Behavior, *Anopheles gambiae*, Benin

* Correspondence: pagergil@yahoo.fr

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

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

Background

Malaria remains the most important parasitic disease in Benin causing significant mortality and morbidity despite concerted efforts to control it. In many parts of Africa, the main strategies of vector control are based on the scaling-up of Long Lasting Insecticide Treated Nets (LLITNs) and indoor residual spraying (IRS) [1,2]. Many studies have shown the efficacy of indoor residual IRS and LLITNs in reducing malaria transmission and prevalence [3]. However, these methods, especially ITNs, rely on the use of pyrethroid insecticides. Unfortunately the recent evolution and spread of pyrethroid resistance in West Africa in the Mopti (M) molecular form of *Anopheles gambiae* s.s is a major concern for the sustainability of malaria prevention in Africa [4,5]. This is the reason why the research of alternate solutions using a non-pyrethroid insecticide became a priority [6]. In Zimbabwe, when bendiocarb was tested for its residual efficacy and irritation in malaria vector control, the results showed for up to 20 weeks after treatment, a mortality of 100% of *An. arabiensis* over the thatch but with a less pronounced irritant effect [7]. In another study in the Philippines, selective application of bendiocarb was very promising both in terms of efficiency and cost-effectiveness for the control of *An. flavirostris* [8]. Asidi *et al.*, have shown that the carbosulfan net gave significantly higher killing of *An. gambiae* s.l. than all pyrethroid treatments except the impregnated net with deltamethrin [9]. In Benin, a recent study [10] that included four months of evaluation of various insecticides in experimental huts, showed that Sumithion 40 WP (Fenitrothion), Master Quick ZC (mixture of chlorpyrifos 250 g/l + deltamethrin 12 g/l), and Ficam M (bendiocarb 800 g/kg), proved to be good alternatives against pyrethroid-resistant *Anopheles*. However, bendiocarb is the only product that the National Malaria Control Program (NMCP) has selected for the implementation of IRS in Benin, because the Master Quick ZC formulation is not approved by the World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme for use. With regard to Sumithion 40 WP, doubts were raised on its safety in terms of its secondary effects and odor [10]. The choice of a control method based on IRS is a decision of Benin to reinforce the action of the LLITNs and this approach is stated in the control plan of the National Malaria Control Program. To reach this goal, two rounds of IRS of bendiocarb were carried out in the study area by the Research Triangle Institute (RTI), in collaboration with the population based on community involvement to ensure the sustainability of the strategy. IRS has been used for plateau zones (IRS arm) situated far from flooding areas, and LLITNs have been distributed to families of villages situated in flooding zones (LLITN arm) where implementation of IRS has not been adopted. The National Malaria Control Program strongly hopes to reduce malaria burden through this

program. Indeed, according to results of trials sponsored by WHO in Garki in northern Nigeria [11], IRS led to a considerable decrease in the total vector population and reduction in the incidence of malaria among children, the plasmodic index and fever, and an apparent effect on mortality of 1–4 year old infants. In Kenya, IRS of fenitrothion in Kisumu [12] and the use of LLITNs in the south coast of Kenya [13], showed a decline in populations of *An. funestus* s.l. and *An. gambiae* s.l. by the IRS, while the high bed net coverage was followed by a much reduced human biting rate and a diminishing role of *An. gambiae* s.s. in malaria transmission. The monitoring of behavioral responses of mosquitoes to insecticides is critical to the understanding of how chemicals function in the control of disease transmission [14]. As the international community has now prioritized national and regional elimination with a long-term ultimate goal of malaria eradication [15], the need to understand the biological implications of IRS in large scale and full coverage of LLITNs is paramount. After the implementation of the IRS in Benin by the NMCP, it is important to understand its impact on the behavior of *An. gambiae* s.l. in contact with walls treated with insecticide. In this context, the present study aims to evaluate the effect of a large scale IRS using a non-pyrethroid insecticide and full coverage of deltamethrin treated nets on the behavior of *An. gambiae* s.l. in the intervention areas compared to untreated areas used as controls.

Methods

Study area

The study was conducted in 4 districts of Oueme region in South-East of Benin (Figure 1): Adjohoun, Dangbo, and Seme-Misserete Kpodji which are retained by the health authorities for the first indoor residual spraying campaign in Benin. The four districts cover an area of 977 km² and an estimated 64,799 households. There are 62,890 children aged <5 years in 174 villages [16]. From 2002 to 2006, Oueme was the region with the highest rates of malaria-associated mortality [16]. The region is characterized by a sub-equatorial type climate. Our study also included Porto-Novo, which served as a control because it has the same ecological and geographic characteristics as the four districts mentioned above. Porto-Novo is the administrative capital of Benin, also in Oueme region (Figure 1). Oueme region is characterized by the presence of two types of environment. The first environment is a plateau zone situated far from flooding areas. In the plateau area, mosquito breeding sites are created particularly during the rainy seasons; more than 90% of households have been treated with bendiocarb at a dose of 400 mg/m². The second environment is the peripheral area represented by a swampy zone on the border of the Oueme River and Lake Nokoue. This

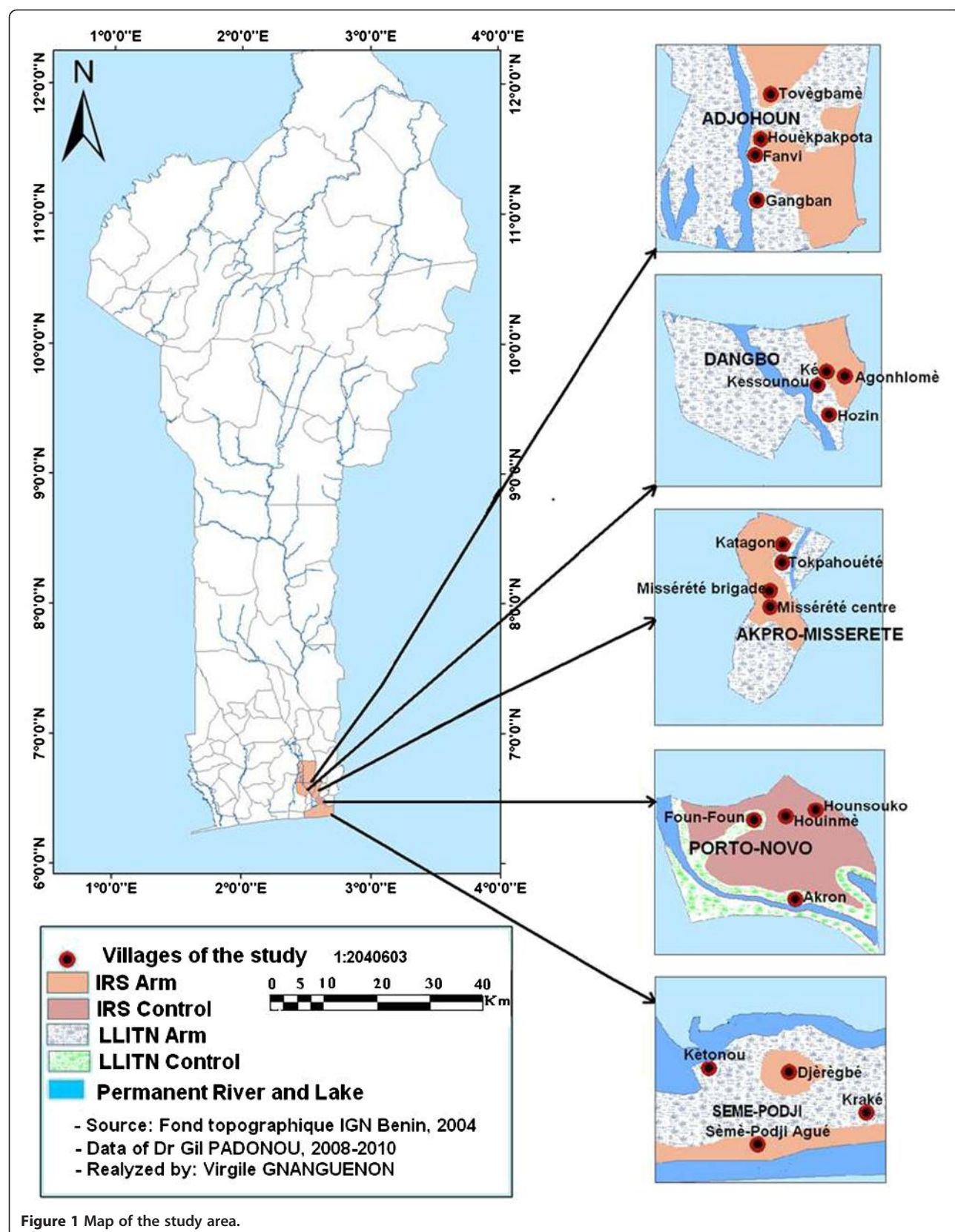


Figure 1 Map of the study area.

peripheral area is made up of marshy land converted to vegetable gardens. Land management in this vegetable growing area creates a perfect breeding site for *An. gambiae s.l.*, the main vector of malaria, which is highly resistant to pyrethroids [16]. In the present study, the plateau zone is referred to as the “IRS arm”, and the swampy zone is called “LLITN arm”. In the swampy zone, IRS was not implemented because of the presence of the two bodies of water, which could be at risk of contamination by insecticides. Therefore, LLITNs were distributed to these households in this area, and particular attention was given to children less than five years of age and pregnant women [17]. An estimated distance between 5 and 7 km separated the plateau and the flood areas [18]. This distance was sufficient enough to prevent migration of mosquitoes from one area to another. The houses in both areas are generally built in a similar shape. These houses are made of either mud or cement with large eave gaps facilitating entry and exit of mosquitoes [16]. However, the human population density is high in both areas, and mosquitoes do not need to travel far to feed [17].

Indoor residual spraying of bendiocarb in the plateau area and LLITNs distribution in the swampy area

Two rounds of IRS of bendiocarb were carried out in the plateau areas (IRS arm) of districts of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme. The first round was carried out in July 2008 and the second, eight months later, in March 2009. Indeed, in a recent study, this insecticide appeared especially efficient in phase II evaluation against malaria vectors [17]. The two applications were completed by volunteers selected from the local community and trained by the RTI team, the implementing partner of the U.S. Agency for International Development. According to RTI, the coverage rate was more than 90% for each of the two rounds. In the swampy areas a total of 48,819 LLITNs (Permanet 2.0; Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland) were distributed in October 2008 and May 2009. They were distributed to 47,524 households. According to RTI, more than 90% of children less than five years of age and pregnant women received LLITNs.

Mosquito sampling and identification

The sampling was carried out in 4 villages (2 in the plateau area and 2 in the peripheral area) per district by using indoor and outdoor human landing catches (HLC) to identify the changes in biting behaviour of mosquitoes induced by the presence of bendiocarb on the walls or deltamethrin in the fiber of PermaNets. The sampling was carried out every month for two consecutive nights per survey (8 person-night per district per survey). Catches were conducted between 21.00 and 05.00 hrs.

Teams of collectors were rotated among the collection points on different collection nights to minimize sampling bias. Informed consent from all volunteers was obtained before their participation in the study.

Human landing catches were carried out during January 2008–December 2009 and spanned two rounds of IRS. To measure the impact of the intervention on the endophagy rate, we compared the values indicated for the same periods, January–July 2008 before intervention and January–July 2009 after intervention. We excluded August–December 2008 and 2009 from the analysis because these two periods were those of IRS implementation, but there is no available database for these periods for before and after intervention.

In addition, to evaluate the impact of interventions on reduction of entry rate, endophily rate and mortality rate induced by the presence of insecticides, 4 bedrooms were selected in each intervention area. Mosquitoes were collected by using window exit traps. The collections of live mosquitoes were carried out using a mouth aspirator and transferred into holding tubes and provided with cotton wool wetted with a 10% honey solution to record delayed mortality after 24 h. Dead mosquitoes collected in the trap and on the floor inside the bedroom were transferred into plastic cups to be identified and used to determine the immediate mortality. Furthermore, in the meantime, morning catches within the same bedrooms were undertaken using pyrethrum spray catches.

The sampling of mosquitoes was carried out in the same bedroom and at the same frequency during the intervention periods before and after.

All anophelines were sorted and assigned to species based on morphological characters using standard identification keys [19]. The female mosquitoes belonging to *An. gambiae s.l.* were classified according to the state of their abdomens (unfed, partially fed, fully fed or gravid) [20].

Parameters measured

Reduction of entry rate is the difference of the number of *An. gambiae s.l.* captured after intervention multiplied by 100 and divided by the number caught before intervention in the same bedroom.

Endophily rate is the percentage of the number of *An. gambiae s.l.* at rest divided by the total number collected by indoor residual spraying and the window trap.

Endophagy rate is the percentage of the number of indoor bites divided by the total number of indoor and outdoor bites.

Overall mortality rate is immediate mortality rate + delayed mortality rate recorded after 24 h.

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The efficiency of the intervention was

evaluated by using the Kruskal-Wallis test to compare parameters (blood feeding rate, gravidity rate, endophily rate) between the periods before and after intervention. The Fisher exact test was used to compare mortality rates between these two periods. The significance level was set at 5%.

Ethical approval

This study received the approval of the Ministry of Health and the Centre for Entomological Research of Cotonou (CREC). The voluntary mosquito collectors gave their consent before participating in the study. Malaria prevention and curative treatments were provided to all sleepers according to World Health Organization (WHO) recommended regimen on the basis of fever and detectable *P. falciparum* parasitemia. They were all vaccinated against yellow fever.

Results

Decrease of entry rate of *An. gambiae s.l.* after interventions

Before IRS interventions during May to July 2008 a total of 928 *An.gambiae* were collected by exit window traps and PSC, for all localities Adjohoun, Dangbo, Misserete₁, Misserete₂ and Seme. But after IRS interventions, this number had fallen drastically to 89, representing a reduction of 90.40% over the same period. Despite a lower irritancy of bendiocarb, it induced a strong repellent effect on the behavior of *An. gambiae s.l.* after IRS. In many localities the reduction of *An. gambiae s.l.* entry rate, was very significant (Table 1), particularly in Seme IRS arm where no *An. gambiae s.l.* were caught by exit window traps and PSC. While in the untreated control

IRS arm, there was an opposite trend (Table 1): the number of *An. gambiae s.l.* increased by a proportion of 50%. But in the LLITN arm there was a reduction of entry rate in Adjohoun (20.88%), whereas in Dangbo and Seme there was an increase of entry rate of mosquitoes in the respective proportions of 21.95% and 14%.

Decrease of endophily rate

During the period before intervention, from a total of 928 *An. gambiae s.l.* captured by window exit traps and PSC, 623 were endophilic (67.13%) in the IRS arm. But after IRS interventions, only 4 *An. gambiae s.l.* were caught in the bedrooms in Dangbo from a total of 89 *An. gambiae s.l.*, whereas in the control the endophily rate was stable at 51.67% ($P > 0.05$) (Table 2). In peripheral areas of Adjohoun, Dangbo and Seme where LLITNs were distributed, endophily rates also decreased, respectively to 11.11% (8/72), 52% (52/100), 32.50% (74/216) after LLITNs interventions. But in Dangbo the decrease was not significant ($P > 0.05$) (Table 2). In the control LLITN arm, the variation of endophily was not significant between the two periods before (53.33%) and after (52.08%) intervention ($P > 0.05$). When comparing the impact of IRS and LLITN in the same districts in terms of reduction of *An. gambiae s.l.* endophily rate, the decrease due to the IRS (100%) was higher than the decrease due to LLITN (43.95%) in the district of Seme. This has been observed less significantly in Adjohoun and Dangbo.

Gravidity rate of *An. gambiae s.l.*

Before intervention, 348 *An. gambiae s.l.* from a total of 928 (37.5%) were gravid in the IRS arm. Misserete₂ and

Table 1 Reduction of entry rate of *Anopheles gambiae s.l.* observed before and after two interventions in districts of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme

Districts	Number of females caught before intervention (May-July 2008)	Number of females caught after intervention (May-July 2009)	Reduction of entry rate %
IRS arm			
Adjohoun	84	32	61.90
Dangbo	84	48	42.85
Misserete ₁	84	5	94.04
Misserete ₂	288	4	98.61
Seme	388	0	100
Akron Control	88	132	-50
LLITN arm			
Adjohoun	91	72	20.88
Dangbo	82	100	-21.95
Seme	90	216	-140
Akron Control	404	384	4.95

Table 2 Endophily rate of *Anopheles gambiae* s.l. observed before and after two interventions in districts of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme

Districts	Before intervention (May-July 2008)				After intervention (May-July 2009)			
	Number of females caught	Number of <i>An. gambiae</i> caught by PSC	Endophily rate		Number of females caught	Number of <i>An. gambiae</i> caught by PSC	Endophily rate	
			Mean	Confidence interval			Mean	Confidence interval
IRS arm								
Adjohoun	84	58	68.83 ^a	[58.02-78.69]	32	0	0 ^b	[0.00-10.91]
Dangbo	84	53	63.33 ^a	[51.87-73.37]	48	4	8.33 ^b	[2.32-19.98]
Misserete ₁	84	52	61.83 ^a	[50.66-72.29]	5	0	0 ^b	[0.00-52.20]
Misserete ₂	288	210	73 ^a	[67.39-77.97]	4	0	0 ^b	[0.00-60.25]
Seme	388	250	63.67 ^a	[59.44-69.20]	0	0	-	-
Akron Control	88	45	49.33 ^a	[40.24-61.95]	132	68	51.67 ^a	[42.66-60.30]
LLITN arm								
Adjohoun	91	55	60.50 ^a	[49.64-70.54]	72	8	11.11 ^b	[4.92-20.73]
Dangbo	82	50	61.50 ^a	[49.57-71.57]	100	52	52 ^a	[41.78-62.10]
Seme	90	55	60.83 ^a	[50.25-71.21]	216	74	32.50 ^b	[27.95-41.00]
Akron Control	404	216	53.33 ^a	[48.47-58.42]	384	200	52.08 ^a	[46.96-57.18]

For the mean of each district, values of the same line which carry same letters in exposant were not significantly different ($p > 0.05$).

Adjohoun had the highest (41.6%) and lowest (30.16%) rates. After the IRS no gravid mosquitoes had been collected in all localities (Table 3). Compared to IRS, LLITN performance was not as spectacular (Table 3). The rate of gravidity fell to 31.08% and 24.98% respectively in Adjohoun and Dangbo, whereas it increased to 25.01% in Seme. The gravidity rate in the control has also decreased from 2.5% in the IRS arm and 14.17% in the LLITN arm (Table 3).

Decrease of endophagy rate

Before intervention *An. gambiae* s.l. was endophagic in all localities (Figure 2). The proportion biting indoors were 85.43%, 72.14%, 79.57%, 70.43% and 64.43% in Porto Novo, Adjohoun, Dangbo, Misserete₁, Misserete₂ and Seme respectively (Figure 2). But after IRS intervention *An. gambiae* s.l. tends to take a blood meal preferably on catchers installed outside rooms in the IRS arm (Figure 2). Indeed, the proportion biting indoors in the IRS arm

Table 3 Gravidity rate of *Anopheles gambiae* s.l. observed before and after IRS and LLIN intervention in districts of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme

Districts	Before intervention (May-July 2008)				After intervention (May-July 2009)			
	Number of females caught	Number of gravid mosquitoes	Gravidity rate		Number of females caught	Number of gravid mosquitoes	Gravidity rate	
			Mean	Confidence interval			Mean	Confidence interval
IRS arm								
Adjohoun	84	26	30.16 ^a	[21.31-41.98]	32	0	0 ^b	[0.00-10.91]
Dangbo	84	31	36 ^a	[26.63-48.13]	48	0	0 ^b	[0.00-7.42]
Misserete ₁	84	29	33.66 ^a	[24.48-45.70]	5	0	0 ^b	[0.00-52.20]
Misserete ₂	288	120	41.16 ^a	[35.91-47.60]	4	0	0 ^b	[0.00-60.25]
Seme	388	142	36.16 ^a	[31.79-41.61]	0	-	-	-
Akron Control	88	35	41 ^a	[29.49-50.77]	132	53	40 ^a	[31.72-49.04]
LLITN arm								
Adjohoun	91	41	44.33 ^a	[34.60-55.85]	72	22	30.55 ^b	[20.24-42.53]
Dangbo	82	38	46.66 ^a	[35.25-57.70]	100	35	35 ^b	[25.73-45.19]
Seme	90	35	38.66 ^a	[28.79-49.75]	216	101	48.33 ^a	[39.96-53.65]
Akron Control	404	176	42.33 ^a	[38.67-48.56]	384	133	36.33 ^a	[29.88-39.63]

For the mean of each district, values of the same line which carry same letters in exposant were not significantly different ($p > 0.05$).

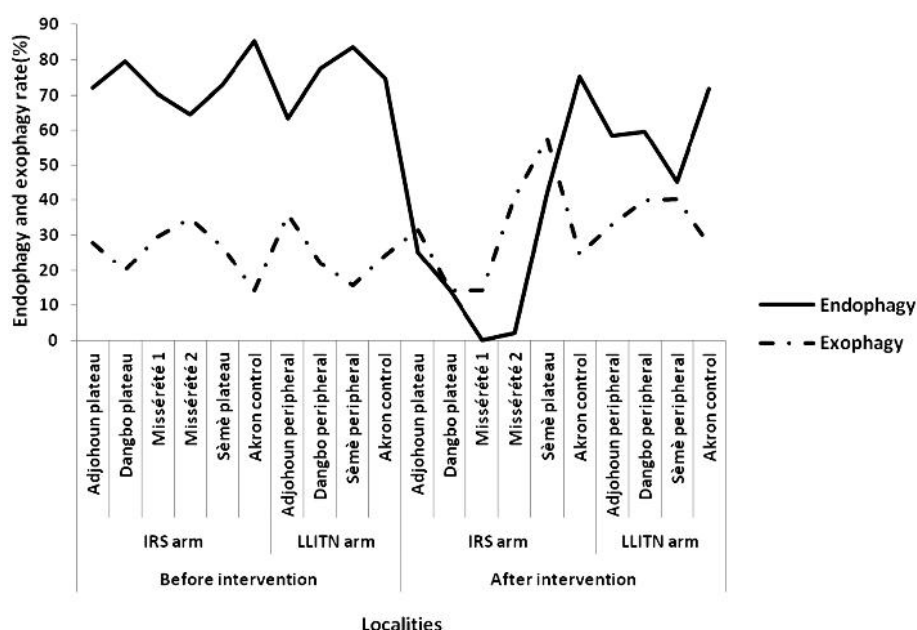


Figure 2 Graphical variation of the proportion biting indoors (Endophagy) and that of the ones biting outdoors (Exophagy) in the IRS arm and the LLITN arm during the periods before and after interventions.

significantly ($p < 0.05$) decreased from 67.09% before intervention to 42.85% after intervention (24.24% of reduction), compared to a low but significant decrease (71.31% to 57.46%) in LLITN arm. This was not the case in the control area ($p > 0.05$) during the period after intervention.

Mortality rate of *An. gambiae s.l.*

We have noticed that all live mosquitoes collected in window traps and transferred into plastic cups were dead before 24 hours had elapsed. Therefore, we have considered them as mosquitoes immediately dead, including all dead mosquitoes collected from floors and in the exit window traps. In the IRS area before intervention the mortality rate was almost zero (4/928 *An. gambiae s.l.* were dead) (Table 4). However, after the IRS, the lethal effect of bendiocarb was very significant, with mortality rates of 64.58%, 80% and 75% respectively observed in Dangbo, Missereete₁ and Missereete₂ (Table 4). In Adjohoun this rate was lower (37.5%), whereas it had been 0% in the control area ($p > 0.05$) (Table 3). However, after distribution of LLITNs, the mortality rate increased respectively to 8.33%, 23% and 13.88% in localities of Adjohoun, Dangbo and Seme. Compared to the lethal effect of bendiocarb in IRS areas, LLITNs are proven less effective.

Discussion

The high decrease of entry rate (42.85 à 100%) of *An. gambiae s.l.* natural populations into bedrooms, could be explained by the large scale of IRS with bendiocarb that

created a stressful environment, which in turn could lead to impressive reduction of entry rate of mosquitoes. This is consistent with previous studies that showed that the unpleasant atmosphere created by the presence of bendiocarb on the walls inside houses is harmful to the mosquitoes and leads to an increase in the exit rate [17]. Conversely, the strong irritant effects that we observed during the evaluation in experimental huts [10] for deltamethrin, showed reduction of entry rate was less effective in LLITNs areas. This difference in efficacy could be due to the mass community effect of bendiocarb used on a large scale. Indeed, in IRS areas, 2,623 kg of bendiocarb were sprayed in 142,814 bedrooms during the first intervention and 2,751 kg in 156,233 bedrooms during the second intervention; 90 to 100% of bedrooms were treated, according to RTI (Research Triangle International) who carried out the spraying operation. This is consistent with previous studies that showed that community-wide use of insecticide-treated bednets (ITBN) engenders a mass effect [21]. The data analyzed on a cohort of children, revealed for those not using ITBNs, an increasing level of ITBN usage within the area surrounding each child was associated with a decreased risk of developing malaria. This effect was significant in areas at distances of up to 1.5 km away from each child [21]. In addition, some beneficiaries of LLITNs do not use them, but continue to use the untreated nets they had before. Prior to free distribution of LLITNs, it was shown that heat, choking, beliefs and taboos seem to be barriers to the use of bednets in the study area [16]. It is

Table 4 Mortality rate of *Anopheles gambiae* s.l. observed before and after IRS and LLITN interventions in districts of Adjohoun, Dangbo, Misserete and Seme

Districts	Before intervention (May-July 2008)				After intervention (May-July 2009)			
	Number of females caught	Number of dead mosquitoes	Mortality rate		Number of females caught	Number of dead mosquitoes	Mortality rate	
			Mean	Confidence Interval			Mean	Confidence interval
IRS arm								
Adjohoun	84	2	2.3^a	[0.29-8.34]	32	12	37.5^b	[21.10-56.31]
Dangbo	84	1	1.04^a	[0.03-6.46]	48	31	64.58^b	[49.45-77.84]
Misserete ₁	84	1	1.11^a	[0.03-6.46]	5	4	80^b	[28.36-99.50]
Misserete ₂	288	0	0^a	[0.00-1.27]	4	3	75^b	[19.41-99.37]
Seme	388	0	0^a	[0.00-0.95]	0	-	-	-
Akron Control	88	1	0.83^a	[0.03-6.17]	132	0	0^a	[0.00-2.76]
LLITN arm								
Adjohoun	91	0	0^a	[0.00-3.98]	72	6	9.72^b	[3.12-17.26]
Dangbo	82	0	0^a	[0.00-4.40]	100	23	25.69^b	[15.17-32.49]
Seme	90	1	0.16^a	[0.03-6.04]	216	30	14.13^b	[09.57-19.23]
Akron Control	404	0	0^a	[0.00-0.91]	384	0	0^a	[0.00-0.96]

For the mean of each district, values of the same line which carry same letters in exosant were not significantly different ($p > 0.05$).

also possibly due to their poor living standards. People sell LLITNs to address other problems, as was the case in trials sponsored by The WHO in the Congo and Tanzania [22]. For LLITNs to be fully effective, requires that community members are actively involved in the process, to ensure that nets are used even during seasons when such use is unpleasant because of the heat and insect bites do not seem numerous enough to justify it [22].

The endophily rate of *An. gambiae* s.l. observed before the IRS and LLITN interventions corroborates previous reports of anopheline behaviour [23,24]. However, after the IRS and LLITN interventions a dramatic decrease of the endophily rate was observed in IRS area. This could be explained by a strong decrease in the proportion of gravid and half gravid mosquitoes, according to Table 3. The unpleasant atmosphere created by the presence of bendiocarb on the walls inside houses was harmful to the mosquitoes and might be the cause of this shift in behavior. Furthermore, the impressive reduction of entry rate of *An. gambiae* s.l. could justify this shift. Despite this deterrent effect a low proportion of *An. gambiae* s.l. enter bedrooms. But once on the walls, they absorb the bendiocarb which kills them and they do not have time to bite and to rest inside to digest their blood meal. Indeed, other studies previously conducted [10,25,26] have shown the effectiveness of alternative insecticides such as carbamates to control *An. gambiae* s.l. resistant to pyrethroids. Furthermore, the present study confirms the absence of *An. gambiae* s.l. resistance to bendiocarb in southern Benin [16,27]. Conversely, *An. gambiae* s.l. resistance to pyrethroids [18,25,28] was corroborated

and could justify the difference in efficacy of LLITNs impregnated with deltamethrin compared to that using IRS based on bendiocarb.

The findings have also demonstrated that large scale IRS can alter *An. gambiae* s.l. populations and reduce the epidemiological importance of indoor-biting mosquitoes. This decrease was also observed in the LLITNs area, but in a lower proportion. This is consistent with others studies showing that IRS [17] and ITNs in Somalia [29] and Tanzania [30] can reduce the mean density, survival, infectiousness and fitness of mosquito populations.

Conversely, in the control area *An. gambiae* s.l. remained endophagic in the period after intervention, whereas it has been more exophagic in intervention areas. In this context, the human-biting behaviour of vectors in Oueme region appears to be independent of population density for these species [31]. Nevertheless, a very plausible case [32] is presented that correlates community-wide ITN use with significant changes in the biting profile of the principal malaria vectors. This indicates that factors relating to locality and seasonal climatic variations would have little effect on shifts of behaviour of taking human blood.

The use of vector control tools and behaviors of the host would be the main factors that modify the behavior of sucking human blood observed on *An. gambiae* s.l.. Indeed recent studies [33,34] showed that the long-term indoor application of residual insecticides contributes towards an increased tendency for outdoor feeding among malaria vector populations. This is expected to erode the efficacy of malaria vector control interventions over time, much as increased insecticide resistance would [35].

Despite the effectiveness of bendiocarb used for IRS, it has the disadvantage of having a short residual effect [10,36]. In this case it appears that the LLITNs, although providing modest efficacy against pyrethroid resistant *An. gambiae* s.l., are necessary to supplement IRS because of the long duration of the action of deltamethrin and the role as a mechanical barrier played by this tool [17,22], against mosquitoes. Regardless of a shift in host seeking behaviour of *An. gambiae* s.l., other possibilities for outdoor anti-vector interventions need to be explored, in combination with ongoing IRS and LLITN distribution because of the short residual effect mentioned above.

Conclusion

The impact on the behaviour of *An. gambiae* s.l. observed with the bendiocarb used in IRS was highly effective compared with the free distribution of LLITNs in terms of mortality and the decrease of proportions of indoor feeding. However, this decrease is not enough to prevent a new infection of *Plasmodium falciparum* by outdoor biting mosquitoes. In this case it would be advisable for people to go to bed early and to avoid infective bites outdoors. Therefore, the personal protection and collective protection respectively conferred by the IRS and LLITN are not enough to eradicate malaria. There is therefore a need for complementary tools [37,38], and research of alternative strategies oriented on effective health education, people's empowerment and participation, and the use of powerful tools like IRS, LLITNs, larvicides and repellents.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GGP, GG, VG, RO and MA designed the study. GGP, RA and OO carried out the experiments. GGP and GG analyzed the data. GGP, GG and AY drafted the manuscript. GGP, MA, GG, AY, RA and MS critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative), which financially supported this study through USAID and RTI. We are also grateful to the West African Health Organization (WAHO), which financially and materially supported the training of Gil Germain Padonou in University of Ghana. The authors would like to thank Arnaud Adango for his technical assistance and populations of Adjohoun, Dangbo, Seme, and Misserete for their collaboration.

Received: 13 July 2012 Accepted: 20 October 2012

Published: 14 November 2012

References

- Okoro EA, Hay SI, Gikandi PW, Sharif SK, Noor AM, Peshu N, Marsh K, Snow RW: **The decline in paediatric malaria admissions on the coast of Kenya.** *Malaria J* 2007, **15**:151.
- Ceesay SJ, Casals-Pascual C, Erskine J, Anya SE, Duah NO, Fulford AJC, Sesay SSS, Abubakar I, Dunyo S, Sey O, Palmer A, Fofana M, Corrah T, Bojang KA, Whittle HC, Greenwood BM, Conway DJ: **Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis.** *Lancet* 2008, **372**:1545–1554.
- Barutwanayo M, Coosemans M, Delacollette C, Bisore S, Mpitabakana P, Seruzingo D: **La lutte contre les vecteurs du paludisme dans le cadre d'un projet de développement rural au Burundi.** *Ann Soc Belg Med Trop* 1991, **71**:113–125.
- Reimer LJ, Tripet F, Slotman M, Spielman A, Fondjo E, Lanzaro GC: **An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea.** *Insect Mol Biol* 2005, **14**:683–688.
- Protopopoff N, Verhaeghen K, Van Bortel W, Roelants P, Marcotty T, Baza D, D'Alessandro U, Coosemans M: **A high increase in kdr in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**:1479–1487.
- Zaim M, Guillet P: **Alternative insecticides: an urgent need.** *Trends Parasitol* 2002, **18**:161–163.
- Mpofu SM, Kanyimo KH, Masendu H: **Potential use of bendiocarb (Ficam VC) for malaria control in an area of Zimbabwe.** *J Am Mosq Control Assoc* 1991, **7**(4):536–42.
- Asinas CY, Hugo CT, Boase CJ, Evans RG: **Evaluation of selective spraying of bendiocarb (Ficam VC) for the control of *Anopheles flavirostris* in the Philippines.** *J Am Mosq Control Assoc* 1994, **10**:496–500.
- Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW: **Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes.** *Malar J* 2005, **4**:25.
- Akogbeto MC, Padonou GG, Gbenou D, Irish S, Yadouleton A: **Bendicarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa.** *Malaria J* 2010, **9**:204.
- L M: **Le projet Garki: recherches sur l'épidémiologie du paludisme et la lutte antipaludique dans la savane soudanienne de l'Afrique occidentale.** OMS: Genève; 1980.
- Payne D, Grab B, Fontaine RE, Hempel JH: **Impact of control measures on malaria transmission and general mortality.** *Bull World Health Organ* 1976, **54**:369–77.
- Mutuku FM, King CH, Mungai P, Mbogo C, Mwangangi J, Muchiri EM, Walker ED, Kitron U: **Impact of insecticide-treated bed nets on malaria transmission indices on the south coast of Kenya.** *Malaria J* 2011, **10**:356.
- Sungvornyothin S, Chareonviriyaphap T, Prabairipai A, Tirakhupt V, Ratanatham S, Bangs MJ: **Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin.** *J Vector Ecol* 2001, **26**:202–215.
- Feachem RGA, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, Sabot O, Rodriguez MH, Abeyasinghe RR, Ghebreyesus TA, Snow RW: **Shrinking the malaria map: progress and prospects.** *Lancet* 2010, **376**:1566–1578.
- Padonou GG, Sezonlin M, Gbedjissi GL, 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**(4):59–68.
- Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL: **Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with Bendicarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**(4):586–593.
- Padonou GG, Sezonlin M, Osse R, Aizoun N, Oke-Agbo F, Oussou O, Gbedjissi 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.
- Gillies MT, De Meillon B: **The Anophelinae of Africa south of the Sahara.** Johannesburg: Publication of the South African Institute for Medical Research; 1968:54.
- OMS: **Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs, WHO/CDS/CPE/SMT/2002.18 Rev.1.** Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2002.
- Howard SC, Omumbo J, Nevill C, Some ES, Donnelly CA, Snow RW: **Evidence for a mass community effect of insecticide-treated bednets on the incidence of malaria on the Kenyan coast.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**(4):357–60.

22. Curtis CF, Maxwell CA, Finch RJ, Njunwa KJ: **A comparison of use of a pyrethroid either for house spraying or for bednet treatment against malaria vectors.** *Trop Med Int Health* 1998, **3**:619–631.
23. Mouchet J, Gariou J: **Exophilie et exophagie d'*Anopheles gambiae* Giles 1902, dans le sud Cameroun.** *Bull Soc Pathol Exot* 1957, **3**:446–461.
24. Faye O, Konate L, Mouchet J, Fontenille D, Sy N, Hebrard G, Herve JP: **Indoor resting by outdoor biting females of *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in the sahel of northern Senegal.** *J Med Entomol* 1997, **34**:285–289.
25. 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**(2):199–206.
26. Djenontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F: **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets.** *Malaria J* 2009, **8**:233.
27. Djogbenou L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM, Chandre F: **Identification and geographic distribution of the *ace 1R* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(2):298–302.
28. Akogbeto M, et Yakoubou S: **Resistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Benin, Afrique de l'Ouest.** *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **2**:123–130.
29. Noor AM, Moloney G, Borle M, Fegan GW, Shewchuk T, Snow Robert W: **The Use of Mosquito Nets and the Prevalence of *Plasmodium falciparum* Infection in Rural South Central Somalia.** *PLoS ONE* 2008, **3**(5):2081.
30. Premji Z, Lubega P, Hamisi Y, Mchopa E, Minjas J, Checkley W, Shiff C: **Changes in malaria associated morbidity in children using insecticide treated mosquito nets in the Bagamoyo district of coastal Tanzania.** *Trop Med Parasitol* 1995, **46**(3):147–53.
31. Habicht JP, Victora CG, Vaughan JP: **Evaluation designs for adequacy, plausibility and probability of public health programme performance and impact.** *Int J Epidemiol* 1999, **28**:10–18.
32. Charlwood JD, Smith T, Kihonda J, Heiz B, Billingsley PF, Takken W: **Density independent feeding success of malaria vectors (Diptera: Culicidae) in Tanzania.** *Bull Entomol Res* 1995, **85**:29–35.
33. Reddy MR, Overgaard HJ, Abaga S, Reddy VP, Caccone A, Kiszewski AE, Slotman MA: **Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea.** *Malaria J* 2011, **10**:184.
34. Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF: **Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania.** *Malaria J* 2011, **10**:80.
35. Mbogo CNM, Baya NM, Ofulla AVO, Githure JI, Snow RW: **The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors on the Kenyan coast.** *Med Vet Entomol* 1996, **10**:251–259.
36. Najera JA, Zaim M: **Lutte contre les vecteurs du paludisme.** OMS Geneve: Criteres et procedures de prise de decision pour une utilisation raisonnee des insecticides; 2004.
37. Howard AFV, N'Guessan R, Koenraadt CJM, Asidi A, Farenhorst M, Akogbeto M, Thomas MB, Knols BGJ, Takken W: **The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant mosquitoes in Benin, West Africa.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:87.
38. Munhenga G, Brooke BD, Chirwa TF, Hunt RH, Coetzee M, Govender D, Koekemoer LL: **Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:208–11.

doi:10.1186/1756-3305-5-262

Cite this article as: Padonou *et al.*: Decreased proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae* s.l. populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa). *Parasites & Vectors* 2012 **5**:262.

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



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 µl de CTAB 2%
- 2- Mettre au Bain-Marie 65° pendant 5 minutes
- 3- Ajouter 200 µl 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 µl 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 µl 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 µl d'H₂O - Ne pas vortexer - Laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une 1/2 journée)

CTAB 2%

Réactifs	Volume	Conc. finale
1 M Tris HCl pH 8.0	100 ml	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 CTGGTTTGGTCGGCACGTTT
AA AAGTGTCTTCTCCATCCTA
AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

Conditions PCR

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

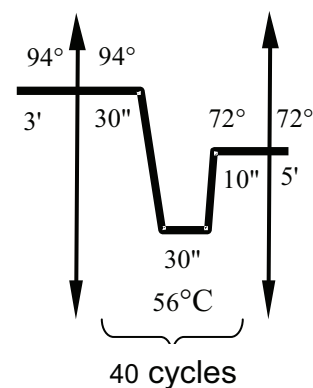
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

3' [30", 30", 10"]_{40c} 5' @ 56°C

Taille attendue

An. gambiae : 390 bp
An. arabiensis : 315 bp
An. melas : 464 bp



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

ISA, janv 2003

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

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

Amorces

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

Conditions PCR

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

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

Amplification :

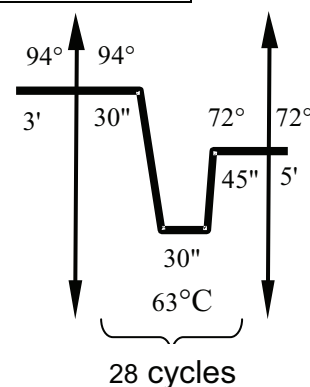
3' [30", 30", 45"]_{28c} 5' @ 63°C

Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



Mutation Kdr

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans un gène codant pour un canal à Na, associé à la résistance au DDT et aux pyréthrinoides.

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

Réf : Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998, 7(2):179-84.

Amorces

D1 ATAGATTCCCCGACCATG
D2 AGACAAGGATGATGAACC
D3 AATTTGCATTACTTACGACA
D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

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

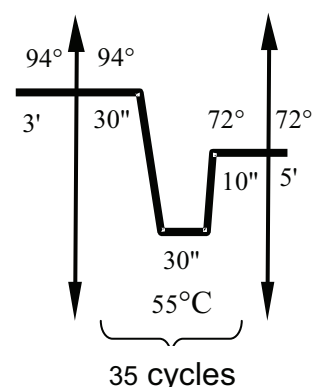
D1/D2 : 293 bp

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'acétylcholine 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

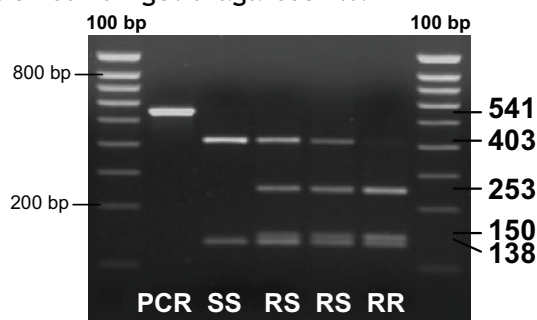
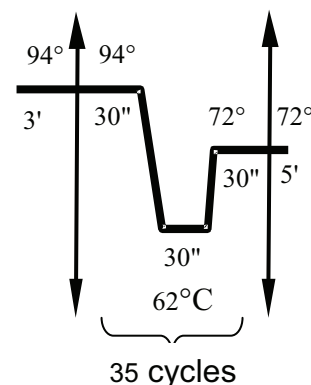
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH ₂ O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

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

<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

b) Mettre 50 µl/puits (à pipette 8 canaux, pte jaune) de chaque **ACm de capture**

- * SCREEN : mélange des plasmodiums a tester (n x 50 µl)
 - * monospécifique : uniquement du plasmodium étudié (1 x 50 µl)
- Laisser la nuit sur la paillasse (ou le W.E. à 4° C).

- 07 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 08 - METTRE 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique)
pendant 1 H sur paillasse.
Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tête Thorax dans BB)
- 09 - VIDER LES PLAQUES, NE **PAS** LAVER
- 10 - METTRE 50 µl du **broyat de moustique** par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit.
Laisser pendant 2 H sur paillasse.
- 11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les **ACm CONJUGUES**,
si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)
- 12 - VIDER LA PLAQUE. **LAVER 2 FOIS** AU PBS/TWEEN 20

13 - METTRE 50 µl/puits de l'**ACm CONJUGUE**, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl) LAISSER 1 H sur paillasse

ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande

CONJUGUES Pour 1 plaque

p. falciparum : 7,5 µl/5 ml **BB**
p. vivax 210: 10 µl/5 ml **BB**
p. vivax 247 : 2 µl/5 ml **BB**
p. malariae 15 µl/5 ml **PBS**
p. ovale 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 RECOMMANDEES 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

p. falciparum : 15 µl/5 ml PBS
p. vivax 210 : 5 µl/5 ml PBS
p. vivax 247 : 10 µl/5 ml PBS
p. malariae : 60 µl/5 ml PBS
p. ovale : 15 µl/5 ml PBS

f :

v 210:

v 247 :

m :

o :

Pour 3 plaques

45 µl/15 ml PBS
15 µl/15 ml PBS
30 µl/15 ml PBS
180 µl/15 ml PBS
45 µl/15 ml PBS

- Révélation : ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**

DILUTIONS RECOMMANDEES 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

p. falciparum : 7,5 µl/5 ml BB
p. vivax 210 : 10 µl/5 ml BB
p. vivax 247 : 2 µl/5 ml BB
p. malariae : 15 µl/5 ml BB
p. ovale : 15 µl/5 ml BB

f :

v 210

v 247 :

m :

o :

Pour 3 plaques

22,5 µl/15 ml BB
30 µl/15 ml BB
6 µl/15 ml BB
45 µl/15 ml BB
45 µl/15 ml BB

Les ACm sont fournis par le Dr WIRTZ, CDC Atlanta

TEMOINS

Dilutions pour les témoins positifs CSP antigène de *P. f.*, *P. v* 210 et *P. v* 247

Attention reconstitution du lyophilisat dans eau distillée, puis dilution dans BB

Ces témoins sont fournis par le CDC

Espèce plasmodiale	Numéro de la Solution	Volume de l'antigène controle positif	Volume de Blocking Buffer (BB)	Concentration en antigène dans 50 µl
<i>P. falciparum</i>	Stock	Pf lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist.	----
	I	5µl de stock	500µl BB	500ng
	II	10µl de I	1000µl BB	5000pg
	* III	20µl de II	1000µl BB	100pg
	Témoin pos			
<i>P. vivax 210</i>	Stock	Pv210 lyophilisé (25 µg)	25 µl d'eau dist	----
	A	5µl de stock	500µl BB	500ng
	B	10µl de A	1000µl BB	5000pg
	C	20µl de B	500µl BB	200pg
	* D	200µl de C	800µl BB	40pg
	Témoin pos			
<i>P. vivax 247</i>	Stock	Pv247 lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist	----
	1	5µl de stock	500µl BB	500ng
	2	40µl de 1	1000µl BB	20ng
	3	100µl de 2	700µl BB	2.5ng
	Témoin pos			

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

CENTRE DE RECHERCHE ENTOMOLOGIQUE DE COTONOU (CREC)

CONTROLE DE QUALITE DES MIILD : QUESTIONNAIRE

I- IDENTIFICATION

Nom enquêteur :.....

Date de l'enquête :...../...../.....

Département :.....

Commune/arrondissement :.....

Village/ Quartier :.....

Numéro du ménage.....

Responsable maison ou personne interrogée :.....

II- MOUSTIQUAIRES

1- Combien de personnes dorment dans cette case ? -----

Adultes -----

Enfants -----

2- Combien de moustiquaires aviez vous dans la case ?-----

(Demander à voir les moustiquaires)

3- Regarder le nombre de moustiquaires par catégorie

Olyset PNL ☐

Autres Olyset ☐

Permanet ☐

Autres ☐

4- Les moustiquaires sorties sont elles réellement en usage dans la case ?

Oui (suspendue) ☐

Non (non suspendue) ☐

Si non, c'est gardé où ?-----

5- Etat des moustiquaires

Propre ☐

Sale ☐

6- Moustiquaire est-elle trouée?

☐ OUI

☐ NON

(une seule réponse possible)

Si oui, Nombre de trous : Total taille¹ : _____ Total taille² : _____ Total taille³ : _____

¹. Impossible d'insérer le pouce dans le trou. ². Possible d'insérer le pouce dans le trou, pas le poing.

³. Possible d'insérer le poing dans le trou.

7- Combien de personnes ont dormi hier sous moustiquaires ?-----

SUMMARY

From 2008 to 2010, the Benin National Malaria Control Program (NMCP), supported by the President's Malaria Initiative (PMI), implemented Indoor Residual Spraying (IRS) for the first time in Ouémé department. This large scale campaign which prevented over 350, 000 people from mosquito bites proved highly successful with a 94% drastic drop of the Entomological Inoculation Rate (EIR). But, as the intervention was costly and burdensome, the NMCP chose to implement the IRS in an area where just a single round of it will be sufficient to protect the same number of people a year long. However, IRS withdrawal in Ouémé department was a source of public concern about the possible bounce of malaria transmission in this department in the future. Thus, the NMCP decided to replace the IRS by another control intervention, namely the Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs), which were distributed to all households to appease the population and thus study the impact of the full coverage in LLINs on malaria transmission. Actually, this study aimed to see if the use of LLINs could effectively replace IRS in case it is given up due to its high cost.

The study was carried out in the districts of Adjohoun, Dangbo, Missérété and Sèmè-Kpodji, previously under IRS, and Olyset nets were distributed to the population. The district of Adjara which did not receive any interventions was considered as the control. During IRS and after IRS withdrawal, mosquito collections were organized to follow the dynamics of malaria transmission and possible changes in the behavior of mosquitoes, the evolution of resistance mechanisms (*Kdr* and *Ace-1*) and vectors susceptibility to insecticides. Moreover, the coverage rate, usage rate and physical integrity of Olyset nets were performed through a survey in the four districts previously under IRS.

The results showed that during the third IRS campaign, a dramatic decrease of Entomological Inoculation Rate (EIR) was recorded. But after IRS withdrawal, despite an Olyset usage rate greater than 80%, this was not effective enough to reduce malaria transmission. As a matter of fact, the bite rate of *An. gambiae*, their blood feeding rate inside the houses and their longevity increased after replacing IRS by LLINs. Exophily after IRS withdrawal decreased significantly in all areas ($p < 0.001$) suggesting that mosquitoes were more likely to rest in houses with LLINs, than in houses subjected to IRS. In addition, the *An. gambiae* populations have maintained their resistance level to pyrethroids. However, throughout the study period *An. gambiae* remained susceptible to bendiocarb.

It appears from this study that the IRS and Long Lasting Insecticidal Nets are the two best vector control interventions currently available in Benin. But, due to the high resistance of vectors to pyrethroids, the performances of impregnated nets are below expectations.

Keywords: Malaria, IRS withdrawal, bendiocarb, LLINs, *An. gambiae*, EIR, longevity, resistance

RESUME

De 2008 à 2010, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a mis en œuvre, pour la première fois dans le département de l'Ouémé au Bénin, la Pulvérisation Intradomiciliaire d'Insecticide (PID) grâce à l'appui de PMI (President's Malaria Initiative). Cette campagne de lutte de grande envergure qui a protégé plus de 350 000 habitants contre les piqûres de moustiques a connu un grand succès avec une réduction drastique de 94% du Taux d'Inoculation Entomologique (TIE). Mais compte tenu du coût et de la lourdeur de l'opération, le PNLP a préféré transférer la PID dans une autre zone où un seul tour de PID suffit pour protéger le même nombre de personnes toute l'année. Toutefois, l'arrêt de la PID dans l'Ouémé a soulevé quelques inquiétudes dans la population relatives, à l'avenir, au rebond éventuel de la transmission du paludisme dans ce département. Pour calmer la population, le PNLP a décidé de remplacer la PID par une autre intervention de lutte, les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MIILD) qui ont été distribuées à tous les ménages et d'étudier l'impact de la couverture totale en moustiquaires sur la transmission du paludisme. L'étude a pour but de vérifier si l'utilisation des moustiquaires est une alternative efficace en cas d'arrêt ou d'abandon de la PID pour des problèmes de coût.

L'étude a été réalisée dans les communes de Adjohoun, Dangbo, Missérété et Sèmè Kpodji, précédemment sous PID. La commune de Adjara non traitée, a servi de témoin. Après l'arrêt de la PID, des moustiquaires Olyset ont été distribuées à la population. Pendant et après l'arrêt de la PID, des récoltes de moustiques ont été organisées dans les cinq communes pour suivre la dynamique de la transmission du paludisme et les changements éventuels de comportement des moustiques, l'évolution des mécanismes de résistance (*Kdr* et *Ace-1*) et de la sensibilité des vecteurs aux insecticides. Par ailleurs, une enquête portant sur le taux de couverture, le taux d'utilisation et l'intégrité physique des Olyset dans les quatre communes précédemment sous PID a été réalisée.

Les résultats ont montré que lors de la 3^{ème} campagne PID, une baisse spectaculaire du Taux d'Inoculation Entomologique (TIE) a été enregistrée. Mais, après l'arrêt de la PID, malgré un taux d'utilisation des Olyset supérieur à 80%, cela n'a pas suffi à maintenir la transmission à son niveau initial. En effet, après le remplacement de la PID par les moustiquaires imprégnées, le taux de piqûre des anophèles, leur taux de gorgement à l'intérieur des maisons et leur âge physiologique ont augmenté. L'exophilie des anophèles après l'arrêt de la PID a significativement baissé dans toutes les zones ($p < 0,001$) montrant que les maisons dont les murs sont traités au bendiocarb sont plus désagréables au repos des anophèles que celles qui contiennent les moustiquaires imprégnées. De plus, les populations de *An. gambiae* ont conservé leur niveau de résistance aux pyréthrinoïdes. En revanche, pendant toute la période d'étude, *An. gambiae* est demeuré sensible au bendiocarb.

Il ressort de cette étude que la PID et les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action sont les deux meilleures interventions de lutte antivectorielle disponibles à l'heure actuelle au Bénin. Mais, en raison de la forte résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes, les performances des moustiquaires imprégnées sont en deçà des attentes.

Mots clés: Paludisme, arrêt PID, bendiocarb, MIILD, *An. gambiae*, TIE, longévité, résistance.