



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: 80/ EDSV

Année académique : 2014-2015

Présentée par : **Rodrigue M. S. ANAGONOU**

pour obtenir le grade de

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

**Relation entre l'âge physiologique, le portage du gène de résistance *Kdr* et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* (Haemosporida, Plasmodiidae) chez *Anopheles gambiae s.s.* (Diptera, Culicidae) au Bénin, Afrique de l'Ouest**

**Soutenue publiquement devant le jury composé de :**

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

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

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

Sékou F. TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Bamako, Mali

Michel SEZONLIN, Maître de Conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Examineur :** Ousmane FAYE, Professeur Titulaire, Université Cheikh Anta Diop, Sénégal

**Date de soutenance :** 26 novembre 2015

**Mention :** Très honorable avec félicitations du jury

A mon père  
Assogba Firmin ANAGONOU,  
Sois heureux d’assister à la présentation de ce travail.

## **Remerciements**

Les travaux présentés dans ce document ont été menés au Ministère de la Santé, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), sous la direction du Professeur Martin AKOGBETO.

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant en grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur Martin AKOGBETO qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges pendant les six ans que j'ai passé avec lui. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Je lui exprime ma profonde gratitude qui témoigne de sa patience, son humilité et ses qualités humaines d'écoute. Merci encore pour m'avoir accompagné pour mes premiers pas dans le monde de la recherche et de m'avoir encouragé à m'acharner sur des expériences presque impossibles pendant mon stage de Master d'Entomologie Médicale et Vétérinaire, socle de la présente thèse.

Professeur Kabirou MOUTAÏROU, vos qualités scientifiques ne sont plus à démontrer. J'apprécie à sa juste valeur l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury. Vous êtes pour moi, un modèle à suivre.

Professeurs Ousmane FAYE et Sékou F. TRAORE, malgré vos nombreuses occupations, vous avez accepté d'effectuer le déplacement sur Cotonou. Recevez ici mes sincères remerciements pour avoir accepté d'être respectivement examinateur/rapporteur et rapporteur de cette thèse.

Professeur Michel SEZONLIN, je tiens à vous faire part de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur. Je vous remercie pour vos remarques et conseils constructifs qui m'ont aidé à améliorer la qualité de ce travail.

Ma profonde reconnaissance va d'une part à l'endroit de l'Etat béninois à travers le Ministère d'Etat en charge de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour m'avoir doté d'une allocation et d'un appui financier à la recherche, et d'autre part à l'endroit de la fondation Bill & Melinda GATES pour avoir assuré particulièrement mes déplacements dans la commune de Ifangni et mis à ma disposition tout le matériel et les réactifs nécessaires à la réalisation des travaux de cette thèse.

Nombreux sont ceux qui ont apporté leur contribution scientifique, voire leur secours au cours de ma thèse. Ce travail a bien sûr été facilité par la bonne ambiance qui règne au CREC. Je remercie l'ensemble du personnel du CREC, les conducteurs, la secrétaire, le chef-service administratif et financier, les techniciens de laboratoire, les chercheurs, les enseignants-chercheurs, les thésards et assimilés pour leur accueil, leur convivialité et leur aide.

Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille et proches, et en particulier à mes chers parents géniteurs qui m'ont fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes qu'on pourrait résoudre grâce à des formules mathématiques et des algorithmes. Ils ont toujours su dire le bon mot au bon moment et je ne les en remercierai jamais assez. Malgré mon éloignement depuis de nombreuses années, leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses ? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je vous aime.

Enfin, à mon épouse Tatiana, ma fille Snella et mon garçon Jures, votre présence à mes côtés est un bien précieux pour tout ce que j'entreprends dans ma vie. A toi Jures, j'ai bien souhaité que tu assistes à cette soutenance mais la nature en a décidé autrement où tu me faussais compagnie à quelques jours de cet événement. Saches que je te porte toujours présent dans mon cœur. Je n'ai pas assez de mots pour exprimer mes sentiments. Merci pour votre confiance et votre compréhension à supporter mes nombreuses absences et les conséquences des longues études.



# Tables de matières

<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des photos.....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>6</b>
 <b>Introduction générale.....</b>	 <b>7</b>
<b>Chapitre 1 : Paludisme, biologie et écologie du parasite et des anophèles vecteurs, moyens de lutte, résistance des vecteurs aux insecticides et détermination de l'âge physiologique des moustiques.....</b>	<b>13</b>
1. Notion de paludisme.....	14
2. Les agents pathogènes du paludisme.....	14
3. Le cycle du paludisme.....	14
4. Les vecteurs du paludisme.....	16
4.1. Le complexe <i>An. gambiae</i> .....	17
4.2. Le groupe <i>Funestus</i> .....	18
4.3. Le complexe <i>An. nili</i> .....	19
4.4. Autres vecteurs du paludisme.....	19
5. Biologie des anophèles.....	19
6. Lutte contre le paludisme.....	20
6.1. Lutte antilarvaire.....	21
6.1.1. Lutte physique ou mécanique.....	21
6.1.2. Lutte biologique .....	21
6.1.3. Larvicides chimiques.....	22
6.1.4. Biolarvicides.....	22
6.2. Lutte contre les anophèles adultes.....	22
6.2.1. Pulvérisation intradomiciliaire.....	23
6.2.2. Moustiquaires imprégnées d'insecticide.....	23
6.2.3. Autres méthodes de lutte contre les vecteurs adultes.....	24
7. Résistance des vecteurs aux insecticides.....	25
7.1. La résistance métabolique.....	26
7.2. La résistance par modification de cible.....	27

8. Détermination de l'âge physiologique des anophèles.....	28
8.1. L'appareil reproducteur des moustiques femelles.....	28
8.2. Méthodes de détermination de l'âge physiologique des anophèles.....	29
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....</b>	<b>32</b>
1. Fiabilité du comptage des dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez <i>Anopheles gambiae</i> s.s: l'injection d'huile dans les ovaires et la dilacération classique des ovaires.....	33
1.1. Présentation de la zone d'étude à Ifangni.....	33
1.2. Echantillonnage des larves d'anophèle.....	35
1.3. Elevage des larves à l'insectarium du CREC.....	35
1.4. Induction de ponte chez les femelles de <i>An. gambiae</i> s.s.....	36
1.5. Dissection des ovaires et détermination de l'âge physiologique des anophèles.....	37
1.6. Analyse statistique.....	39
2. Structure génétique liée au gène <i>Kdr</i> et l'infectivité au <i>Plasmodium falciparum</i> en fonction de l'âge physiologique chez <i>Anopheles gambiae</i> s.s.....	40
2.1. Présentation de la zone d'étude.....	40
2.2. Etude au laboratoire.....	43
2.3. Etude sur les moustiques de terrain.....	43
2.3.1. Echantillonnage des moustiques.....	43
2.3.1.1. Capture sur homme la nuit.....	43
2.3.1.2. Capture par piège-fenêtre suivie d'aspersion intradomiciliaire de bombe aérosol d'insecticide non rémanent.....	44
2.3.2. Identification des espèces culicidiennes.....	46
2.3.3. Dissection des ovaires et détermination de l'âge physiologique des femelles de <i>An. gambiae</i> s.l.....	46
2.3.4. Identification des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> , recherche de la mutation <i>Kdr</i> et recherche de l'antigène circumsporozoïtique du <i>Plasmodium falciparum</i> chez les femelles de <i>Anopheles gambiae</i> s.s.....	46
2.4. Analyse statistique.....	46
3. Comportement trophique des femelles multipares de <i>Anopheles gambiae</i> s.s. et dynamique de la transmission du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	48
3.1. Présentation de la zone d'étude.....	48
3.2. Collecte et traitement des moustiques.....	48
3.3. Analyse statistique.....	48

**Chapitre 3 : Fiabilité du comptage des dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez *Anopheles gambiae* s.s: l'injection d'huile dans les ovaires et la dilacération classique des ovaires.....50**

1. Contexte et justification.....	51
2. Résultats .....	53
2.1. Structure de l'âge physiologique des femelles de <i>Anopheles gambiae</i> s.s. élevées à l'insectarium.....	53
2.2. Structure des ovarioles chez les femelles nullipares et pares de <i>An. gambiae</i> s.s.....	59
2.3. Comparaison entre la méthode usuelle de Detinova et celle de Polovodova basée sur l'injection d'huile dans les ovaires pour la détermination de la parturité chez <i>An. gambiae</i> s.s.....	60
2.4. Comparaison entre la méthode usuelle de Detinova et celle de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires pour la détermination de la parturité chez <i>An. gambiae</i> s.s.....	61
2.5. Influence du stade de développement des ovaires sur la détermination de la parturité chez <i>An. gambiae</i> s.s. par les méthodes de Detinova et de Polovodova.....	62
2.6. Efficacité de la méthode de Polovodova basée sur la technique de dilacération classique des ovaires dans la détermination du nombre de pontes chez <i>An. gambiae</i> s.s.....	63
2.7. Efficacité de la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile dans la détermination du nombre de pontes chez <i>An. gambiae</i> s.s.....	64
2.8. Influence du développement des ovaires sur la détermination du nombre de pontes chez <i>An. gambiae</i> s.s. par les techniques de dilacération classique des ovaires et d'injection d'huile dans les ovaires.....	65
3. Discussion.....	67
4. Conclusions.....	69

**Chapitre 4 : Structure génétique liée au gène *Kdr* et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge physiologique chez *Anopheles gambiae* s.s..... 71**

1. Contexte et justification.....	72
2. Résultats .....	73
2.1. Diversité culicidienne dans les villages de Itassoumba et Abomey-Takplikpo.....	73
2.2. Comparaison des densités de <i>An. gambiae</i> s.s. collectées sur homme la nuit, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire.....	75
2.3. Etude de l'âge physiologique des femelles de <i>An. gambiae</i> s.s. en fonction des types d'échantillonnage de moustiques.....	75

2.4. Etude du coût génétique associé à la résistance sur la longévité des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> .....	77
2.5. Relation entre l'âge physiologique et le portage du gène <i>Kdr</i> chez les <i>An. gambiae s.s.</i> capturés à l'intérieur des habitations à Itassoumba et Abomey takplikpo.....	77
2.6. Relation entre l'âge physiologique et la fécondité des anophèles sensibles et résistants.....	78
2.7. Relation entre l'âge physiologique et l'infectivité au <i>P. falciparum</i> des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> à Itassoumba et Abomey-Takplikpo.....	79
3. Discussion.....	81
4. Conclusions.....	84
<b>Chapitre 5 : Comportement trophique des femelles multipares de <i>Anopheles gambiae s.s.</i> et dynamique de la transmission du <i>Plasmodium falciparum</i></b> .....	85
1. Contexte et justification.....	86
2. Résultats.....	86
2.1. Comportement trophique et cycle d'agressivité des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Itassoumba.....	86
2.2. Comportement trophique et cycle d'agressivité des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Abomey-Takplikpo.....	87
2.3. Rythme d'activité en fonction de l'âge physiologique des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> à Itassoumba et à Abomey-Takplikpo.....	89
2.4. Distribution horaire des <i>An. gambiae s.s.</i> infectés au <i>P. falciparum</i> à Itassoumba et Abomey-Takplikpo.....	91
2.5. Corrélation entre l'agressivité des femelles multipares de <i>An. gambiae s.s.</i> et la transmission du <i>P. falciparum</i> à Itassoumba et Abomey-Takplikpo.....	91
3. Discussion.....	93
4. Conclusions.....	95
<b>Chapitre 6 : Discussion générale</b> .....	97
1. La méthode de Polovodova basée sur le comptage des dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	98
2. L'âge physiologique et le portage du gène de résistance <i>Kdr</i> chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	99
3. L'âge physiologique et l'infectivité au <i>Plasmodium falciparum</i> chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	100
4. L'agressivité des femelles multipares de <i>An. gambiae s.s.</i> et la transmission du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	101

<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>103</b>
<b>Références.....</b>	<b>106</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>132</b>

## Liste des sigles et abréviations

*Ace-I* : Acetylcholinesterase

*An* : *Anopheles*

CREC : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

Cs+ : Positivité en protéine circum sporozoïtique

CSP : Circum Sporozoïtic Protein

CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

DO : Dilacération des ovaires

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

IC : Intervalle de Confiance

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

*Kdr* : Knock-down resistant

Kis : Kisumu

MILD : Moustiquaire Imprégnée d'insecticide à Longue Durée

MS : Ministère de la Santé

NaOCl : Hypochlorite de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odd Ratio

P : p-value

PCR : Polymerase Chain Reaction

P/h/h : Piqûre par homme par heure

PID : Pulvérisation Intradomiciliaire

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

Rdl : Resistance dieldrin

RR : Homozygote résistant/ Rate ratio

RS : Hétérozygote sensible et résistant

SS : Homozygote sensible

TDO : Technique de dilacération classique des ovaires

TI : Technique d'injection d'huile

TIE : Taux d'Inoculation Entomologique

TIH : Technique d'injection d'huile dans les ovaires

WHO : World Health Organization

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> .....	16
<b>Figure 2</b> : Cycle biologique des anophèles.....	20
<b>Figure 3a</b> : Appareil reproducteur d'une femelle de moustique.....	29
<b>Figure 3b</b> : Structure d'un ovariole.....	29
<b>Figure 4a</b> : Aspect des trachéoles ovariennes d'un moustique nullipare.....	30
<b>Figure 4b</b> : Aspect des trachéoles ovariennes d'un moustique pare.....	30
<b>Figure 5a</b> : Ovariole unipare.....	31
<b>Figure 5b</b> : Ovariole bipare.....	31
<b>Figure 5c</b> : Ovariole tripare.....	31
<b>Figure 6</b> : Carte du département du Plateau montrant le village de Itassoumba où l'étude a été basée à Ifangni au Sud- Est du Bénin.....	34
<b>Figure 7</b> : Catre montrant les villages de Itassoumba (commune de Ifangni) et Abomey takplikpo (commune de Adjarra) au Sud-Est du Bénin.....	42
<b>Figure 8</b> : Cycle d'agressivité des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> capturées sur homme à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Itassoumba.....	87
<b>Figure 19</b> : Cycle d'agressivité des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> capturées sur homme à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Abomey-Takplikpo.....	88
<b>Figure 10</b> : Evolution de l'infectivité en fonction de l'agressivité des femelles multipares de <i>An. gambiae s.s.</i> à Itassoumba.....	92
<b>Figure 11</b> : Evolution de l'infectivité en fonction de l'agressivité des femelles multipares de <i>An. gambiae s.s.</i> à Abomey-Takplikpo.....	92



## Liste des photos

<b>Photo 1</b> : Récolte des larves d'anophèle.....	35
<b>Photo 2</b> : Elevage des larves d'anophèle au CREC.....	36
<b>Photo 3a</b> : Gorgement des moustiques.....	37
<b>Photo 3b</b> : Mise en ponte individuelle.....	37
<b>Photo 4a</b> : Dissection des ovaires.....	39
<b>Photo 4b</b> : Ovaires après injection d'huile de paraffine.....	39
<b>Photo 5</b> : Capture de moustiques sur homme la nuit avec des tubes à hémolyse.....	44
<b>Photo 6</b> : Capture de moustiques par piège-fenêtre.....	45
<b>Photo 7</b> : Ramassage de moustiques après aspersion intradomiciliaire.....	45
<b>Photo 8</b> : Ovariole dépourvu de dilatation.....	59
<b>Photo 9</b> : Ovariole à une dilatation.....	59
<b>Photo 10</b> : Ovariole à deux dilatations.....	60
<b>Photo 11</b> : Ovariole à trois dilatations.....	60

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Structure de l'âge physiologique des femelles de <i>Anopheles gambiae s.s.</i> élevées à l'insectarium .....	54
<b>Tableau II</b> : Fiabilité de la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile pour la détermination de la parturité chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	61
<b>Tableau III</b> : Fiabilité de la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires pour la détermination de la parturité chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	62
<b>Tableau IV</b> : Relation entre le développement des ovaires et le pourcentage d'ovaires illisibles selon les méthodes de Detinova et de Polovodova.....	63
<b>Tableau V</b> : Efficacité de la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires dans la détermination du nombre de pontes chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	64
<b>Tableau VI</b> : Efficacité de la méthode de Polovodova par injection d'huile dans les ovaires pour la détermination du nombre de pontes chez <i>An. gambiae s.s.</i> .....	65
<b>Tableau VII</b> : Relation entre le développement des ovaires et le nombre de pontes non déterminées par la méthode de Polovodova à partir des techniques d'injection d'huile et de dilacération classique des ovaires.....	66
<b>Tableau VIII</b> : Diversité culicidienne dans les villages de Itassoumba et Abomey-Takplikpo, juillet 2011 à octobre 2014.....	74
<b>Tableau IX</b> : Comparaison des densités de <i>An. gambiae s.s.</i> collectées sur homme, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire.....	75
<b>Tableau X</b> : Comparaison de l'âge physiologique des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> capturées avec différents types d'échantillonnage à Itassoumba et Abomey-Takplikpo.....	76
<b>Tableau XI</b> : Distribution des anophèles souche Kisumu (Kis-SS) et la souche porteuse du gène de résistance (Kis-RR) suivant le nombre de pontes .....	77
<b>Tableau XII</b> : Répartition des moustiques sensibles et résistants suivant le degré de parturité à Abomey-Takplikpo et Itassoumba.....	78
<b>Tableau XIII</b> : Relation entre l'âge physiologique et la fécondité des anophèles Kis-SS et Kis-RR.....	79
<b>Tableau XIV</b> : Taux d'infectivité au <i>P. falciparum</i> en fonction de l'âge physiologique des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> à Abomey-Takplikpo et Itassoumba.....	80
<b>Tableau XV</b> : Rythme d'activité en fonction de l'âge physiologique des femelles de <i>An. gambiae s.s.</i> à Itassoumba et à Abomey-Takplikpo.....	90

<b>Tableau XVI</b> : Distribution horaire du taux d'infectivité au <i>P. falciparum</i> chez <i>An. gambiae</i> s.s. à Itassoumba et à Abomey-Takplikpo.....	91
--	----

## **Liste des annexes**

<b>Annexes 1</b> : Articles publiés.....	133
<b>Annexes 2</b> : Protocoles.....	164

# **Introduction générale**

De nombreux arthropodes sont vecteurs de maladies. Parmi ces arthropodes, les moustiques sont les plus redoutables, tant par leur abondance que par les maladies qu'ils transmettent. Ils sont vecteurs du paludisme, des filarioses lymphatiques et des arboviroses (Coosemans & Van Gompel, 1998). De toutes les grandes endémies tropicales, le paludisme est l'une des maladies dont les répercussions sur la mortalité infantile et l'économie sont les plus graves (WHO, 2014). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette affection continue à peser de façon considérable sur la santé et le développement économique des pays de l'Afrique au sud du Sahara (WHO, 2014). En 2013, sur le plan mondial, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 198 millions dont la grande majorité (82%) était dans la région de l'Afrique entraînant ainsi 584000 cas de décès dont 90% en Afrique (WHO, 2014). Durant cette même année, le nombre de cas de décès palustre a été estimé à 2288 au Bénin (WHO, 2014 ; MS, 2014).

En Afrique tropicale, la transmission du paludisme est assurée principalement par *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus* (Louise *et al.*, 2009 ; Djènontin *et al.*, 2010) qui sont des complexes d'espèces. Dans le complexe *Anopheles gambiae s.l.*, on distingue *Anopheles gambiae s.s.* et *Anopheles arabiensis* qui sont globalement responsables à eux seuls de 90% des cas de transmission du paludisme dans la zone intertropicale africaine (Carnevale & Robert, 1987). Au Bénin, *An. gambiae s.s.* est le vecteur majeur du paludisme (Akogbéto *et al.*, 2011). Le parasite responsable de la maladie est un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium* avec plusieurs espèces. *Plasmodium falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus virulente causant les formes mortelles de la pathologie (Burkot *et al.*, 1987).

La lutte antivectorielle représente le principal moyen mis en œuvre pour le contrôle de la transmission du paludisme. La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide (PID) et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILD) sont en ce moment les deux principales méthodes de lutte contre les vecteurs (WHO, 2013). Il est à remarquer malheureusement que la performance des traitements insecticides dans la lutte contre les vecteurs du paludisme est confrontée à un sérieux problème : la résistance des vecteurs aux insecticides. Cette résistance est une conséquence de l'utilisation intensive, anarchique et peu contrôlée des pesticides notamment les pyréthrianoïdes dans les zones de culture du coton et dans les périmètres maraîchers contre les ravageurs de culture (Akogbéto *et al.*, 2006; Yadouleton *et al.*, 2009, 2011). Cette apparition de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides a freiné la promotion des matériaux imprégnés (Ranson *et al.*, 2011) et par conséquent compromet l'espoir que les autorités sanitaires placent dans cette stratégie de protection des populations humaines contre le paludisme. La résistance des

vecteurs aux insecticides est principalement due à deux principaux phénomènes chez les anophèles : une mutation génétique de cible, la mutation *Kdr* (Martinez-Torres *et al.*, 1998) et une augmentation des processus enzymatiques de détoxification (oxydases, estérases, etc.) (Vulule *et al.*, 1999). La mutation conduit à la fois à la réduction de l'effet de choc « knockdown » et de l'effet létal des pyréthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires (Chandre *et al.*, 1999 ; Corbel *et al.*, 2004). En Afrique de l'Ouest, les travaux de Fanello *et al.* (2003) et de Weill *et al.* (2004) ont montré la présence de la mutation *Kdr* seulement chez la forme moléculaire S de *An. gambiae* s.s. Au Bénin et au Burkina Faso, la mutation a été détectée aussi bien chez la forme moléculaire S que chez la forme M de *An. gambiae* s.s. avec une fréquence allélique très élevée (Djogbénou *et al.*, 2008 ; Djènontin *et al.*, 2010 ; Dabiré *et al.*, 2008).

Pour évaluer l'efficacité des programmes de lutte antivectorielle, la longévité des vecteurs et leur infectivité au *P. falciparum* sont souvent les deux indicateurs les plus utilisés (Akogbeto *et al.*, 2011). L'infectivité dépend non seulement de la longévité des femelles d'anophèle, mais aussi des possibilités d'infection sur l'homme (Hamon, 1963). Malgré les moyens de protection utilisés, les vecteurs parviennent à se nourrir sur leur hôte et à prélever du sang infecté de *P. falciparum* au cours du repas sanguin (Boudin *et al.*, 1998). Dans une population, la proportion d'êtres humains porteurs de gamétocytes est souvent faible et il est rare que le premier repas soit infectant chez les anophèles (Hamon, 1963). Le risque d'infection des anophèles devrait donc être élevé avec le nombre de repas de sang et par conséquent avec le nombre de pontes (degré de parturité) (Beklemishev *et al.*, 1959).

Le comptage des dilatations présentes sur les ovarioles est la seule méthode qui permet d'évaluer le nombre de pontes chez les moustiques (Polovodova, 1949). A cet effet, Lewis (1958) individualise le maximum possible des ovarioles à partir de la technique de dilacération classique des ovaires. De même, l'utilisation de la technique d'injection d'huile (autre technique de la méthode de Polovodova) a été proposée par Hoc (1995) pour la détermination du nombre de pontes. La méthode de Polovodova n'a malheureusement pas connu un essor dans le monde scientifique. S'il est évident que la probabilité d'infectivité des moustiques augmente avec le nombre de pontes (Beklemishev *et al.*, 1959), il manque de démonstrations scientifiques dans le domaine. C'est pourquoi nous pensons que la relation entre le nombre de pontes et l'infectivité des vecteurs mérite d'être clarifiée. 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). Dans une autre étude plus récente (Gnanguenon *et al.*, 2013), il a été montré que les anophèles

porteurs du gène de résistance *Kdr*, en particulier les génotypes RR de cette unité fonctionnelle de l'ADN sont plus aptes à traverser les trous des moustiquaires imprégnées par rapport aux sensibles de génotype SS. Les anophèles sensibles sont plus exposés à l'action létale des matériaux imprégnés (Ossè *et al.*, 2012). Si la résistance a un impact sur les opérations de lutte antivectorielle alors les moustiques résistants devraient survivre plus longtemps et devraient être plus âgés que les moustiques sensibles dans les zones où la pression de sélection par les MILD ou la PID est forte. Dans ce contexte, la fréquence des génotypes résistants (RR) du gène *Kdr* devrait être plus élevée chez les anophèles les plus âgés comparativement aux individus sensibles (SS). Il existe à ce jour très peu d'études scientifiques ayant porté sur ces cas de sélection de certains génotypes suite à l'utilisation des insecticides. Cela justifie le manque de données fiables dans ce domaine. La méthode de Detinova (1945) couramment utilisée pour la détermination de l'âge physiologique des vecteurs ne pouvait pas permettre d'aborder le problème. Il apparaît alors impérieux d'étudier la relation entre le nombre de pontes et les fréquences génotypiques possibles du gène de résistance *Kdr* chez les vecteurs. Ces raisons justifient la présente thématique intitulée « Relation entre l'âge physiologique, le portage du gène de résistance *Kdr* et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* (Haemosporida, Plasmodiidae) chez *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera, Culicidae) au Bénin, Afrique de l'Ouest ».

Cinq hypothèses justifient ce travail :

- i) Le comptage des dilatations présentes sur les ovarioles est une méthode fiable pour la détermination de l'âge physiologique chez *An. gambiae* s.s.,
- ii) La fréquence du génotype RR est plus élevée chez les femelles les plus âgées de *An. gambiae* s.s. comparativement aux autres génotypes,
- iii) Les femelles les plus âgées de *An. gambiae* s.s. sont les plus positives à la protéine circumsporozoïtique de *P. falciparum*,
- iv) La transmission du *P. falciparum* varie avec le comportement trophique des femelles multipares de *An. gambiae* s.s.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la structure génotypique du gène de résistance *Kdr* chez les femelles de *An. gambiae s.s.* et leur infectivité au *P. falciparum* en fonction de l'âge physiologique.

Il s'agit plus spécifiquement de :

- i) Etudier la fiabilité du comptage des dilatations folliculaires pour la détermination de l'âge physiologique chez *An. gambiae s.s.*,
- ii) Etablir la relation entre l'âge physiologique et la structure génotypique du gène de résistance *Kdr* chez les femelles de *An. gambiae s.s.*,
- iii) Etablir la relation entre l'âge physiologique et l'infectivité au *P. falciparum* chez les femelles de *An. gambiae s.s.*,
- iv) Etudier le comportement trophique en fonction de l'âge physiologique et la corrélation entre l'agressivité et la distribution de l'infectivité au *P. falciparum* chez les femelles multipares de *An. gambiae s.s.*

Les travaux de cette thèse ont été réalisés en six chapitres. La chronologie des différents chapitres est basée sur l'évolution des idées dans un esprit d'enchaînement progressif 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 enrichi le thème choisi d'une revue de littérature (chapitre 1) en abordant un certain nombre d'aspects en rapport avec le sujet : la notion du paludisme, les agents pathogènes (parasites) responsables du paludisme, le cycle du paludisme, les vecteurs du paludisme, la biologie des vecteurs, les moyens de lutte contre les vecteurs, la résistance des vecteurs aux insecticides et la détermination de l'âge physiologique des vecteurs.

Le chapitre 2 regroupe l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés au cours de la thèse, les différentes méthodes 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.

Dans le troisième chapitre, nous avons conduit des recherches entomologiques au cours desquelles nous avons étudié la fiabilité de la méthode de Polovodova (comptage des dilatations folliculaires) pour la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.* Les



deux techniques (l'injection d'huile dans les ovaires et la dilacération classique des ovaires) à partir desquelles nous avons appliqué la méthode de Polovodova nous ont permis de voir dans quelle mesure les dilatations folliculaires peuvent être utilisées pour la reconnaissance des moustiques nullipares et pares.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude de la structure génotypique du gène de résistance *Kdr* en fonction du nombre de pontes des femelles de *An. gambiae* s.s. d'une part, et l'évolution de leur infectivité au *P. falciparum* en fonction du nombre de pontes d'autre part.

Ensuite, dans le cinquième chapitre, nous avons établi la corrélation entre le comportement trophiques des vecteurs multipares (épidémiologiquement dangereux) et la transmission du *P. falciparum*. Cela nous a permis d'apprécier l'impact du rythme d'agressivité des vecteurs multipares sur la transmission du paludisme à l'homme. L'étude de la distribution horaire des moustiques infectés nous a permis de déterminer la période pendant laquelle la majorité des infections palustres sont transmises à l'homme la nuit.

Enfin, après le sixième chapitre où les différents résultats obtenus sont discutés dans leur ensemble, nous avons présenté une conclusion générale suivie des perspectives de recherche concernant la mise en œuvre et l'évaluation approfondie de l'efficacité des moyens de lutte antivectorielle en Afrique.

## **Chapitre 1 :**

---

**Paludisme, biologie et écologie du parasite et des anophèles vecteurs, moyens de lutte, résistance des vecteurs aux insecticides et détermination de l'âge physiologique des anophèles**

## **1. Notion de paludisme**

Le paludisme (du latin *palus*, *paludis*, marais) ou malaria (de l'italien *mal'aria*, mauvais air) est une vieille maladie signalée dans les écrits les plus anciens. Il était considéré comme le fléau des terres humides et des régions à l'air vicié. 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). La transmission de l'agent pathogène par les femelles d'anophèle a été découverte plus tard en 1898 par Ronald Ross (Mouchet *et al.*, 2004).

Le paludisme humain est une maladie parasitaire faisant intervenir trois protagonistes: (1) l'homme (en tant qu'hôte) est infecté par (2) un protozoaire du genre *Plasmodium* qui lui est transmis par (3) un moustique vecteur. Il se manifeste chez l'homme par l'apparition brutale de fièvres, de tremblements intermittents, d'arthralgies, de nausées, de vomissements et d'anémie (due à l'hémolyse) ou d'hémoglobinurie. Dans les cas graves, il peut provoquer des splénomégalias, céphalées sévères, ischémies cérébrales, hépatomégalie ou encore des hypoglycémies. Les manifestations cliniques typiques du paludisme sont l'alternance de frissons, chaleurs et sueurs qui surviennent de façon chronique tous les trois jours. Les sujets les plus vulnérables de la maladie sont les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes dont le système immunitaire est faible (WHO, 2000).

## **2. Les agents pathogènes du paludisme**

Cinq espèces du genre *Plasmodium* parasitent l'homme. Elles sont réparties en deux sous-genres. Le sous-genre *Plasmodium* comporte les espèces *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* tandis que celui *Laverania* contient l'espèce *P. falciparum*. A l'exception de *P. knowlesi*, toutes les autres espèces existent sur le continent africain (Antinori *et al.*, 2012). *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus rencontrée en Afrique. Le paludisme lié à cette espèce est le plus grave et souvent mortel (Sherman *et al.*, 2003, WHO, 2011). Ce parasite est responsable de plus de 50% des cas de paludisme (WHO, 2011).

## **3. Le cycle du paludisme**

Le cycle du paludisme repose sur celui du *Plasmodium* (figure 1). Le cycle parasitaire se révèle excessivement complexe et multiple. Une phase sexuée du cycle est observée chez le moustique vecteur (hôte définitif) tandis que chez l'homme (hôte intermédiaire) nous observons la phase asexuée qui se trouve d'abord être pré-érythrocytaire (intra-hépatique)

puis érythrocytaire (Doerig *et al.*, 2009). Cette complexité explique les difficultés rencontrées dans l'élaboration et le choix de molécules potentiellement vaccinales et thérapeutiques.

- **Cycle sexué chez le moustique vecteur : sporogonie**

Un repas sanguin sur un hôte humain infecté est nécessaire au moustique vecteur pour ingérer le parasite sous forme de gamétocytes mâles et femelles (figure 1). Le moustique se révèle alors infecté et le cycle sexué de reproduction du parasite peut commencer. Une fois présents dans l'estomac de l'insecte, les gamétocytes se transforment en gamètes qui, à partir des zygotes mobiles (ookinètes) obtenus après fécondation, aboutissent à la formation d'oocystes dans la paroi de l'estomac (Dimopoulos, 2003). A l'intérieur de l'oocyste, le noyau se divise à répétition afin de libérer dans la cavité générale du corps du moustique, 4 à 15 jours après le repas sanguin, plusieurs milliers de sporozoïtes qui iront coloniser les glandes salivaires du moustique. C'est à partir de ce moment que le moustique devient infectieux pour l'homme (Mouchet *et al.*, 2004). Tout nouveau repas sanguin de cet instant sera accompagné d'une libération des sporozoïtes chez l'hôte humain causée par les sécrétions salivaires qui y seront liées.

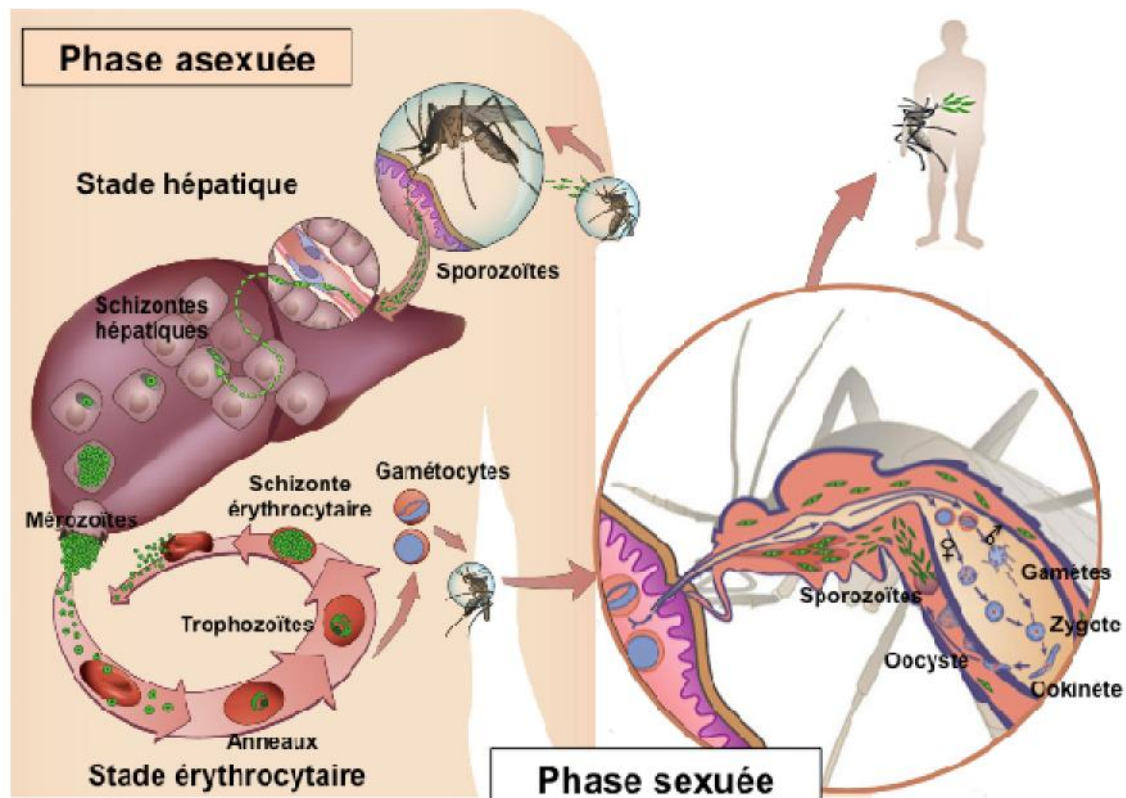
- **Cycle asexué chez l'homme : schizogonie**

A la suite d'une piqûre infectante, les sporozoïtes qui ont été injectés dans les capillaires cutanés atteignent rapidement le foie de l'homme (Beier, 1998) (figure 1). Pendant ce laps de temps, ils sont vulnérables aux effecteurs du système immunitaire et aux cellules phagocytaires. Seuls les sporozoïtes ayant réussi à pénétrer dans les hépatocytes pourront continuer leur maturation/réplication. Le parasite se trouve alors être dans une phase de réplication intra-hépatique (stade pré-érythrocytaire ou hépatique de la phase asexuée). Celle-ci est totalement asymptomatique. Elle dure six à quinze jours et se termine par l'éclatement des hépatocytes infectés permettant la libération d'un grand nombre de mérozoïtes dans la circulation sanguine. *Plasmodium falciparum* présente une spécificité importante lors de cette phase : il ne présente pas de persistance hépatiques appelées hypnozoïtes. Cette caractéristique explique entre autre que les rechutes pouvant être observées avec *P. vivax* et *P. ovale* ne soient pas observées dans les cas de *P. falciparum* (Nassir *et al.*, 2005).

Libérés dans le sang, les mérozoïtes envahissent des globules rouges et le cycle de réplication érythrocytaire (stade érythrocytaire de la phase asexuée) peut ainsi commencer. C'est un processus cyclique allant de l'invasion d'un globule rouge à son éclatement en permettant ainsi la libération d'une trentaine de nouveaux mérozoïtes qui pourront coloniser d'autres globules rouges. Au cours ce cycle qui dure 48 heures pour *P. falciparum*, le parasite initialement présent sous la forme d'un mérozoïte libre passe après invasion par différentes

phases : anneau, trophozoïte, schizonte et rosace. La rosace est le stade de maturation ultime qui correspond à un schizonte en instance d'éclater pour libérer de nouveaux mérozoïtes. L'éclatement des globules rouges, provoquant l'anémie, est à l'origine des nombreux symptômes cliniques du paludisme. Les formes asexuées du cycle érythrocytaire sont donc responsables de la morbidité et de la mortalité palustre (Nassir *et al.*, 2005).

Pour alimenter le cycle hôte-vecteur, certains anneaux vont se différencier en gamétocytes mâles et femelles. Ces formes non pathogènes pour l'homme circuleront dans le sang jusqu'à plusieurs semaines après la fin de l'infection. Ces gamètes pourront être ingérés par un vecteur compétent lors d'un repas sanguin ultérieur infectant alors le vecteur et permettant ainsi la propagation de la maladie.



**Figure 1 :** Cycle de développement du *Plasmodium* (Rapports EMBO, 2010 -2011).

#### 4. Les vecteurs du paludisme

Les moustiques (Diptera, Culicidae) capables de transmettre les *Plasmodia* sont tous du genre *Anopheles*. Selon Harbach (2004) et Mouchet *et al.* (2004), le genre *Anopheles* comprend 484 espèces sur la planète dont une soixantaine est vectrice de *Plasmodium*. En Afrique subsaharienne, il y a environ 150 espèces d'anophèles dont une trentaine est vectrice de

*Plasmodium*. La classification taxinomique des anophèles, basée d'abord sur des critères morphologiques puis complétée d'observations étho-écologiques, biogéographiques et de données génétiques, décrit des complexes et des groupes d'espèces. Les espèces appartenant à un même groupe sont très proches morphologiquement et présentent des différences à au moins un stade de leur développement tandis que les espèces appartenant à un même complexe sont morphologiquement identiques à tous les stades de leur développement. En Afrique sub-saharienne, les principales espèces vectrices se répartissent en 3 groupes ou complexes.

#### **4.1. Le complexe *An. gambiae***

Le complexe *An. gambiae* compte sept espèces. Il s'agit de *Anopheles gambiae s.s.*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles melas*, *Anopheles merus*, *Anopheles bwambae*, *Anopheles quadriannulatus A* et *Anopheles quadriannulatus B* (Djogbénou, 2009). En plus de ces spécimens, *Anopheles comorensis* a été décrit et nommé par Brunhes *et al.* (1997) sur la base de la morphologie d'un seul spécimen des îles de l'océan Indien des Comores dans le canal Mozambique. Par manque de confirmation génétique adéquate, le statut spécifique de *An. comorensis* et son association au complexe *An. gambiae* restent discutables (Coetzee *et al.*, 2013). *Anopheles gambiae s.s.* et *An. arabiensis* sont des vecteurs majeurs de paludisme à larges aires de répartition (Djogbénou, 2009). *Anopheles arabiensis* est présent dans toute la zone afro-tropicale sauf les zones de forêts. Il est parfaitement adapté au climat sec du Sahel et est réputé plus zoophile que *An. gambiae s.s.* considéré lui comme très anthropophile (Brunhes *et al.* (1997). *Anopheles gambiae s.s.* est généralement présent dans toute la zone afro-tropicale exceptées la corne de l'Afrique et les zones les plus sèches (< 500 mm de précipitations).

Au niveau infra-spécifique, cinq formes chromosomiques de *An. gambiae s.s.* ont été décrites sur la base de critères cytogénétiques (polymorphisme d'une inversion paracentrique sur le chromosome 2) : Bamako, Savane, Forêt, Mopti et Bissau (Coluzzi *et al.*, 1985 ; Coluzzi *et al.*, 2002). Ces variations non-aléatoires des inversions sur le chromosome 2 correspondent à des zones géographiques et à des caractéristiques des gîtes larvaires. Elles constituent des indicateurs d'adaptation à différents habitats.

En 2001, Della-Torre *et al.* (2001) ont décrit deux formes moléculaires (M et S) chez *An. gambiae s.s.* dont la correspondance avec les formes chromosomiques varie en fonction de l'espace géographique et écologique. En raison d'un isolement reproductif entre les deux formes (c'est-à-dire avec de rares hybrides, peu viables) et du flux de gènes apparemment très

restreints entre elles même en zone de sympatrie, il est admis que les divergences observées entre celles-ci correspondent à un début de spéciation. Les préférences écologiques de ces deux formes moléculaires divergent fortement (Costantini *et al.* 2009 ; Gimonneau *et al.* 2011, Simard *et al.*, 2009). La forme S est plus fréquemment observée dans les zones plus sèches, en milieux ouverts qui favorisent les gîtes larvaires temporaires avec peu de prédateurs. La forme M est caractérisée par un développement larvaire plus long (Diabaté *et al.*, 2008 ; Diabaté *et al.*, 2005) et moins sensible à la prédation (Gimonneau *et al.*, 2010 ; Gimonneau *et al.*, 2012). Elle préfère les milieux aquatiques permanents ou semi-permanents. D'après les travaux de Coetzee *et al.*, (2013), la forme moléculaire M de *An. gambiae s.s.* largement répartie en Afrique de l'Ouest devient *Anopheles coluzzii*. De même, la forme moléculaire S devient *Anopheles gambiae* (Coetzee *et al.*, 2013).

Au sein du complexe *An. gambiae*, deux autres espèces sont vectrices de *Plasmodium*, *An. melas* et *An. merus*. Elles sont caractérisées par leurs gîtes larvaires en eaux saumâtres. *Anopheles bwambae* est un bon vecteur mais d'importance très localisée. Il est observé uniquement dans la forêt de Semkili en Ouganda (Carnevale *et al.*, 2009 ; White, 1985). Les autres espèces du complexe sont considérées comme de faible importance médicale puisque *An. quadriannulatus* A et B sont principalement zoophiles (Fettene *et al.*, 2004 ; Prior & Torr, 2002) et leur rôle en tant que vecteur n'a pas été montré.

#### **4.2. Le groupe *Funestus***

Le groupe *Funestus* contient dix espèces (*Anopheles funestus s.s.*, *Anopheles rivulorum*, *Anopheles parensis*, *Anopheles vaneedeni*, *Anopheles lesoni*, *Anopheles fuscivenosus*, *Anopheles aruni*, *Anopheles brucei*, *Anopheles rivulorum-like* et *Anopheles confusus*) vectrices ou potentiellement vectrices en Afrique. Elles sont réparties dans 3 sous-groupes (*Funestus*, *Rivulorum* et *Minimus*) (Gillies & Coetzee, 1987). Au sein du groupe, *An. funestus s.s.* est la principale espèce vectrice du paludisme en Afrique (Mouchet *et al.*, 2004). Elle est présente dans presque toute la zone intertropicale et est extrêmement anthropophile, à la différence des autres membres du groupe qui sont le plus souvent zoophiles et donc de moindre importance médicale (Coetzee & Fontenille, 2004). Un important polymorphisme génétique a été observé au Sénégal et au Burkina Faso où deux formes chromosomiques ont été identifiées : Folonzo et Kiribina (Costantini *et al.*, 1999 ; Dia *et al.*, 2000). La forme Folonzo semble être favorisée dans les zones présentant des réservoirs avec une végétation aquatique naturelle tandis que la forme Kiribina est plus souvent capturée dans les zones

rizicoles. D'une manière générale, le développement larvaire de *An. funestus s.s.* est inféodé aux milieux aquatiques permanents et semi-permanents (Hamon, 1955).

#### **4.3. Le complexe *Anopheles nili***

*Anopheles nili s.l.* est répandu dans toute l'Afrique tropicale, à travers les savanes humides et limité par les régions sèches où les cours d'eau sont temporaires (Gillies & De Meillon, 1968). Il est présent jusqu'à 1000 m d'altitude (Vermyn, 1967). Le complexe *An. nili* renferme *Anopheles nili s.s.*, *Anopheles carnevali*, *Anopheles ovengensis* et *Anopheles somalicus*.

#### **4.4. Autres vecteurs du paludisme**

*Anopheles moucheti* est un vecteur inféodé aux bordures herbacées des cours d'eau lents de l'Afrique centrale, particulièrement au Cameroun (Mouchet & Gariou, 1966 ; Njan Nloga *et al.*, 1993). *Anopheles pharoensis* fût un vecteur important de paludisme en Egypte (Morsy *et al.*, 1995). Il a été retrouvé infecté par recherche de protéine circumsporozoïtique au Sénégal et au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 ; Carrara *et al.*, 1990 ; Dia *et al.*, 2008). La forme Soudano-sahélienne de *Anopheles pharoensis* dont l'aire de répartition s'étend de la côte Atlantique à la vallée du Nil et au Moyen-Orient présente un comportement de piqure assez opportuniste en termes de préférence trophique. La forme de l'espèce présente en Afrique de l'Est et du Sud est quant à elle très zoophile (Mouchet *et al.*, 2004).

### **5. Biologie des anophèles**

Les anophèles sont des insectes diptères, holométaboles qui présentent quatre stades au cours de leur vie. Les trois premiers stades, dit pré-imaginaux, comprennent les œufs, larves et nymphes et sont aquatiques. Le dernier stade encore appelé adulte ou imago est aérien (figure 2).

- **Phase aquatique**

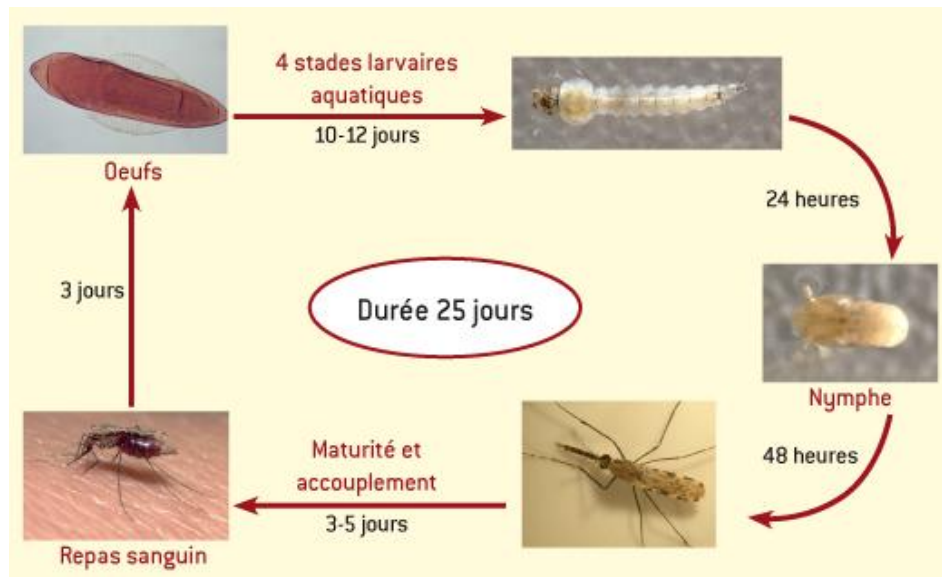
La femelle d'anophèle pond à la surface de l'eau après la prise d'un repas de sang. Ces œufs sont munis de flotteurs qui les maintiennent à la surface de l'eau. L'éclosion se produit au bout de 24 à 48 heures selon la température (Mouchet *et al.*, 2004) : les larves de stade 1 apparaissent. Elles se nourrissent de matières organiques et de micro-organismes pour atteindre des larves de stades 2, 3 et 4 après avoir subi plusieurs mues successives. La larve de stade 4 subit une nymphose. La nymphe encore appelée pupe qui en résulte ne se nourrit pas. La respiration des larves est assurée par des stigmates respiratoires tandis que celle des



nymphes se fait à partir des siphons respiratoires. La durée de la phase aquatique dépend des espèces et de la température du gîte larvaire. Celle de *An. gambiae* est en moyenne de 7 à 10 jours (Robert & Carnevale, 1984) tandis que celle de *An. funestus* est relativement longue, variant de 20 à 30 jours (Hamon, 1955).

- **Phase aérienne**

Dès son émergence, l'adulte se repose sur un support émergé durant 24 à 48 heures pendant que sa cuticule durcit, que ses ailes se déploient et que l'appareil génital subit une hémirrotation de 180° le rendant fonctionnel (Mouchet *et al.*, 2004). L'accouplement se fait pendant le vol et elle n'a lieu qu'une fois dans la vie de l'anophèle. Après l'accouplement, les femelles d'anophèle stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque jusqu'à leur mort. L'activité de reproduction est accompagnée de la recherche successive d'un repas sanguin, d'un site de repos et d'un site d'oviposition (Detinova, 1963). Le repas de sang est nécessaire à la maturation des follicules ovariens qui pourront alors être fécondés au moment de la ponte par les spermatozoïdes stockés. La fécondation a lieu dans le tractus génital de la femelle suite au passage des ovarioles (follicules) mûres dans l'oviducte. Après la ponte, la femelle cherche à prendre un nouveau repas sanguin afin d'effectuer une nouvelle oviposition : c'est le cycle gonotrophique ou trophogonique (Beklemishev, 1940).



**Figure 2 :** Cycle biologique des anophèles (Mouchet *et al.*, 2004)

## 6. Lutte contre le paludisme

La lutte antipaludique repose sur une approche intégrée comprenant la prévention axée sur la lutte antivectorielle et le traitement curatif et prophylactique par des médicaments. La lutte basée sur l'utilisation des médicaments antipaludiques n'est pas développée dans cette thèse

d'entomologie. Toutefois, la chloroquine, peu coûteuse et pendant longtemps le médicament antipaludique par excellence, est désormais inefficace dans la plupart des cas de paludisme à *P. falciparum*. Pour ce dernier, d'autres alternatives thérapeutiques doivent être envisagées aujourd'hui. Les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) fournissent une nouvelle classe d'antipaludiques très efficaces. Par ailleurs, la lutte antivectorielle est menée sur les stades pré-imaginaux et imagos.

### **6.1. Lutte antilarvaire**

La lutte antilarvaire peut prendre plusieurs formes : la lutte physique ou mécanique qui vise à détruire les gîtes larvaires réels ou potentiels des anophèles, la lutte biologique basée sur l'utilisation d'espèces prédatrices qui vise à réduire la productivité des gîtes larvaires et la lutte antilarvaire basée sur des larvicides chimiques ou des biolarvicides.

#### **6.1.1. La lutte physique ou mécanique**

Parmi les méthodes physiques, on peut citer l'ensemble des aménagements de l'environnement tels que le drainage, l'écoulement des eaux, le remblayage des trous et l'intervention sur les rives des cours d'eau et des lacs pour les rendre impropres au développement de l'anophèle. Ces méthodes d'aménagement de l'environnement ont fait l'objet de guides édités par l'OMS dans le cadre du "Panel of expert on Environmental Management for vector control" (Birley 1991 ; Phillips *et al.*, 1993 ; Tiffen, 1991). Keiser *et al.* (2005) ont établi une revue des évaluations épidémiologiques de la gestion environnementale dans le monde et ont conclu à leur grande efficacité pour réduire la mortalité due au paludisme.

#### **6.1.2. La lutte biologique**

La seule méthode biologique de lutte antilarvaire impliquant des prédateurs et ayant réellement prouvé son efficacité est l'utilisation de poissons larvivores. Au nombre de ces poissons qui se nourrissent des larves de culicidés, nous pouvons citer *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae), *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae), *Oreochromus spilurus* (Perciformes, Cichlidae). Ils sont introduits dans les gîtes larvaires en concentrations variables. L'utilisation de ces poissons a localement permis la réduction des densités de nombreuses populations d'anophèles (Das & Prasad, 1991 ; Ghosh *et al.*, 2005 ; Mohamed, 2003 ; Prasad *et al.*, 1993 ; Sabatinelli *et al.*, 1991; Sitaraman *et al.*, 1975). Cependant, cette méthode est soumise à une bonne connaissance des gîtes (nombre, localisation, adaptation des poissons). L'utilisation des poissons larvivores est très limitée

dans les gîtes temporaires qui nécessitent des réensemencements réguliers (Carnevale *et al.*, 2009).

### **6.1.3. Larvicides chimiques**

Des larvicides chimiques sont depuis longtemps utilisés en lutte antivectorielle (Gorgas, 1910). Ils doivent être épandus dans les gîtes larvaires. Les produits actuellement recommandés sont des insecticides organophosphorés (Chlorpyrifos, Fenthion, Temephos, Pirimiphos-méthyl) et des régulateurs de croissance qui sont les juvénoïdes et les ecdysoïdes (WHO, 2006). Les ecdysoïdes (Diflubenzuron, Triflumuron) inhibent la synthèse de la chitine au moment des mues larvaires bloquant ainsi la sclérification de la cuticule après les mues alors que les juvénoïdes (Méthoprène, Pyriproxifène) inhibent la nymphose. Par conséquent, la nymphe meurt sans donner l'adulte (Darriet *et al.*, 1987).

### **6.1.4. Biolarvicides**

Deux bactéries entomopathogènes 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 des diptères. Les biolarvicides ont été largement utilisés pour lutter contre *An. stephensi* en Asie (Ohba *et al.*, 1995; Pal & Tandon, 2001; Saitoh *et al.*, 1998) et ont permis, par exemple, des réductions importantes des densités de vecteurs et/ou de l'incidence palustre au Kenya (Fillinger & Lindsay, 2006 ; Fillinger *et al.* 2009), en zones urbaines au Bénin (Kinde-Gazard & Baglo, 2012) et en Tanzanie (Fillinger *et al.*, 2008; Geissbuhler *et al.*, 2009).

## **6.2. Lutte contre les anophèles adultes**

Les méthodes de lutte antivectorielle les plus largement applicables contre les anophèles adultes sont la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide (OMS, 2014). Les organochlorés (utilisés depuis les années 40), les organophosphorés (depuis les années 40), les carbamates (depuis les années 50) et les pyréthrinoïdes de synthèse (depuis les années 70) sont les quatre insecticides utilisés pour la pulvérisation intradomiciliaire. Cependant, seuls les pyréthrinoïdes sont autorisés pour l'imprégnation des moustiquaires (WHO, 2006 ; WHO, 2012). Ces insecticides sont des neurotoxiques. Ils agissent sur le système nerveux central des arthropodes. Les pyréthrinoïdes de synthèse et les organochlorés tuent les insectes en bloquant le fonctionnement des canaux sodium nécessaires à la transmission de l'influx nerveux. Le canal sodium voltage dépendant

est la cible des pyréthrinoïdes et du DDT. La fixation de l'insecticide sur le canal entraîne son ouverture et une hyperexcitation neuronale. Cela se traduit par la paralysie de l'insecte (effet knock-down) qui peut conduire à sa mort. Les organophosphorés et les carbamates sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, une enzyme chargée de dégrader l'acétylcholine qui est un neurotransmetteur du système nerveux central et périphérique. L'accumulation d'acétylcholine dans les synapses empêche la transmission de l'influx nerveux et provoque la mort de l'insecte (Djogbenou, 2009). En raison de leur faible toxicité pour les mammifères et de leur biodégradabilité, les pyréthrinoïdes de synthèse sont les plus largement utilisés pour la lutte antivectorielle.

### **6.2.1. Pulvérisation intradomiciliaire**

La principale méthode de lutte contre les moustiques au stade adulte est l'aspersion intradomiciliaire (PID). Cette technique est utilisée en Afrique pour lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An. funestus* et *An. gambiae*. 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 aspersion intradomiciliaire à la dose de 2g/m<sup>2</sup>, 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 intradomiciliaire d'insecticide 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 (WHO, 2006b). Cette stratégie de lutte vise la réduction des densités de moustiques agressifs et de la longévité des femelles. Cependant, les traitements intradomiciliaires présentent l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages et/ou exophiles comme *An. arabiensis* qui continuent de prendre des repas sanguins assurant ainsi un niveau minimal de transmission (Curtis & Mnzava, 2001).

### **6.2.2. Moustiquaires imprégnées d'insecticide**

Cette stratégie vise à établir une barrière (physique et/ou chimique) entre l'homme et le moustique vecteur. Les moustiquaires sont utilisées depuis longtemps pour se protéger des

piqûres de moustique. Leur efficacité s'est vue renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticide (Darriet *et al.*, 1984) ajoutant à la barrière physique un effet répulsif et létal. Cet effet répulsif des pyréthrinoïdes empêche le moustique de se gorger au travers de la moustiquaire et d'y pénétrer lorsque celle-ci est trouée après un certain temps d'utilisation. L'effet létal sur les moustiques contribue à la protection communautaire conférée par les moustiquaires imprégnées d'insecticide. Avec une couverture de la population supérieure à 80%, elles entraînent une diminution de la transmission palustre 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 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 la raison pour laquelle, depuis quelques années, des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action sont disponibles sur le marché et présentent l'avantage de ne nécessiter aucun retraitement durant leur durée de vie estimée à 4 ou 5 ans (Guillet *et al.*, 2001).

### **6.2.3. Autres méthodes de lutte contre les vecteurs adultes**

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

croyances, la faible rémanence et le coût élevé pour les populations rurales sont autant de barrières qui peuvent rendre inefficaces l'utilisation des répulsifs.

Sous les tropiques, les populations mènent aussi la lutte contre les moustiques en utilisant des diffuseurs d'insecticides volatils en particulier sous forme de serpentins anti-moustiques et de diffuseurs électriques (Najera & Zaim, 2004). En outre, les populations assurent la protection des habitations par la pose de grillages sur les fenêtres, les avant-toits et les portes. C'est une méthode efficace si elle est appliquée et maintenue correctement. Elle constitue presque exclusivement une méthode de protection individuelle et familiale mais nécessite un investissement important et entraîne des coûts d'entretien élevés (Najera & Zaim, 2004). La lutte contre les vecteurs du paludisme peut être aussi menée en utilisant des moustiques transgéniques qui, à l'issue de manipulations génétiques, ne pourraient plus assurer l'accomplissement du cycle sporogonique du *Plasmodium* (Collins *et al.*, 1986 ; Collins, 1994 ; Crampton *et al.*, 1992 ; Curtis, 1994). Cependant, il faut considérer cette méthode comme à un stade de recherche et non opérationnelle dans le contexte habituel du terrain (Spielman, 1994).

## **7. Résistance des vecteurs aux insecticides**

La résistance est l'apparition dans une population d'insectes, d'individus ayant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce (WHO, 1976). La sélection de la résistance chez les anophèles et autres organismes vivants résulte de la méthode de lutte basée sur l'utilisation des produits chimiques. C'est après l'utilisation généralisée des organochlorés dans le domaine agricole et en santé publique en Afrique que la résistance des principaux vecteurs (*An. gambiae* et *An. funestus*) à ces produits, en particulier à la dieldrine, a été clairement établie (Coz *et al.*, 1968 ; Davidson, 1956 ; Davidson & Hamon, 1962 ; Self & Pant, 1966 ; Service, 1964 ; Service & Davidson, 1964). De plus, les pyréthrinoïdes et les organophosphorés sont largement utilisés aujourd'hui en agriculture, en santé publique et dans les ménages sous forme de serpentins et de bombes aérosols pulvérisées à l'intérieur des habitations humaines. Ce sont ces comportements des hommes qui ont contribué à sélectionner chez les anophèles des mécanismes de résistance aux insecticides.

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec des cibles biologiques présentes chez l'insecte. 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. 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 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.

### **7.1. La résistance métabolique**

La résistance métabolique correspond à un accroissement des processus de dégradation qui interviennent dans le métabolisme normal des insectes. Elle peut résulter d'une augmentation de la quantité d'enzyme ou d'une meilleure efficacité de l'enzyme. Trois types d'enzymes interviennent dans ce type de résistance aux insecticides. Il s'agit des estérases, des mono-oxygénases à cytochrome P450 et des glutathion-S-transférases (Hemingway *et al.*, 2004).

Les estérases non spécifiques sont l'un des principaux mécanismes de résistance aux organophosphorés. Ces enzymes sont surproduites et peuvent représenter jusqu'à 12% des protéines totales des insectes (Fournier, 2005). Les estérases sont classées en deux groupes (A et B) selon qu'elles hydrolysent le  $\alpha$  ou le  $\beta$ -naphtyl acétate. Leur surproduction est liée soit à une augmentation du nombre de copies du gène, soit à un mécanisme de régulation du gène (Mouches *et al.*, 1990). Elles n'agissent pas par hydrolyse mais en séquestrant les organophosphorés vis-à-vis desquels ils possèdent une forte affinité (Cuany *et al.*, 1993). Une estérase non surproduite est spécifique de la résistance au malathion chez certaines espèces d'anophèles (Hemingway & Karunaratne, 1998). Il s'agit de la malathion carboxylestérase, qui contrairement aux autres estérases, n'est produite que chez les adultes.

Les mono-oxygénases à cytochrome P450 regroupent plusieurs familles de gènes qui interviennent dans des réactions d'oxydation. Elles sont principalement impliquées dans la résistance aux pyréthrinoides et dans une moindre mesure dans la résistance aux autres insecticides. Toutefois, en Afrique du Sud, des oxydases responsables de la détoxification des pyréthrinoides ont conféré à *Anopheles funestus* une résistance croisée aux pyréthrinoides et aux carbamates (Brooke *et al.*, 2001). Dans les souches résistantes, on observe généralement une surproduction de ces enzymes mais il est probable que des mutations ponctuelles modifient l'efficacité enzymatique de certaines oxydases (Brun *et al.*, 1996).

Les glutathion-S-transférases permettent la conjugaison des insecticides avec la forme réduite du glutathion formant ainsi des métabolites non toxiques. L'enzyme la plus importante de ce groupe, la DDT-ase, intervient spécifiquement dans la dégradation du DDT. Chez *Anopheles gambiae*, sept GST différentes ont été identifiées. La résistance au DDT est associée à des changements quantitatifs et qualitatifs de ces enzymes (Prapanthadara *et al.*, 1995a ; Prapanthadara *et al.*, 1995b).

## **7.2. La 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 (Djogbénou, 2009).

Modification du canal sodium voltage dépendant : la résistance aux pyréthriinoïdes chez *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. Les mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour le canal sodium diminuent son affinité entre l'insecticide et son site de fixation (Pauron *et al.*, 1989). Deux mutations ont été identifiées, l'une (L1014F) en Afrique de l'Ouest où une leucine est remplacée par la phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène (Martinez-Torres *et al.*, 1998) et l'autre (L1014S) en Afrique de l'Est où la même leucine est remplacée par la sérine (Ranson *et al.*, 2000).

Modification de l'acétylcholinestérase : la résistance aux organophosphorés et aux carbamates quant à elle résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour acétylcholinestérase (la mutation *AceI*). Cette mutation se traduit au niveau de l'acétylcholinestérase par une substitution de la glycine par la sérine (Djogbénou, 2009).

Modification du récepteur GABA : la mutation *Rdl* confère aux insectes une résistance aux cyclo-diènes, certains organochlorés (lindane) et phényl pyrazoles (Fipronil). Cette mutation se traduit par une substitution de l'alanine par la sérine au niveau du récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Djogbénou, 2009).

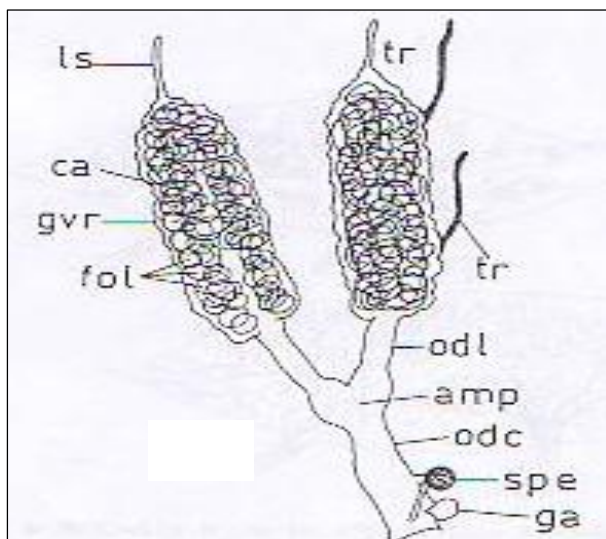


## **8. Détermination de l'âge physiologique des anophèles**

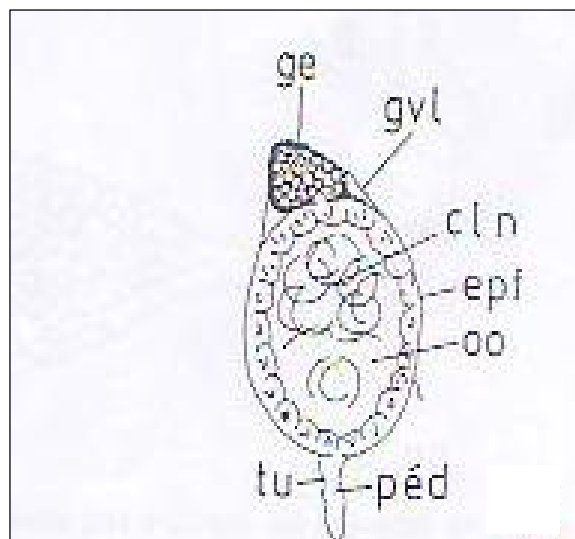
L'âge physiologique des vecteurs de paludisme est l'un des indicateurs les plus utilisés dans l'évaluation de l'efficacité des moyens de lutte antivectorielle. La lutte antivectorielle vise à détruire les vecteurs avant qu'ils n'atteignent l'âge d'héberger de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires. Les principales méthodes utilisées pour la détermination de l'âge physiologique sont liées à certaines structures (ovaire et ovariole) de l'appareil reproducteur des femelles de moustiques.

### **8.1. L'appareil reproducteur des moustiques femelles**

L'appareil génital femelle (figure 3a) est formé de deux ovaires dont les oviductes latéraux, d'abord distincts, s'unissent pour former un oviducte commun dans lequel débouchent les canaux venant des spermathèques et d'une glande accessoire (Monographie OMS, 1963). Chaque ovaire est formé par une grappe d'ovarioles qui débouchent dans un oviducte médian ou calice. Chaque ovariole (figure 3b) fonctionne comme suit : les divisions successives du germarium, situé à la périphérie, donnent naissance à des follicules. Ces follicules sont formés d'une enveloppe ou épithélium folliculaire, d'un amas de sept cellules nourricières qui laissent progressivement place à du vitellus et à un oocyte. Les follicules mûrs, dans lesquels le vitellus occupe la majeure partie, tombent dans l'oviducte commun. Ils passent ensuite dans le vagin où ils sont fécondés avant d'être pondus (Monographie OMS, 1963). Alors, l'âge physiologique des moustiques peut être exprimé par la reconnaissance des femelles qui n'ont jamais pondu, dites nullipares et des femelles dites pares ayant pondu au moins une fois. Cet âge peut être aussi exprimé par le nombre de pontes (cycles gonotrophiques) effectuées par les moustiques.



**Figure 3a :** Appareil reproducteur d'une femelle de moustique (Monographie OMS, 1963)



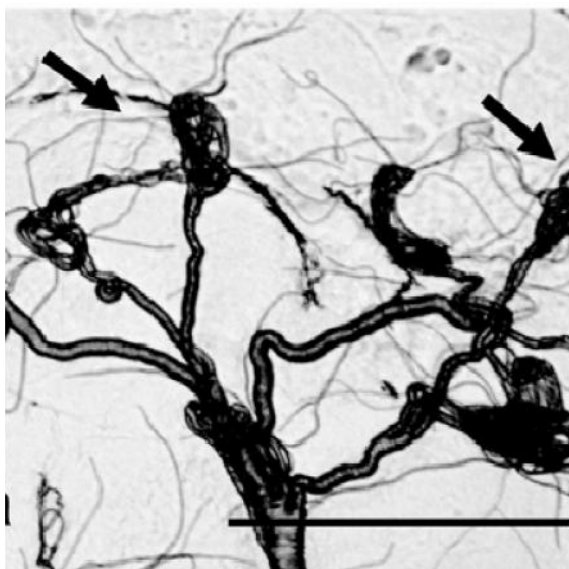
**Figure 3b :** Structure d'un ovariole (Monographie OMS, 1963)

**Figure 3a :** **amp:** ampoule, **ca :** calice, **fol :** follicules, **gvr :** gaine ovarienne, **ga :** glande annexe, **spe :** spermathèque, **tr :** trachée, **odl :** oviducte latéral, **odc :** oviducte commun, **ls :** ligament suspenseur.

**Figure 3b :** **cln :** cellules nourricières, **epf :** épithélium folliculaire, **ge :** germarium, **gvl :** gaine ovariole, **oo :** oocyte, **péd :** pédicelle, **tu :** tunique.

## 8.2. Méthodes de détermination de l'âge physiologique des anophèles

Plusieurs méthodes ont été mises à contribution pour déterminer l'âge physiologique des insectes vecteurs de maladies (Charlwood & Lopes, 1980). Au nombre de ces méthodes, nous pouvons citer : l'aspect des trachéoles ovariennes (Detinova, 1945), le comptage des dilatations folliculaires (Polovodova, 1949 ; Detinova, 1962), la baisse de fécondité (Mokry, 1980), les marques de copulation (Usinger, 1966), les modifications subies par les corps gras (Moon & Kaya, 1981), les changements cuticulaires (Ellison & Hampton, 1982), l'aspect des tubes de Malpighi (Lewis, 1970 ; Ramirez-Perez *et al.*, 1976), les modifications intestinales (Rosay, 1961), l'accumulation des composés fluorescents dans les cellules spécifiques (Millest *et al.*, 1992), les déchirures alaires et l'enlèvement des écailles chez le moustique (Perry, 1912 ; Saunders, 1962). De toutes ces méthodes, deux retiennent plus l'attention des chercheurs. La première est celle de Detinova (1945) basée sur l'aspect des trachéoles ovariennes. Les trachéoles sont enroulées (pelotons) chez les moustiques nullipares (figure 4a) et déroulées chez les pares (figure 4b).

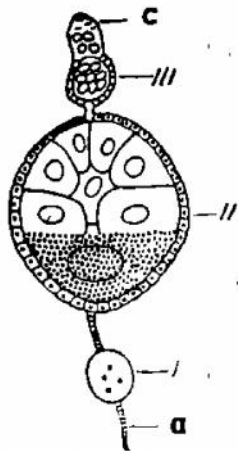


**Figure 4a** : Aspect des trachéoles ovariennes d'un moustique nullipare (Hugo *et al.*, 2008)

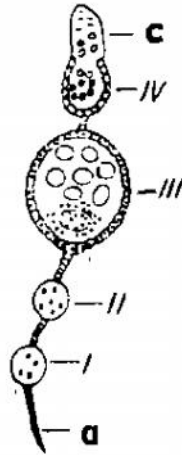


**Figure 4b** : Aspect des trachéoles ovariennes d'un moustique pare (Hugo *et al.*, 2008)

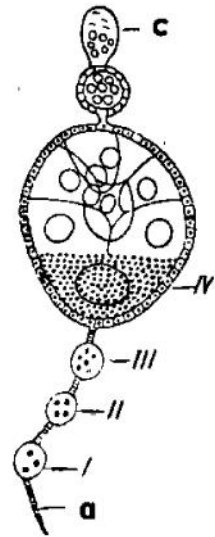
La deuxième méthode est celle de Polovodova (1949) basée sur le comptage des dilatations (corps jaunes) présentes sur le pédicelle des ovarioles (Hoc & Wilkes, 1995). Il est admis qu'après chaque oviposition, une dilatation se forme à la région du tube folliculaire occupée par l'œuf qui a été pondu (Detinova, 1962). Dans ces conditions, le nombre de dilatations présentes sur les ovarioles devrait correspondre au nombre de pontes chez la femelle du moustique. Les moustiques ayant une, deux et trois dilatations sur leurs ovarioles sont respectivement donc des femelles ayant pondu une fois (unipares, figure 5a), deux fois (bipares, figure 5b) et trois fois (tripares, figure 5c). Les moustiques dépourvus de dilatations sur leurs ovarioles sont des femelles nullipares qui n'ont jamais pondu. Les récentes études de Hoc & Charlwood (1990) ont montré que les dilatations ne sont pas formées à partir des sacs à œuf tel suggéré par Detinova (1962) mais à partir des follicules qui dégénèrent au cours des cycles gonotrophiques.



**Figure 5a :** Ovariole unipare  
(Beklemishev *et al.*, 1959)



**Figure 5b :** Ovariole bipare  
(Beklemishev *et al.*, 1959)



**Figure 5c :** Ovariole  
(Beklemishev *et al.*, 1959)

**a** : pédicelle, **C** : zone germinale, **I** : première dilatation (figures 5a, 5b et 5c), **II** : développement du deuxième follicule (figure 5a) et deuxième dilatation (figures 5b et 5c), **III** : développement du troisième follicule (figures 5a et 5b) et troisième dilatation (figure 5c), **IV** : développement du quatrième follicule (figures 5b et 5c)

## **Chapitre 2 :**

---

### **Matériel et méthodes**

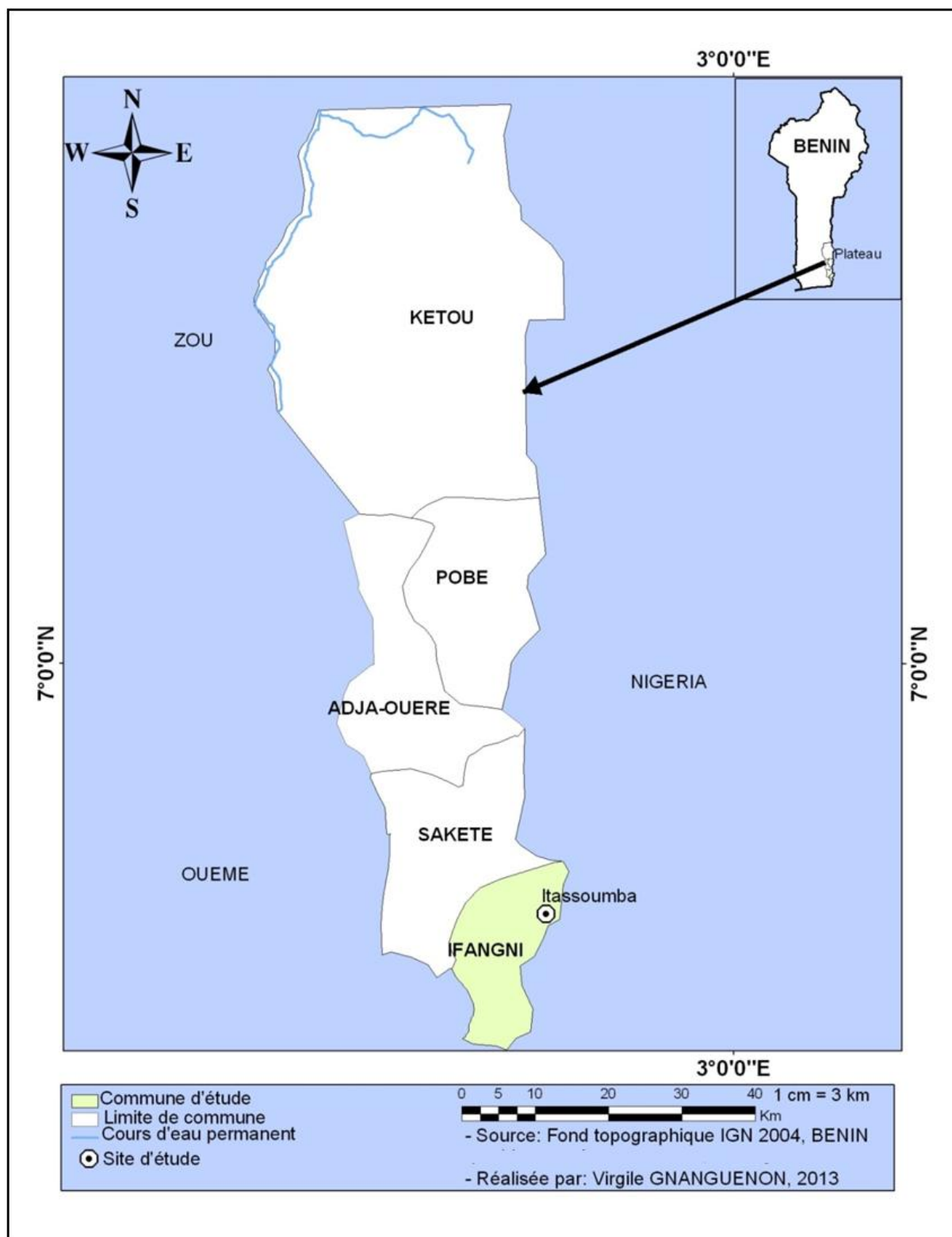
Le présent chapitre montre la démarche scientifique adoptée et l'inventaire du matériel utilisé pour atteindre les objectifs fixés. Pour faciliter la compréhension de cette séquence, nous avons présenté les différentes méthodes d'étude chapitre par chapitre.

### **1. Fiabilité du comptage des dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez *Anopheles gambiae* s.s : l'injection d'huile dans les ovaires et la dilacération classique des ovaires**

Cette étude a été réalisée exclusivement sur des spécimens issus des prospections larvaires. Le but de l'étude est de déterminer la corrélation entre le nombre de pontes effectuées et le nombre de dilatations observées sur les ovarioles à partir de deux techniques de la méthode de Polovodova basée sur le comptage des dilatations folliculaires. La méthode de Polovodova peut être appliquée par la technique d'injection d'huile dans les ovaires ou par la technique de dilacération classique des ovaires. Nous avons exploré l'utilisation des deux techniques pour la simple reconnaissance des moustiques nullipares et pares.

#### **1.1. Présentation de la zone d'étude à Ifangni**

L'étude s'est déroulée à Itassoumba (figure 6), un village de la commune de Ifangni (département du Plateau) située entre 06° 38' 56'' de latitude Nord et 02° 43' 14'' de longitude Est du Bénin avec une population humaine estimée à 71606 habitants et une superficie de 242 km<sup>2</sup> (INSAE, 2002). *Anopheles gambiae* s.s. est le seul vecteur du paludisme présent dans la localité de Itassoumba (Sovi *et al.*, 2013). A l'instar des autres localités de la commune de Ifangni, Itassoumba a un relief peu accidenté avec la présence de quelques dépressions. On y retrouve un climat de type guinéen à deux saisons sèches et deux saisons pluvieuses qui s'alternent au cours de l'année. Itassoumba enregistre une hauteur annuelle d'eau comprise entre 800 mm et 1400 mm. La végétation est faite d'un couvert composé de reliques de forêts sacrées, de plantations de palmiers à huile, d'arbustes et de hautes herbes. Itassoumba est traversé par quelques marécages. En saison sèche, les gîtes de *An. gambiae* s.s. sont rares à Ifangni. Cependant, ils sont particulièrement permanents à Itassoumba du fait de la présence des bassins piscicoles et des marais permettant le maraîchage. Les provendes réservées aux alevins et poissons, une fois présentes à la surface de l'eau, constituent une source de nourritures favorisant la pullulation des anophèles vecteurs du paludisme.



**Figure 6** : Carte du département du Plateau montrant le village de Itassoumba où l'étude est réalisée à Ifangni au Sud- Est du Bénin

## 1.2. Echantillonnage des larves d'anophèle

L'échantillonnage des larves d'anophèle a été réalisé selon la méthode du "Dipping" à l'aide de louches munies de manches longues, de seaux en plastique, de gobelets, de flacons, de récipients et d'une toile filtrante (photo 1). Les larves récoltées ont été ramenées à l'insectarium du Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC).



**Photo 1 :** Récolte des larves d'anophèle (Photo CREC, 2011)

## 1.3. Elevage des larves à l'insectarium du CREC

A l'insectarium, les larves sont mises dans des bacs contenant l'eau de gîte (photo 2). Elles ont été réparties en moyenne par lot de 100 par bac pour optimiser non seulement leur croissance, mais aussi, pour éviter le cannibalisme (Koenrradt et *al.*, 2004). L'utilisation de l'eau de gîte a pour but d'éviter l'influence des résidus chimiques tels que l'hypochlorite de sodium ( $\text{NaOCl}$ ) sur la croissance larvaire. Les larves sont nourries avec des croquettes de 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 protéines et en minéraux. Chaque bac est recouvert de toile de moustiquaire non imprégnée et entreposé dans une salle dont l'humidité relative varie de 70 à 80% avec une température qui oscille entre 25 et 30°C (photo 2). La photopériodicité est assurée par des lampes fluorescentes éclairant toute la nuit.



Après émergence, les moustiques adultes sont récoltés et mis dans une cage cubique de 30cm de côté. Les femelles ont été isolées dans une autre cage et nourries au jus de miel à 10%.



**Photo 2** : Elevage des larves d'anophèle au CREC (Photo CREC, 2011)

#### **1.4. Induction de ponte chez les femelles de *An. gambiae s.s.***

Les femelles âgées de 5 à 6 jours sont gorgées sur des lapins de 19 heures à 7 heures. Les femelles ayant effectivement pris leur repas sanguin sont retirées, placées dans d'autres cages et sont gorgées de nouveau 2 jours plus tard après digestion complète du premier repas (photo 3a). Le complément de repas sanguin est lié au fait qu'un seul repas sanguin n'assure pas souvent la maturation des ovaires chez les femelles nullipares (Carnevale *et al.*, 1979). Les femelles ayant pris les deux repas sanguins sont mises en ponte individuelle (photo 3b). Toutefois, à l'instar des femelles pares, un échantillon de moustiques nullipares gorgés est disséqué à différents stades du développement ovarien (Christophers, 1911).

Pour la ponte individuelle, une femelle de *An. gambiae s.s.* a été transférée de sa cage dans un gobelet blanc recouvert de tulle moustiquaire non imprégné. A la base de chaque gobelet est déposé un tampon de coton imbibé d'eau sur lequel repose du papier Wattman découpé suivant un cercle de 5 cm de rayon. Ce dispositif a servi de pondoir aux moustiques. Sur le tulle moustiquaire, il a été déposé du coton imbibé de jus de miel à 10% renouvelé tous les jours. Cela a servi de nourriture pour les femelles gravides en expérimentation. A la suite de

la première ponte, un échantillon de moustiques unipares est disséqué après un temps d'observation de 24 heures qui correspond à la durée nécessaire qui permettrait aux moustiques de libérer d'éventuels œufs résiduels.

Le reste des moustiques unipares, une fois lâché dans une cage, recevait un repas sanguin qui conduit les moustiques à une deuxième ponte. Après le temps d'observation, un échantillon est aussi disséqué. L'expérience est répétée sur le reste des moustiques bipares afin d'obtenir des moustiques tripares.



**Photo 3a :** Gorgement des moustiques (Photo CREC, 2011)



**Photo 3b :** Mise en ponte individuelle des moustiques (Photo CREC, 2011)

### **1.5. Dissection des ovaires et détermination de l'âge physiologique des anophèles**

Dans un premier temps, la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile et celle de Detinova sont appliquées simultanément sur un lot de moustiques d'âge connu (nullipares, unipares et les multipares). Avant la dissection, un échantillon de moustiques est chaque fois immobilisé au contact d'un tampon de coton imbibé d'éther. A la loupe binoculaire, les ovaires de chaque anophèle sont disséqués à l'aide des aiguilles de dissection sur une lame dans une microgoutte d'eau distillée (photo 4a). Les ovaires ont été extraits avec soin tout en maintenant l'oviducte commun et les oviductes latéraux intacts. L'huile de paraffine (PF) est injectée dans les ovaires à travers l'oviducte commun à l'aide d'une micropipette en verre ayant une ouverture de  $0,05\mu\text{m}$  à la pointe. A cette étape, on observe le gonflement de l'ovaire ayant reçu l'huile de paraffine (photo 4b). L'entrée de l'huile dans les

espaces inter-ovariolaires permet l'isolement des ovarioles accolés qui gardent leur pédicelle intact au moment de l'ouverture de l'ovaire (Sokolova, 1983).

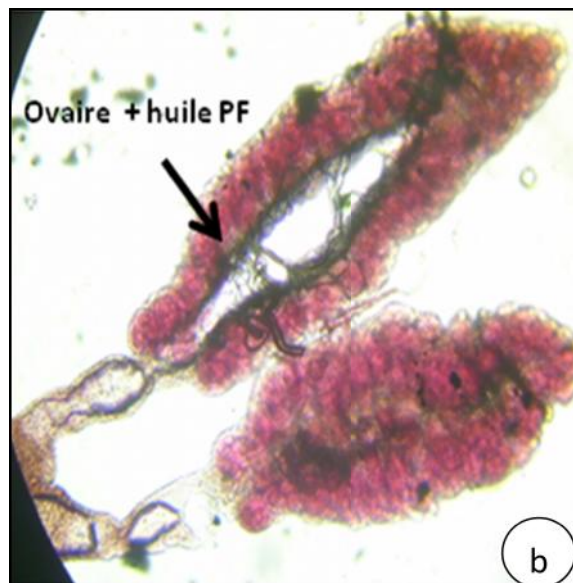
L'ovaire n'ayant pas reçu l'huile de paraffine est sectionné au niveau de son oviducte latéral puis transféré sur une autre lame dans une goutte d'eau distillée. Au microscope (objectifs 4x–40x), les trachéoles de cet ovaire sont examinées après séchage selon la méthode de Detinova basée sur l'aspect des trachéoles ovariennes. Le transfert de l'ovaire sur une autre lame se justifie par l'illisibilité des trachéoles qu'engendre l'huile de paraffine une fois présente sur la lame de dissection.

Pour rendre les dilatations visibles sur le pédicelle des ovarioles, une goutte de liquide physiologique (Natricleuride 0,9% + Rouge Neutre 1/5000-1/3000) est ajoutée à l'ovaire ayant reçu l'huile et maintenu sur la lame de dissection. Au bout d'une minute environ dans le liquide physiologique, l'ovaire une fois coloré est ouvert avec soin à partir de sa face dorsale à l'aide des aiguilles de dissection (Hoc & Wilkes, 1995). La lecture de la lame a été faite sous un microscope à caméra incorporée (4x–10x). Ainsi, le nombre maximum de dilatations (indicateur de l'âge physiologique) portées par les ovarioles est enregistré.

Enfin, dans un second temps, la méthode de Polovodova basée sur la technique de dilacération classique des ovaires et celle de Detinova sont appliquées simultanément sur un autre lot de moustiques d'âge connu (nullipares, unipares et les multipares). Ici, les ovaires de chaque moustique sont disséqués dans une goutte d'eau distillée. Un ovaire est sectionné au niveau de son oviducte latéral puis transféré sur une autre lame dans une goutte du liquide physiologique. Les ovarioles de cet ovaire ont été simplement isolés avec soin à l'aide des aiguilles de dissection. Le nombre maximum de dilatations portées par les ovarioles est aussi enregistré. Les trachéoles de l'ovaire maintenu dans l'eau distillée sur la lame de dissection sont examinées par la méthode de Detinova après séchage.



**Photo 4a** : Dissection des ovaires  
(Photo CREC, 2011)



**Photo 4b** : Ovaires après injection d'huile de paraffine (Photo CREC, 2011)

### 1.6. Analyse statistique

Pour apprécier la similarité entre la méthode de Detinova et celle de Polovodova appliquée par les techniques d'injection d'huile et de dilacération classique des ovaires, nous avons utilisé les tests de mid-p, de Khi 2 ou le test exact de Fisher avec le calcul des Odds Ratio et leur intervalle de confiance (Kenneth, 2002). Les Odds Ratio ont été calculés en utilisant la méthode non conditionnelle du maximum de vraisemblance (Wald). Les intervalles de confiance ont été estimés en utilisant la méthode d'estimation d'approximation normale (Wald). Les mêmes analyses ont été faites pour apprécier l'efficacité des techniques d'injection d'huile et de dilacération classique des ovaires pour la détermination du nombre de pontes chez les moustiques. L'influence du stade de développement des ovaires sur l'efficacité des méthodes de détermination de l'âge physiologique des moustiques a été appréciée en utilisant la régression logistique prenant le facteur d'indicateur de la non-conformité à l'âge réel d'un moustique comme facteur endogène et l'indicateur des stades de développement des ovaires comme facteur exogène, suivie d'une analyse de la déviance avec le test du rapport de vraisemblance (Venables & Ripley, 2002). La méthode de définition de « contrasts » nous a permis de comparer deux à deux l'influence des stades de développement des ovaires sur l'efficacité des méthodes de détermination de l'âge physiologique des moustiques. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel R-2.15.2 (R Development Core Team, 2011).

## **2. Structure génétique liée au gène *Kdr* et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge physiologique chez *Anopheles gambiae* s.s.**

Ce chapitre a pour but d'étudier la structure génotypique du gène de résistance *Kdr* en fonction du nombre de pontes (degré de parturité) chez *An. gambiae* s.s. d'une part, et son infectivité au *P. falciparum* en fonction du nombre de pontes d'autre part. Nous avons étudié d'abord le degré de parturité de *An. gambiae* s.s. en utilisant trois populations de moustiques : des spécimens de *An. gambiae* s.s. capturés sur appât humain, des spécimens venant des captures par piège fenêtre et des spécimens récoltés après aspersion intradomiciliaire d'insecticide. Cela devrait nous amener à déterminer la méthode d'échantillonnage qui permet de collecter les vecteurs les plus âgés. Pour l'atteinte des objectifs fixés, nous avons besoin d'un maximum d'anophèles âgés.

L'étude de la relation entre l'âge physiologique et l'infectivité au *P. falciparum* des femelles de *An. gambiae* s.s a été effectuée uniquement sur les vecteurs collectés dans des habitations humaines. La relation entre l'âge physiologique et le portage du gène de résistance *Kdr* est étudiée sur diverses populations de moustiques : anophèles collectés dans des habitations humaines (moustiques sauvages), anophèles de souche de référence Kisumu-sensible (Kis-SS) et Kisumu-résistant (Kis-RR = Kis-*Kdr*) (témoin). Le choix des deux souches, sauvage et Kisumu, a été fait dans la perspective d'associer les résultats obtenus chez les moustiques sauvages à l'effet insecticide des MILD. L'utilisation des matériels biologiques de laboratoire (Kis-SS et Kis-RR) se justifie par la distribution généralisée des MILD au Bénin qui rend difficile le choix d'une zone témoin sans intervention.

### **2.1. Présentation de la zone d'étude**

Dans le but de diversifier les résultats attendus à l'issue de l'étude, les enquêtes entomologiques ont été menées au Bénin dans les communes de Adjarra et de Ifangni (figure 11).

- **Adjarra**

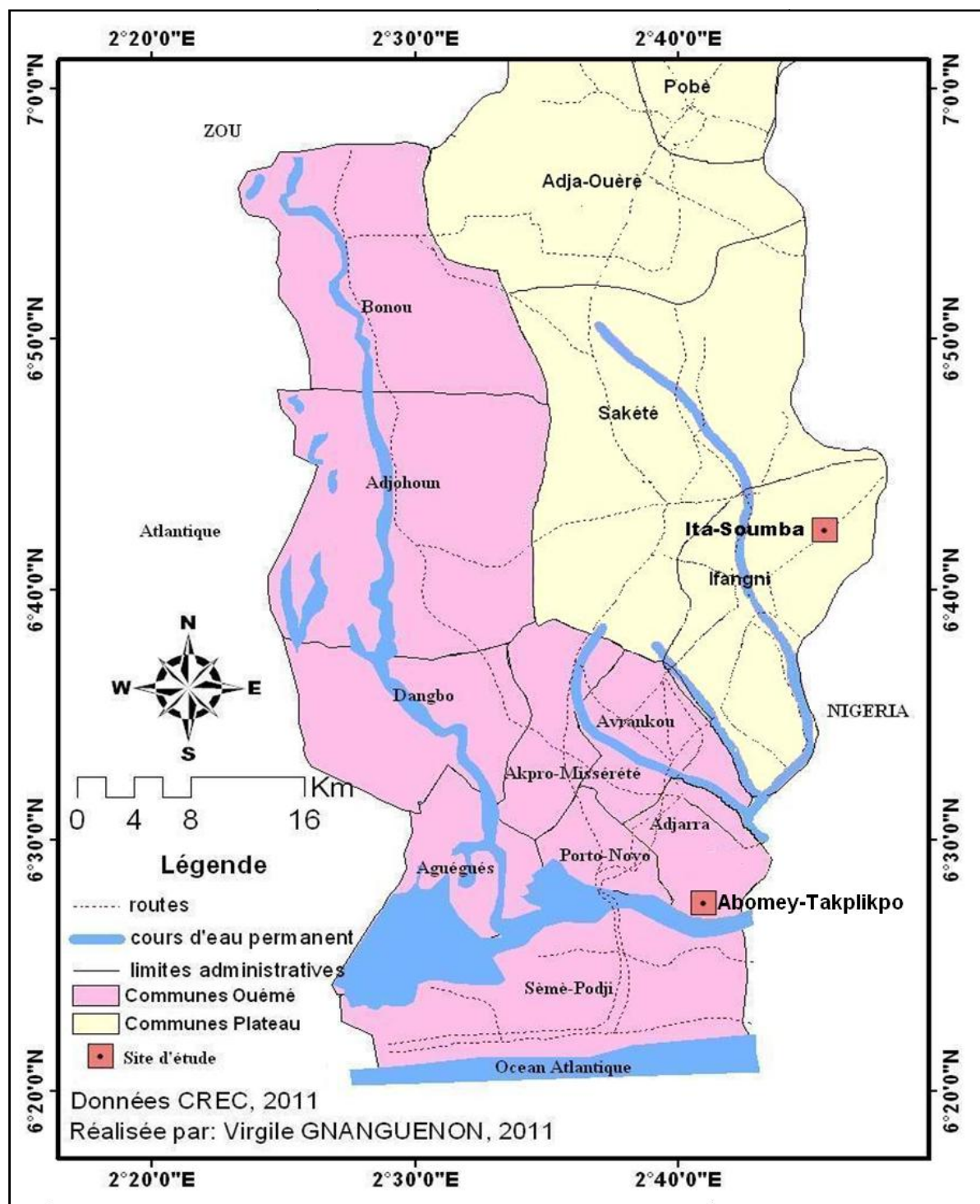
Dans la commune de Adjarra située entre 06° 27' 00'' de latitude Nord et 01° 56 '00'' de longitude Est, l'étude a été réalisée plus précisément dans le village de Abomey-Takplikpo (figure 7). La commune de Adjarra, petit territoire du Sud-Est de la République du Bénin, est située dans le département de l'Ouémé avec une population de 60112 habitants et une superficie de 112 km<sup>2</sup> (INSAE, 2002). Elle est limitée au Nord par la commune de Avrankou, au Sud par la commune de Sème-Podji, à l'Ouest par la commune de Porto-Novo et à l'Est par le Nigéria. La commune de Adjarra jouit d'un climat subéquatorial caractérisé par deux

saisons sèches et deux saisons pluvieuses. La moyenne pluviométrique est de 1200 mm l'an. Le relief est monotone et très peu accidenté. La commune de Adjarra est située sur le plateau de Pobè-Sakété avec une altitude de 20 m en moyenne. Ce plateau est entaillé par de petites et moyennes dépressions aux pentes très peu marquées. Les dépressions moyennes, au nombre de trois, se rejoignent en une vallée unique entre la commune et la République Fédérale du Nigeria. Le réseau hydrographique de la commune de Adjarra est composé de la lagune de Porto-Novo au Sud et de la rivière Aguidi au Nord-Est. Le lit de cette rivière est occupé par des palmiers raphia. Il apparaît comme un chapelet de bas-fonds exploités par les populations pour s'approvisionner en eau. Le couvert végétal est clairsemé, composé d'arbustes, de hautes herbes et par endroit de reliques de forêts sacrées.

- **Ifangni**

La description de notre zone d'étude dans la commune de Ifangni est déjà faite dans l'étude précédente (sous-titre 1.1.).





**Figure 7** : Carte montrant les villages de Itassoumba (commune de Ifangni) et Abomey-Takplikpo (commune de Adjara) au Sud-Est du Bénin

## **2.2. Etude au laboratoire**

Les anophèles homozygotes de souche de référence Kis-SS et Kis-RR sont les deux échantillons de matériels biologiques utilisés. A l'issue d'un élevage, ces deux échantillons de moustiques âgés de 3 jours environ, nourris au jus sucré, sont mis en observation séparément dans deux cages et gorgés après le 5<sup>ème</sup> jour sur lapin. Pour chaque échantillon, les femelles ayant effectivement pris le repas sanguin sont retirées, placées dans d'autres cages et sont gorgées à nouveau 2 jours plus tard. Cette durée permettrait la digestion complète du premier repas. Les anophèles ayant pris les deux repas sanguins sont mis en ponte individuelle. A la première ponte, la mortalité et le nombre d'œufs pondus sont lus au niveau de chaque souche après un temps d'observation de 24 heures. Le reste des moustiques unipares au niveau de chaque souche, une fois lâché dans une cage, reçoit un repas sanguin qui conduit les moustiques à une deuxième ponte. Après le temps d'observation, la mortalité et le nombre d'œufs pondus sont lus à nouveau. L'expérience a été répétée sur le reste des moustiques bipares afin d'obtenir les données relatives aux moustiques tripares.

La comparaison des taux de survie enregistrés chez les deux échantillons (Kis-SS, Kis-RR) à chaque âge nous a permis de vérifier l'existence d'un coût génétique associé à la résistance (gène *Kdr*) sur la longévité des anophèles. Cela permet de confirmer la relation entre l'âge physiologique et les avantages sélectifs liés à chaque génotype du gène *Kdr*. Par ricochet, la lecture du nombre d'œufs pondus à chaque oviposition nous a permis d'établir la relation entre l'âge physiologique et la fécondité des vecteurs.

## **2.3. Etude sur les moustiques de terrain**

### **2.3.1. Echantillonnage des moustiques**

Les trois méthodes d'échantillonnage utilisées pour la collecte des moustiques ont été organisées simultanément.

#### **2.3.1.1. Capture sur homme la nuit**

Les moustiques sont capturés mensuellement sur quatre hommes (photo 5) dans deux cases pendant deux nuits consécutives à intervalle de 48 heures à l'aide des tubes à hémolyse à l'intérieur et à l'extérieur des habitations de 21 heures à 05 heures du matin. A cause du risque de transmission du paludisme, les « captureurs » sont mis sous surveillance symptomatique clinique. Tout symptôme évocateur entraîne un diagnostic parasitologique et un traitement si nécessaire.





**Photo 5** : Capture de moustiques sur homme la nuit avec des tubes à hémolyse (Photo CREC, 2008)

### **2.3.1.2. Capture par piège-fenêtre suivie d’aspersion intradomiciliaire de bombe aérosol d’insecticide non rémanent**

Les moustiques sont capturés par les piège-fenêtres (photo 6) dans 4 cases. Les habitations sont sélectionnées en fonction du nombre de personnes qui y dorment. Dans les cases que nous avons choisies, il y a un seul habitant. Les piège-fenêtres de sortie utilisés sont constitués d’un tulle de térylène monté à 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 (Bar-Zeev & Self, 1966). Sur chaque fenêtre est placé un contre-plaqué de 1m de côté qui porte en son centre une ouverture de 30 cm de côté (Asidi *et al.*, 2005). Pour chaque case sélectionnée, les pièges sont placés sur les fenêtres vers l’extérieur de 18 heures à 6 heures. Cela est répété deux fois par mois pendant toute la période d’étude. Les moustiques qui sont entrés dans ces cases la nuit, attirés le lendemain à l’aube par la lumière du jour, cherchent à sortir par les fenêtres et sont piégés. Ces moustiques sont ensuite ramassés et transférés des pièges dans des gobelets couverts de voiles et transportés au

laboratoire. Dans ces mêmes cases, une aspersión intradomiciliaire est faite à l'aide de bombe aérosol d'insecticide non rémanent et d'un drap blanc entre 7 heures et 9 heures (photo 7).



**Photo 6 :** Capture de moustiques par piège-fenêtre (Photo CREC, 2008)



**Photo 7 :** Ramassage de moustiques après aspersión intradomiciliaire (Photo CREC, 2008)

### **2.3.2. Identification des espèces culicidiennes**

Après chaque nuit de capture, tous les moustiques sont rassemblés par type d'échantillonnage tôt le matin afin de procéder à leur identification. Les moustiques sont identifiés à l'aide des clés de détermination morphologique (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987).

### **2.3.3. Dissection des ovaires et détermination de l'âge physiologique des femelles de *An. gambiae* s.l.**

La dissection des ovaires et la détermination de l'âge physiologique des vecteurs sont faites par type d'échantillonnage d'après la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile. La description de la procédure de dissection et de détermination de l'âge physiologique (nombre de pontes) des moustiques a été faite précédemment (sous-titre 1.5.).

### **2.3.4. Identification des espèces du complexe *Anopheles gambiae*, recherche de la mutation *Kdr* et recherche de l'antigène circumsporozoïtique du *Plasmodium falciparum* chez les femelles de *Anopheles gambiae* s.s.**

Après la détermination du nombre de pontes des anophèles dans nos deux zones d'étude, chaque moustique numéroté (1 à n) est sectionné en deux parties. Il s'agit du tête-thorax et la carcasse (abdomen, pattes et ailes) respectivement pour la recherche de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* et les analyses moléculaires. Le tête-thorax et la carcasse de chaque moustique disséqué sont conservés dans deux tubes Eppendorf contenant du silicagel à -20°C. Sur chaque tube Eppendorf sont notés le lieu de capture, le type d'échantillonnage, la date de capture et le numéro d'ordre du moustique. La recherche de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* a été faite par la méthode de titrage immuno-enzymatique (ELISA-CSP) décrite par Wirtz *et al.* (1987) (voir annexe 2). Quant aux analyses moléculaires, l'identification des espèces du complexe *An. gambiae* a été faite grâce à la technique de Scott *et al.* (1993) (Voir annexe 2). La mutation *kdr* a été mise en évidence chez les anophèles par PCR selon le protocole décrit par Martinez-Torres *et al.* (1998) (voir annexe 2).

### **2.4. Analyse statistique**

Le test du Khi2 de comparaison multiple des proportions (Kenneth, 2002) a permis d'étudier la prédominance des différentes espèces de moustiques collectés dans chaque site d'étude. Le même test a été utilisé pour la comparaison des densités de *An. gambiae* s.s. et la comparaison de l'âge physiologique des *An. gambiae* s.s. issus des différents types d'échantillonnage dans

les sites d'étude. A chaque ponte, la comparaison des taux de survie entre les moustiques résistants et sensibles a été aussi faite par le test du Khi2 de comparaison des proportions. Cette comparaison des taux de survie nous a permis d'étudier la relation entre l'âge physiologique et le portage du gène de résistance *Kdr*. L'évolution du taux de fécondité suivant l'âge physiologiques des moustiques été évaluée en utilisant le test de rapport des taux (rate ratio=  $RR^{\circ}$ ). Le test de Poisson nous a permis d'obtenir les intervalles de confiance de la fécondité suivant l'âge physiologique. La méthode des intervalles de confiance binomiale a permis de déterminer l'intervalle de confiance du taux d'infectivité suivant l'âge physiologique. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel R-2.15.2 (R Development Core Team, 2011).

### **3. Comportement trophique des femelles multipares de *Anopheles gambiae* s.s. et dynamique de la transmission du *Plasmodium falciparum***

La présente étude vise à étudier le comportement trophique des anophèles suivant leur degré de parturité et à déterminer la corrélation entre le rythme d'activité des femelles multipares (épidémiologiquement dangereuses) et la transmission du paludisme. L'étude de la distribution horaire des moustiques infectieux nous a permis de déterminer la période pendant laquelle la majorité des infections palustres sont transmises à l'homme la nuit.

#### **3.1. Présentation de la zone d'étude**

L'étude a été réalisée dans nos deux zones d'étude basées dans les communes de Adjarra (Abomey-Takplikpo) et Ifangni (Itassoumba) que nous avons précédemment décrites (sous-titres 1.1. et 2.1.) (figure 7).

#### **3.2. Collecte et traitement des moustiques**

La collecte des moustiques a été faite uniquement sur homme par tranche horaire, à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à l'aide des tubes à hémolyse de 21 heures à 5 heures du matin (photo 5). Seuls les anophèles vecteurs sont identifiés à l'aide des clés de détermination morphologique (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987). La dissection des ovaires et la détermination de l'âge physiologique des vecteurs ont été faites par tranche horaire d'après la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile. La description de la procédure de dissection et de détermination du nombre de pontes des moustiques a été faite précédemment (sous-titre 1.5.). Le tête-thorax et la carcasse de chaque moustique disséqué sont coupés et conservés dans deux tubes Eppendorf contenant du silicagel à -20°C. Sur chaque tube Eppendorf sont notés le lieu de capture, la date de capture, la tranche d'heure de capture et le numéro d'ordre du moustique. Comme dans l'étude précédente, la recherche de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* a été faite par la méthode de titrage immuno-enzymatique (ELISA-CSP) décrite par Wirtz *et al.* (1987) (voir annexe 2). De même, l'identification des espèces du complexe *An. gambiae* a été faite par PCR grâce à la technique de Scott *et al.* (1993) (voir annexe 2).

#### **3.3. Analyse statistique**

Le nombre moyen de piqûres reçues par homme et par heure (p/h/h) a été calculé en divisant le nombre de vecteurs capturés par tranche heure par le nombre de capture-nuits. La comparaison des p/h/h entre l'intérieur et l'extérieur des habitations a été effectuée en utilisant

le test de Poisson. Par groupe d'âge, la proportion de moustiques capturés par tranche horaire a été calculée par la fraction du nombre de vecteurs collectés dans la tranche horaire sur le total. Les taux d'infectivité au *P. falciparum*, par tranche horaire, ont été calculés par la fraction du nombre de vecteurs infectés sur le nombre de vecteurs testés. Suivant les tranches horaires, la comparaison deux à deux des taux de parturité par groupe d'âge et des taux d'infectivité a été effectuée en utilisant le test de comparaison multiple des proportions (Robert, 1998) et la méthode d'ajustement de p-value de Holm (Benjamini & Yekutieli, 2001). Le calcul des coefficients de corrélation (coefficient de Kendall, coefficient de Pearson) nous a permis de déterminer le degré d'explication de la variabilité de l'infectivité des vecteurs en fonction du rythme d'activité des femelles multipares (p/h/h des vecteurs multipares capturés). Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel R.2.15.2. (R. Development Core Team, 2011)

### **Chapitre 3 :**

---

**Fiabilité du comptage des dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez *Anopheles gambiae* s.s : l'injection d'huile dans les ovaires et la dilacération classique des ovaires**

## 1. Contexte et justification

Dans le présent chapitre, la fiabilité de la méthode de Polovodova (1949) (comptage des dilatations folliculaires) pour la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae* s.s. a été notre première préoccupation. L'objectif principal de notre sujet est d'étudier l'évolution d'un certain nombre de paramètres entomologiques (infectivité au *P. falciparum*, portage du gène *Kdr*) en fonction du nombre de pontes chez cette espèce. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la présence ou non de dilatations sur les ovarioles pour la simple reconnaissance des moustiques qui n'ont jamais pondu (nullipares) et ceux qui ont déjà pondu au moins une fois (pares) au cours de leur vie.

Il est admis qu'après chaque ponte, une dilatation se forme à la région du tube folliculaire occupée par l'œuf pondu (Polovodova, 1949). Ainsi, théoriquement, le nombre de dilatations présentes sur les ovarioles (follicules) devrait être égal au nombre de pontes chez le moustique, ce qui est un indicateur de l'âge physiologique (Polovodova, 1949 ; Detinova, 1962). En Afrique tropicale, cette méthode a été utilisée avec succès (Hoc & Wilkes, 1995). Plusieurs travaux ont montré l'existence de dilatations multiples chez les multipares de *An. gambiae* et ont conclu que la méthode de Polovodova est bien applicable chez l'espèce pour l'estimation du nombre de pontes (Gillies & Wilkes, 1965 ; Snow & Wilkes, 1977 ; Lines *et al.*, 1991). Cependant, l'inexistence de dilatations multiples a été aussi montrée chez le même vecteur après plusieurs pontes (Brady, 1963 ; Giglioli, 1965 ; Hamon *et al.*, 1961). Ces différences enregistrées expliquent une certaine réserve observée par certains chercheurs dans l'utilisation de la méthode de Polovodova pour la détermination du nombre de pontes chez les moustiques. D'autres auteurs déconseillent même l'utilisation des dilatations folliculaires pour la simple reconnaissance des moustiques nullipares et pares (Giglioli, 1965 ; Cornet *et al.*, 1975 ; Mondet, 1993). C'est dans ce contexte de polémique entre différents auteurs que nous avons entrepris les travaux de ce présent chapitre.


Pour répondre aux préoccupations du présent chapitre, il faut rappeler que nous avons appliqué la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires (Lewis, 1958) sur un lot d'anophèles dont le nombre de pontes est connu. Les résultats obtenus nous ont permis de vérifier si le nombre de dilatations folliculaires observées correspondait au nombre de pontes chez les moustiques. Pour la reconnaissance des moustiques nullipares et pares, le même lot de moustiques a été soumis à l'examen de l'aspect des trachéoles ovariennes par la méthode usuelle de Detinova (1945). Les résultats obtenus avec la méthode de Detinova ont été comparés à ceux de la méthode de Polovodova par dilacération des ovaires en se basant juste sur la présence ou non de dilatations sur les ovarioles afin de



chercher le degré de similarité entre les deux procédés. Par analogie, la même démarche est suivie avec un second lot de moustiques dont le nombre de pontes est également connu, sauf que la méthode de Polovodova a été appliquée par la technique d'injection d'huile dans les ovaires (Hoc & Wilkes, 1995).

Les données relatives à ce chapitre sont publiées en détails dans les **articles 1, 2, 3 et 4**.

Anagonou et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:117  
DOI 10.1186/s13071-015-0731-7


**Parasites  
& Vectors**

**RESEARCH**
**Open Access**

## Application of Polovodova's method for the determination of physiological age and relationship between the level of parity and infectivity of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s, south-eastern Benin

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Roseric Azondékon<sup>1,3</sup>, Marc Agbogun<sup>1</sup>, Frédéric Oké-Agbo<sup>1,2</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Kéfilath Badirou<sup>1,2</sup>, Ramziath Agbanrin-Youssouf<sup>1,2</sup>, Roseline Attolou<sup>1,2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Arthur Sovi<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

**academicJournals**  
Vol. 9(1), pp. 9-15, January, 2015  
DOI: 10.5897/JCAB2014.0424  
Article Number: 29BCD8A50108  
ISSN 1996-0867  
Copyright © 2015  
Author(s) retain the copyright of this article  
<http://www.academicjournals.org/JCAB>

**Journal of Cell and Animal Biology**

*Full Length Research Paper*

## Development of new combined method based on reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations for determining the physiological age of *Anopheles gambiae* s.s.

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Roseric Azondékon<sup>1</sup>, Bruno Akinro<sup>1</sup>, Frédéric Oké-Agbo<sup>1,2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Renaud Govoetchan<sup>1,2</sup>, Rock Aikpon<sup>1,2</sup>, Arthur Sovi<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>



## Journal of Coastal Life Medicine

journal homepage: [www.jclmm.com](http://www.jclmm.com)

Original article doi:10.12980/JCLM.3.2015J5-52

©2015 by the Journal of Coastal Life Medicine. All rights reserved.

Observation of granulations in the basal body of ovarioles and follicular dilatations for the determination of physiological age of *Anopheles gambiae* s.s.

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Bruno Akinro<sup>1</sup>, Armand Akpo<sup>1,2</sup>, Martial Gbegbo<sup>1</sup>, Albert Salako<sup>1</sup>, Martin Akogbeto<sup>1,2</sup>

International Journal of Mosquito Research 2015; 2 (2): 75-79



## International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906  
CODEN: IJMRK2  
IJMR 2015; 2 (2): 75-79  
© 2015 IJMR  
Received: 20-06-2015  
Accepted: 19-07-2015

Rodrigue Anagonou  
a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CEREC), 06

## Using ovarian development stages in the determination of the physiological age in the females of *Anopheles gambiae* s.l, south-eastern Benin

Rodrigue Anagonou, Fiacre Agossa, Virgile Gnanguenon, Gil Germain Padonou, Bruno Akinro, Martin Akogbeto

## 2. Résultats

### 2.1. Structure de l'âge physiologique des anophèles élevés à l'insectarium

La méthode de Detinova et celle de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires sont appliquées sur le lot N°1 constitué de quatre échantillons (nullipares, unipares, bipares et tripares) de 50 moustiques chacun. Par ailleurs, la méthode de Detinova et celle de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile sont appliquées sur le lot N°2 ayant la même composition que le précédent. Les données obtenues après les différentes applications sont présentées dans le tableau I ci-dessous. Dans ce tableau, on observe des moustiques dont l'âge observé correspond à l'âge réel du moustique. Cependant, des surestimations et des sous-estimations d'âge ont été enregistrées chez d'autres moustiques.

**Tableau I :** Structure de l'âge physiologique des femelles de *Anopheles gambiae* s.s. élevées à l'insectarium

Age	N°	Stades	Méthodes de l'âge (Lot 1)		Méthodes de l'âge (Lot 2)		
			Detinova	Polovodova (DO)	Stades	Detinova	Polovodova (TI)
n	1	I	n	n	IId	n	n
	2	IId	n	n	I	n	n
	3	IIf	n	?	IIf	n	n
	4	III	n	n	IIm	n	n
	5	I	n	?	III	n	n
	6	IId	n	n	I	n	?
	7	IIf	n	n	IId	n	n
	8	III	?	n	IId	n	n
	9	IId	n	n	I	n	n
	10	I	n	?	IId	n	?
	11	IIf	n	n	I	n	n
	12	IId	n	n	IIm	n	n
	13	III	?	n	IIf	n	n
	14	IId	n	n	I	n	n
	15	I	n	?	III	?	n
	16	I	n	n	I	n	n
	17	IV	?	n	IId	n	?
	18	I	n	?	IId	n	n
	19	IId	n	n	IIm	n	n
	20	I	n	n	IId	n	n
	21	IId	n	n	I	n	n
	22	I	n	n	IIm	n	n
	23	IIm	n	?	IId	n	n
	24	IId	n	n	I	n	?
	25	I	n	?	IV	?	n
	26	IId	n	n	III	?	n
	27	I	n	n	I	n	?
	28	IIm	n	n	IIf	n	n
	29	III	?	n	IId	n	n
	30	IIf	n	n	I	n	n
	31	I	n	?	III	?	n
	32	IIf	n	n	IId	n	?
	33	I	n	n	IId	n	p1
	34	IId	n	n	IIm	n	n
	35	IId	n	n	IIf	n	n

	36	IIm	n	?	I	n	n
	37	I	n	?	IId	n	n
	38	IIm	n	n	I	n	n
	39	IIm	n	n	IIm	n	n
	40	I	n	n	III	?	n
	41	IIf	n	n	IIf	n	n
	42	IId	n	n	IV	?	p1
	43	III	?	n	IId	n	n
	44	I	n	?	IId	n	n
	45	IV	?	n	I	n	?
	46	IId	n	n	IIf	n	n
	47	IId	n	n	IId	n	n
	48	I	n	?	III	?	n
	49	IId	n	n	I	n	n
	50	I	n	n	IId	n	n
<b>p1</b>	1	I	p	p1	IId	p	p1
	2	IId	p	n	IId	p	p1
	3	IId	p	p1	IIm	p	p1
	4	IIm	p	p1	I	p	?
	5	IIf	p	p1	III	?	p1
	6	IIm	p	p1	IId	p	p1
	7	IId	p	p1	IV	?	p1
	8	IIf	?	p2	IIf	p	p1
	9	IId	p	n	IIm	p	n
	10	IIm	p	p1	IId	p	p1
	11	IIm	p	n	IId	p	p1
	12	IIf	p	p1	IIf	p	p1
	13	IId	p	p1	IIm	p	p1
	14	I	p	p1	IIf	p	p1
	15	IId	p	p1	III	?	p1
	16	IId	p	p1	IId	p	p1
	17	IIf	p	p1	IIm	p	p1
	18	III	?	p1	I	p	p1
	19	I	p	p1	IId	p	p1
	20	IId	p	p1	IId	p	p1
	21	IId	p	p1	IIm	p	p1
	22	IIm	p	p1	IIf	?	p2
	23	IId	p	n	IId	p	p1
	24	IIf	p	p1	IId	p	p1
	25	IId	p	p1	IIm	p	p1

	26	I	p	p1	III	?	p2
	27	IId	p	p1	IId	p	p1
	28	III	?	p1	IId	p	p1
	29	IId	p	n	IIm	p	p1
	30	IV	?	p1	IIm	p	n
	31	IIm	p	p1	IId	p	p1
	32	IId	p	p1	IId	p	p1
	33	IIf	p	p1	IIm	p	p1
	34	IId	p	p1	IId	p	p1
	35	IId	p	n	IId	p	p1
	36	IIm	p	p1	IId	p	p1
	37	IId	p	p1	IV	?	p1
	38	IIm	p	p1	IId	p	p1
	39	IIf	p	p1	IId	p	p1
	40	IId	p	p1	IIf	p	p1
	41	IIm	p	p1	IId	p	p1
	42	IId	p	p1	IIm	p	p2
	43	III	?	p1	IId	p	p1
	44	IId	p	p1	IIf	p	p1
	45	IIm	p	p1	IId	p	p1
	46	IId	p	p1	IId	p	p1
	47	IId	p	p1	III	?	p1
	48	IIf	p	p1	IId	p	p1
	49	I	p	p1	IIm	p	p1
	50	IIm	p	n	IId	p	p1
p2	1	IId	P	p1	IIm	p	p2
	2	IId	P	p1	IIm	p	p2
	3	IIm	P	n	IId	p	p2
	4	IId	P	p1	III	?	p2
	5	IIf	p	p1	IIf	p	p2
	6	IId	P	p1	IV	?	p3
	7	IId	P	p1	IIm	p	p2
	8	IIm	P	p1	IId	p	p2
	9	III	?	p2	IIf	p	p2
	10	IV	p	p2	IIm	p	p2
	11	IId	P	p1	I	p	p2
	12	III	?	p1	IIm	p	p2
	13	IId	P	p1	IIf	p	p2
	14	IId	P	p1	IIm	p	p2
	15	IIm	P	p1	IId	p	p2
	16	IId	P	p1	IIm	p	p2

	17	IV	?	p1	IIm	p	p2
	18	IIf	p	p1	IId	p	p2
	19	IIm	P	p1	IIf	?	p2
	20	IId	P	p1	IIf	p	p2
	21	IId	P	p2	IIm	p	p2
	22	IId	P	p1	IId	p	p2
	23	IIm	P	p1	IIm	p	p2
	24	IId	P	p1	III	?	p2
	25	I	P	p1	IId	p	p2
	26	IId	P	n	IIm	p	p2
	27	IId	P	p1	IId	p	p2
	28	IIm	P	p1	IIm	p	p2
	29	IId	P	p1	IId	p	p2
	30	IId	P	p1	IIf	p	p2
	31	III	?	p1	IIm	p	p2
	32	IId	P	p2	IIm	p	p2
	33	III	P	p1	III	?	p2
	34	IId	P	p1	IIm	p	p2
	35	IIf	P	p1	IIm	p	p2
	36	IIm	P	p1	IId	p	p1
	37	IId	P	p1	IV	?	p2
	38	IIf	P	p2	IId	p	p2
	39	IId	P	p1	IIm	p	p2
	40	I	P	p2	IIf	p	p3
	41	III	?	p1	IId	p	p2
	42	IId	P	p1	IIm	p	p2
	43	IIm	P	p1	IId	p	p2
	44	IId	P	p1	III	p	p2
	45	IId	P	n	IId	p	p2
	46	IIf	p	p1	IIf	p	p2
	47	IIm	P	p2	I	p	n
	48	IIm	P	p1	III	?	p2
	49	I	P	p1	IIm	p	p2
	50	IIf	P	p1	IIm	p	p2
p3	1	IIm	P	p1	IId	p	p3
	2	IId	P	p1	IIm	p	p3
	3	IId	P	p1	IIm	p	p3
	4	IIm	P	p1	III	?	p3
	5	IV	?	p1	IIf	p	p4
	6	III	?	p1	IIm	p	p3
	7	IId	P	p2	IIm	p	p3

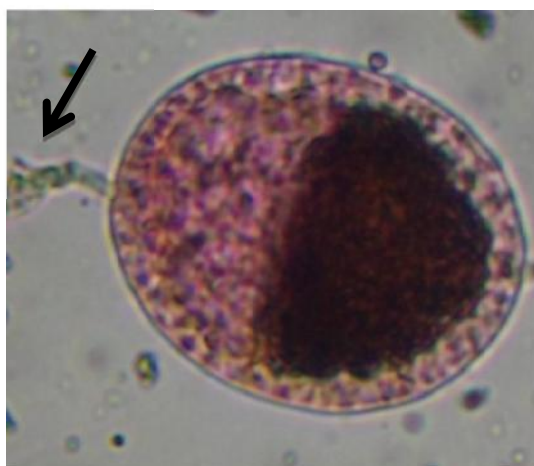
8	IIf	P	p1	III	?	p3
9	IId	P	p1	IIm	p	p3
10	IId	P	n	IId	p	p3
11	IV	?	p2	IIm	p	p3
12	IId	P	p1	IId	p	p2
13	III	?	p1	IIf	p	p3
14	IIm	P	p1	IIm	p	p1
15	IId	P	p1	IIm	p	p3
16	IIf	P	p2	IId	p	p3
17	III	P	p2	IIf	p	p3
18	IId	P	p1	IIm	p	p3
19	IIm	P	p1	IIf	?	p3
20	IId	P	p1	IIf	p	p3
21	IIm	P	p2	IIm	p	p3
22	IIf	P	p3	IId	p	p3
23	IId	P	p1	IIm	p	p3
24	IId	P	p1	IId	p	p3
25	IIm	P	p1	IIf	p	p3
26	IId	P	p1	IIm	p	p3
27	IIm	P	p1	IId	p	p3
28	IIf	P	p1	IIm	p	p3
29	IId	P	p2	IIf	?	n
30	IIf	P	p1	IId	p	p3
31	IIf	P	p1	III	?	p3
32	IV	?	p1	IId	p	p3
33	IIf	P	p1	IIm	p	p3
34	IId	P	p1	IIm	p	p3
35	IId	P	p1	IId	p	p3
36	IIf	P	p1	IId	p	p3
37	IIf	P	p2	IIf	p	p3
38	IIm	P	p1	III	?	p3
39	III	?	p1	IIm	p	p3
40	IId	P	n	IIf	p	p3
41	IIf	P	p1	IId	p	p3
42	IIm	P	p1	IIm	p	p3
43	IId	P	p1	III	?	p3
44	IIf	P	p1	IId	p	p3
45	IId	P	p1	I	p	p3
46	IIm	P	p2	IId	p	p3
47	IIm	P	p1	IIf	p	p3
48	III	?	p1	IV	?	p3

49	IId	P	p1
50	IId	P	p1

**DO** : dilacération classique des ovaires ; **TI** : injection d'huile ; **n** : nullipare ; **p1** : unipare ; **p2** : bipare ; **p3** : tripare ; **p4** : quadripare ; **I**, **IId** (début), **IIm** (moyen), **IIf** (fin), **III** et **IV** : stades de développement des ovaires; **?**: échec de dilacération classique des ovaires / échec d'injection d'huile dans les ovaires / illisibilité

## 2.2. Structure des ovarioles chez les femelles nullipares et pares de *An. gambiae s.s.*

Tel que nous l'avons observé au microscope, la méthode de Polovodova appliquée par les techniques d'injection d'huile et de dilacération classique des ovaires révèle plusieurs types d'ovarioroles chez les femelles nullipares et pares de *An. gambiae s.s.* En général, nous avons observé des ovarioroles dépourvus de dilatations (photo 8) tandis que d'autres en présentaient une (photo 9) ou plusieurs (photos 10 et 11). Ainsi, les moustiques présentant au maximum une, deux et trois dilatations sont respectivement les moustiques ayant pondu une fois (unipares), deux fois (bipares) et trois fois (tripares). Ceux dépourvus de dilatations sont les femelles nullipares.



**Photo 8** : Ovariole dépourvu de dilatation  
(Photo CREC, 2013)



**Photo 9** : Ovariole à une dilatation  
(Photo CREC, 2013)





**Photo 10** : Ovariole à deux dilatations  
(Photo CREC, 2013)



**Photo 11** : Ovariole à trois dilatations  
(Photo CREC, 2013)

### **2.3. Comparaison entre la méthode usuelle de Detinova et celle de Polovodova basée sur l'injection d'huile dans les ovaires pour la détermination de la parturité chez *An. gambiae* s.s.**

En se basant sur la présence ou non de dilatations sur le pédicelle des ovarioles, la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile s'est montrée fiable pour la reconnaissance des *An. gambiae* s.s. nullipares et pares (tableau II). En effet, sur 50 moustiques qui n'ont jamais pondu (nullipares), la méthode usuelle de Detinova a reconnu 43 nullipares (86%) contre 42 (84%) pour la méthode de Polovodova par injection d'huile. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux taux ( $p=0,903$ ). De même, sur 148 femelles qui ont déjà pondu (pares), 85,14% ( $n=126$ ) et 96,62% ( $n=143$ ) ont été révélées pares respectivement par la méthode de Detinova et celle de Polovodova par injection d'huile. De même, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux taux ( $p=0,088$ ). Ces résultats montrent que les deux méthodes sont similaires pour la détermination de la parturité des moustiques. La méthode usuelle de Detinova n'a pas confirmé l'âge physiologique de la quasi-totalité des moustiques soumis à l'examen. La même tendance d'échec a été observée avec la méthode de Polovodova par injection d'huile dans les ovaires.

**Tableau II : Fiabilité de la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile pour la détermination de la parturité chez *An. gambiae s.s.***

Age	Méthodes	N Conformes	N Témoin	%Conformes	OR	IC-	P
						95%(OR)	
Nullipare	Detinova	43	50	86	1.00	-	-
	TIH	42	50	84	0.99	[0.89-1.10]	0.903
Pare	Detinova	126	148	85,14	1.00	-	-
	TIH	143	148	96,62	1.30	[0.98-1.73]	0.088

TIH : technique d'injection d'huile dans les ovaires, N : nombre de moustiques, IC : intervalle de confiance, OR : odds ratio, p : p-value

#### **2.4. Comparaison entre la méthode usuelle de Detinova et celle de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires pour la détermination de la parturité chez *An. gambiae s.s.***

La méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires est fiable pour la détermination de la parturité chez *An. gambiae s.s.* (tableau III). Parmi les 50 femelles nullipares, 44 (88%) ont été confirmées nullipares avec la méthode de Detinova. De même, 38 femelles (76%) ont été reconnues nullipares avec la méthode de Polovodova par dilacération classique des ovaires. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux taux ( $p=0,535$ ). Par ailleurs, sur 150 femelles pares, 88% ( $n=132$ ) ont été révélées pares avec la méthode de Detinova. Dans ce même lot de moustiques pares ( $n=150$ ), la méthode de Polovodova par dilacération classique des ovaires a confirmé l'âge physiologique de 92% ( $n=138$ ) des moustiques. Aucune différence significative n'a été aussi observée entre ces deux taux ( $p=0,593$ ). Ces résultats montrent que les deux méthodes sont aussi similaires pour la détermination de la parturité des moustiques. A l'instar de la méthode de Detinova, la méthode de Polovodova par dilacération des ovaires n'a pas confirmé l'âge physiologique de tous les moustiques soumis à l'examen.

**Tableau III** : Fiabilité de la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires pour la détermination de la parturité chez *An. gambiae s.s.*

Age	Méthodes	N Conformes	N Témoin	%Conformes	OR	IC-	P
						95%(OR)	
Nullipare	Detinova	44	50	88	1.00	-	-
	TDO	38	50	76	0.96	[0.87-1.07]	0.535
Pare	Detinova	132	150	88	1.00	-	-
	TDO	138	150	92	1.10	[0.83-1.46]	0.593

TDO : technique de dilacération classique des ovaires, N : nombre de moustiques, IC : intervalle de confiance, OR : odds ratio, p : p-value

## 2.5. Influence du stade de développement des ovaires sur la détermination de la parturité chez *An. gambiae s.s.* par les méthodes de Detinova et de Polovodova

Au total, 398 *An. gambiae s.s.* ont été examinés avec la méthode de Detinova pour la détermination de la parturité (tableau IV). Cette méthode a montré ses limites chez 53 moustiques dont la majorité (n=47) était au-delà du stade II de leur développement ovarien ( $p < 0,0001$ ).

La méthode de Polovodova a été appliquée sur 200 moustiques par dilacération classique des ovaires et sur 198 autres par injection d'huile dans les ovaires. Les moustiques dont nous n'avons pas pu déterminer l'âge physiologique (échecs) sont de 12% (n=24) avec la dilacération classique des ovaires et 6,57% (n=13) avec l'injection d'huile dans les ovaires. Quelle que soit la technique utilisée pour l'application de la méthode de Polovodova, les échecs sont observés aux stades I et II du développement des ovaires ( $p < 0,05$ ) (tableau IV).

Globalement, les indéterminations observées au niveau des deux méthodes sont liées au développement des ovaires. En effet, la méthode de Detinova présente ses limites au-delà du stade II. Cependant, la méthode de Polovodova appliquée par les techniques de dilacération classique et d'injection d'huile présente ses limites au début du développement ovarien entre les stades I et II.

**Tableau IV** : Relation entre le développement des ovaires et le pourcentage d'ovaires illisibles selon les méthodes de Detinova et de Polovodova

Stades	TDO				TIH				Detinova			
	Nb Ind	Total	% Ind	P	Nb Ind	Total	% Ind	P	Nb Ind	Total	% Ind	P
I	9	25	36.00a	0.0019	6	19	31.58a	0.0094	0	44	0.00b	<0.0001
II	15	149	10.07b		6	152	3.95b		6	301	1.99b	
III	0	18	0.00c		1	20	5.00b		33	38	86.84a	
IV	0	8	0.00c		0	7	0.00b		14	15	93.33a	
Total	24	200	12.00		13	198	6.57		53	398	13.32	

TDO : technique de dilacération classique des ovaires ; TIH : technique d'injection d'huile dans les ovaires; Ind : indétermination ; Nb : nombre d'indéterminations; p= p-value ; I, II, III et IV : stades de développement des ovaires ; les proportions portant de différentes lettres dans les colonnes sont significativement différentes

## 2.6. Efficacité de la méthode de Polovodova basée sur la technique de dilacération classique des ovaires dans la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.*

Au total nous avons examiné 200 *An. gambiae s.s.* d'âge physiologique connu avec la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires (tableau V). Les moustiques sont répartis en 04 échantillons de 50 spécimens chacun. Les 04 échantillons représentent respectivement des moustiques nullipares, unipares, bipares et tripares. La technique de dilacération classique des ovaires s'est montrée efficace pour la reconnaissance des moustiques nullipares et unipares. Cette technique a confirmé l'âge physiologique de 38 femelles nullipares (p=0,184) et 42 unipares (p=0,406). Cependant, la dilacération classique s'est montrée inefficace chez les moustiques multipares. En effet, sur 50 moustiques bipares, la dilacération classique des ovaires n'a reconnu que 07 (p<0,0001). De même, seulement 01 moustique a été révélé tripare sur les 50 soumis à la dilacération classique des ovaires (p<0,0001). Globalement, la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires n'est pas indiquée pour la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.*

**Tableau V** : Efficacité de la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires dans la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.*

Age	Echantillons	Nb			IC-		
		moustiques	Total	%	OR	95%(OR)	P
p0	Témoin	50	200	25	1.00	-	-
	TDO	38	200	19	0.70	[0.44-1.13]	0.184
p1	Témoin	50	200	25	1.00	-	-
	TDO	42	200	21	0.79	[0.50-1.27]	0.406
p2	Témoin	50	200	25	1.00	-	-
	TDO	7	200	3,5	0.11	[0.04-0.25]	<0.0001
p3	Témoin	50	200	25	-	-	-
	TDO	1	200	0,5	0.02	[0.002-0.01]	<0.0001

TDO : technique de dilacération classique des ovaires, p0 : nullipare, p1 : unipare, p2 : bipare, p3 : tripare, Nb : nombre, IC : intervalle de confiance, p : p-value, OR : odds ratio

## 2.7. Efficacité de la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile dans la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.*

198 *An. gambiae s.s.* ont été examinés avec la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile (tableau VI). La technique a été appliquée sur 04 échantillons représentant des moustiques nullipares (n=50), unipares (n=50), bipares (n=50) et tripares (n=48). Globalement, la technique d'injection d'huile a permis de confirmer le nombre de pontes chez 42 moustiques nullipares, 44 unipares, 46 bipares et 44 tripares. Quel que soit le degré de parturité, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre de pontes effectuées et le nombre de dilatations présentes sur les ovarioles après l'application de la technique d'injection d'huile ( $p > 0,05$ ). Ces résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation entre le nombre de pontes et le nombre de dilatations observées sur les ovarioles. La méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile est donc applicable pour la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.* Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas réussi à déterminer l'âge physiologique de la quasi-totalité des moustiques des quatre échantillons examinés.

**Tableau VI :** Efficacité de la méthode de Polovodova par injection d’huile dans les ovaires dans la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.*

Age	Echantillons	Nb		%		IC-	
		moustiques	Total	Conformité	OR	95%(OR)	P
p0	Témoin	50	198	25,25	1.00	-	-
	TIH	42	198	21,21	0.80	[0.55-1.27]	0.4049
p1	Témoin	50	198	25,25	1.00	-	-
	TIH	44	198	22,22	0.85	[0.53-1.34]	0.554
p2	Témoin	50	198	25,25	1.00	-	-
	TIH	46	198	23,23	0.90	[0.57-1.42]	0.725
p3	Témoin	48	198	24,24	1.00	-	-
	TIH	44	198	22,22	0.89	[0.55-1.42]	0.721

TIH: technique d’injection d’huile dans les ovaires, p0: nullipare, p1: unipare, p2: bipare, p3: tripare, Nb : nombre, IC : intervalle de confiance, p : p-value, OR : odds ratio

## 2.8. Influence du développement des ovaires sur la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.* par les techniques de dilacération classique des ovaires et d’injection d’huile dans les ovaires

Sur 200 *An. gambiae s.s.* examinés avec la méthode de Polovodova appliquée par la dilacération classique des ovaires, la méthode s’est révélée inefficace pour la détermination du nombre de pontes chez 112 (56%) moustiques (tableau VII). La répartition des lames non déterminées n’est pas significative suivant les stades de développement des ovaires ( $p=0,4948$ ). Par contre, une différence significative a été observée ( $P=0,0274$ ) avec les 22 (11,11%) échecs enregistrés sur les 198 moustiques soumis à la technique d’injection d’huile (Tableau VI). Toutefois, le taux d’ovaires illisibles n’est pas fonction du développement de ces ovaires. Ces résultats montrent que les nombres de pontes que nous n’avons pas pu déterminer (échecs) à partir des techniques d’injection d’huile et de dilacération classique ne sont pas liés au développement des ovaires. Mais, la majorité de ces échecs enregistrés avec l’injection d’huile (86,36%) et la dilacération classique des ovaires (88,39%) sont aux stades I et II.

**Tableau VII** : Relation entre le développement des ovaires et le nombre de pontes non déterminées par la méthode de Polovodova à partir des techniques d'injection d'huile et de dilacération classique des ovaires

Stades	TDO				TIH			
	N Ind	Total	% Ind	P	N Ind	Total	% Ind	P
I	11	25	44.00a	0.4948	6	19	31.58a	0.0274
II	88	149	59.06a		13	152	08.55b	
III	9	18	50.00a		1	20	05.00b	
IV	4	8	50.00a		2	7	28.57a	
Total	112	200	56		22	198	11.11	

TDO : technique de dilacération classique des ovaires ; TIH : technique d'injection d'huile dans les ovaires ;  
Ind : indétermination ; N : nombre ; p= p-value ; I, II, III et IV : stades de développement des ovaires ; les proportions portant de différentes lettres dans les colonnes sont significativement différentes

### 3. Discussion

La technique de dilacération classique des ovaires et celle d'injection d'huile (deux techniques de la méthode de Polovodova) nous ont permis d'avoir des informations très utiles sur les dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez *An. gambiae* s.s. En s'intéressant à la présence ou non des dites dilatations sur le pédicelle des ovarioles, il a été observé que quelle que soit la technique utilisée, la méthode de Polovodova était similaire à celle de Detinova habituellement utilisée pour la reconnaissance des femelles nullipares et pares de *An. gambiae* s.s. Les femelles nullipares dépourvues de dilatations sur leurs ovarioles présentaient des trachéoles ovariennes enroulées (pelotons). De plus, les moustiques ayant les trachéoles déroulées présentaient au moins une dilatation sur leurs ovarioles. Ainsi, les dilatations folliculaires peuvent être utilisées pour la reconnaissance des anophèles nullipares et pares. Ces résultats confirment des conclusions issues des travaux antérieurs (Lewis, 1958 ; Mondet, 1996).

Si la reconnaissance des anophèles nullipares et pares (parturité) était possible avec les deux techniques de la méthode de Polovodova, celle de la dilacération classique des ovaires serait la technique idéale à utiliser. L'injection d'huile dans les ovaires n'a pas été facile à réaliser et s'avérait même impossible pour nous au début des travaux. En général, il est difficile d'introduire la pointe de la micropipette dans l'ouverture externe de l'oviducte commun avant l'expulsion de l'huile de paraffine qui s'y trouve. Pour un habitué, la technique exige beaucoup de temps et de dextérité pour son application. Cette situation explique le faible nombre de moustiques examinés par la technique d'injection d'huile (6 à 8 spécimens à l'heure) au cours de nos séances de dissection. Or, pour être utilisable de façon systématique pour l'évaluation de l'efficacité des moyens de lutte antipaludique, une méthode d'estimation de l'âge physiologique doit être simple et assez rapide (Beklemishev *et al.*, 1959). A l'instar de la méthode de Detinova (1945) qui permet de déterminer l'âge physiologique de 50 à 60 moustiques à l'heure (Hamon *et al.*, 1961), la dilacération classique des ovaires n'est pas aussi difficile et permet d'examiner environ 70 spécimens à l'heure. Toutefois, cette technique demande une dextérité manuelle chez les moustiques qui sont au stade I-II moyen de leur développement ovarien. En réalité, au début de leur développement, les ovarioles sont plus accolés les uns aux autres au point où leur isolement demande plus d'application. C'est ce phénomène qui explique les quelques échecs d'isolement d'ovarioles qui constituent les indéterminations d'âge enregistrées aux stades I et II.

Tel que nous l'avons aussi observé, plusieurs travaux ont déjà montré que la méthode de Detinova basée sur l'aspect des trachéoles ovariennes n'est pas applicable au-delà du stade II



âgé (Hamon *et al.*, 1961 ; Hamon, 1963 ; Hugot *et al.*, 2008). A partir du stade II âgé, les réserves de vitellus deviennent énormes et recouvrent entièrement le réseau trachéolaire (Germain *et al.*, 1974 ; Cornet *et al.*, 1978). Ce phénomène explique l'illisibilité des ovaires après leur assèchement. Selon Mondet (1993), les pelotons comprimés entre deux ovarioles sont aussi difficiles à examiner quand ils se présentent de profil.

Les dilatations folliculaires sont visibles au-delà du stade II. Cette observation constitue un avantage dans la détermination de l'âge physiologique des anophèles dont les stades de développement ont déjà trop évolué (II âgé-IV). Dans ce contexte, les spécimens de *Anopheles gambiae* s.s. récoltés après capture par piège fenêtre et de la faune matinale résiduelle à l'intérieur des maisons, soit à la main à l'aide d'un aspirateur à bouche, soit après aspersion d'un insecticide non rémanent, peuvent être utilisés pour estimer leur longévité. En effet, si ces méthodes d'échantillonnage peuvent fournir des moustiques à jeun, les effectifs sont faibles et certains d'entre eux ont déjà pris un repas de sang partiel. En conséquence, parmi les moustiques des piège-fenêtres et de la faune résiduelle figurent des femelles dont le stade ovarien est au-delà du stade II âgé. Or, la méthode d'échantillonnage la plus utilisée est la capture sur homme qui permet d'obtenir des moustiques de stade I-II moyen favorisant la lecture des trachéoles ovariennes (Hamon, 1963 ; Mondet, 1993). Mais, ce type d'échantillonnage est en voie de disparition pour des raisons éthiques. Malgré toutes les précautions pour protéger les captureurs, certains, sous l'effet de la fatigue, se font piquer par les moustiques.

En dépit de toutes les difficultés liées à l'injection d'huile dans les ovaires, cette technique était la seule qui a fait preuve d'une bonne performance dans la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae* s.s. En effet, nous avons obtenu une bonne corrélation entre le nombre de pontes effectuées et le nombre de dilatations observées sur les ovarioles après l'application de la technique d'injection d'huile. Ces résultats sont similaires à ceux de Hoc & Wilkes (1995). L'efficacité de la technique d'injection d'huile est due à l'obtention d'ovarioles intacts favorisés par l'huile de paraffine une fois présente dans les espaces inter-ovariolaires. Toutefois, la technique d'injection d'huile ne confirmait pas le nombre de pontes effectuées pour la quasi-totalité des moustiques. Des échecs liés aux difficultés d'injection d'huile ont été notés surtout chez les moustiques nullipares de stade I-II début. La réceptivité de l'huile injectée est relativement faible chez les femelles nullipares, ce qui ne facilite pas l'isolement des ovarioles au début de leur développement. Il est vraisemblable que chez les femelles pares, le passage des œufs pondus aurait augmenté l'ouverture de la lumière du calice et de l'oviducte commun, ce qui n'est pas le cas chez les nullipares. Cependant, nous

avons noté des sous-estimations du nombre de pontes chez les femelles pares, ce qui avait été déjà rapporté (Rosay, 1969 ; Hoc & Wilkes, 1995). Plusieurs travaux ont déjà montré la fragilité du pédicelle des ovarioles susceptible de se rompre sur les moindres coups d'aiguille au cours de l'isolement des ovarioles (Hamon *et al.*, 1961 ; Hamon, 1963 ; Giglioli, 1965). Dans ces conditions, il est normal que des femelles multipares confirmées apparaissent comme des unipares voire nullipares n'ayant aucune dilatation sur leurs ovarioles (Brady, 1963). C'est sans doute cette fragilité du pédicelle des ovarioles qui est à la base de l'inefficacité de la dilacération classique des ovaires pour la détermination du nombre de pontes chez les moustiques. Selon Hamon *et al.* (1961), la fragilité du pédicelle pourrait varier en fonction de l'origine géographique des moustiques. Nous avons noté aussi des surestimations du nombre de pontes (Rosay, 1969 ; Bellamy & Corbet, 1974 ; Nayar & Knight, 1981) dont l'origine reste à élucider. La dégénérescence folliculaire à l'origine de la formation des dilatations a souvent lieu au stade II-III du cycle gonotrophique (Hoc & Charlwood, 1990 ; Fox & Brust, 1994). Ainsi, on peut penser que les dégénérescences cycliques observées au cours des cycles gonotrophiques subséquents justifient les surestimations du nombre de pontes enregistrées (Hoc, 1995). Il faut signaler que les surestimations et les sous-estimations du nombre de pontes étaient minoritaires dans nos échantillons. Ces observations corroborent celles de Hoc & Wilkes (1995) qui ont montré la raréfaction des surestimations et sous-estimations du nombre de pontes chez les moustiques sauvages en Tanzanie. Par ailleurs, les ovarioles sur lesquels le nombre de dilatations correspondait exactement au nombre de pontes sont faibles chez les moustiques (Hayashi & Kurihara, 1965 ; Liu, 1965 ; Hugo *et al.*, 2008). Il est donc nécessaire de faire une lecture minutieuse de la grande majorité des ovarioles avant de se prononcer sur le nombre de pontes des moustiques.

#### **4. Conclusions**

Les dilatations folliculaires peuvent être utilisées à partir de la dilacération classique des ovaires pour la reconnaissance des femelles nullipares et pares de *An. gambiae* s.s. L'observation de ces dilatations est possible au-delà du stade II âgé. Cependant, la dilacération des ovaires demande de dextérité manuelle, notamment chez les femelles qui sont au début de leur développement ovarien. En général, la méthode de Detinova basée sur l'aspect des trachéoles ovariennes demeure la méthode de base pour la détermination de l'âge physiologique des anophèles. Etant donné que la méthode de Detinova n'est pas applicable au-delà du stade II âgé, sa combinaison avec l'observation des dilatations folliculaires serait

l'idéale pour la détermination de la parturité des anophèles. Par ailleurs, en dépit de toutes les difficultés, l'application de la méthode de Polovodova par la technique d'injection d'huile dans les ovaires est fiable pour l'estimation du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.* Mais l'application de cette technique demande de temps, de dextérité manuelle et visuelle. Alors, la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile devrait être réservée pour les hommes entraînés et pour des fins de recherches approfondies.

## **Chapitre 4 :**

---

**Structure génétique liée au gène *Kdr* et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge physiologique chez *Anopheles gambiae s.s.***

## 1. Contexte et justification

Les moustiques sensibles sont plus exposés à l'effet létal des matériaux imprégnés d'insecticide (Ossè *et al.*, 2012). Dans ces conditions, les zones où la pression de sélection par les MILD ou la PID est forte, on devrait s'attendre à ce que les moustiques résistants soient plus âgés que les moustiques sensibles. Ainsi, la fréquence des génotypes RR du gène de résistance *Kdr* devrait être plus élevée chez les anophèles les plus âgés comparativement à celle des individus SS (hypothèse 1). Il existe à ce jour très peu d'études scientifiques ayant porté sur ces cas de sélection artificielle de certains génotypes suite à l'utilisation des insecticides.

Au cours de la prise de repas de sang sur l'homme, les anophèles prélèvent du sang infecté de *P. falciparum* responsable du paludisme (Boudin *et al.*, 1998). Dans la population humaine, la proportion d'individus porteurs de gamétocytes est souvent faible. De ce fait, il est rare que le premier repas soit infectant chez les anophèles (Hamon, 1963) d'où les faibles taux d'infectivité des anophèles au *Plasmodium* dans la nature. Comme il a été montré précédemment dans notre introduction générale, le risque d'infection des vecteurs du paludisme devrait augmenter avec le nombre de cycles gonotrophiques (hypothèse 2). Dans la pratique, il manque d'informations précises dans ce domaine. Globalement, c'est pour avoir de données précises sur les deux hypothèses relatives au portage du gène *Kdr* et à l'infectivité au *P. falciparum* des vecteurs que nous avons initié la présente étude.

Pour rappel, la relation entre l'âge physiologique et le portage du gène de résistance *Kdr* est étudiée sur des vecteurs collectés dans des habitations humaines (moustiques sauvages) utilisant les MILD et aussi sur des anophèles de souche de référence (Kis-SS et Kis-RR) élevés au laboratoire (témoin). Le choix des deux souches, Kisumu et sauvage, a été fait dans la perspective d'associer les résultats obtenus chez les moustiques sauvages à l'effet insecticide des MILD. L'utilisation des matériels biologiques de laboratoire (Kis-SS et Kis-RR) se justifie par la distribution généralisée des MILD au Bénin qui rend difficile le choix d'une zone témoin sans intervention. L'étude de la relation entre l'âge physiologique et l'infectivité au *P. falciparum* des femelles de *An. gambiae s.s* a été effectuée uniquement sur des vecteurs collectés dans des habitations humaines


Pour répondre aux objectifs de cette rubrique de la thèse, il a été question pour nous de :

- Collecter les moustiques et déterminer les espèces du complexe *An. gambiae s.l.*,
- Déterminer le degré de parturité des femelles de *An. gambiae s.s.*,
- Déterminer les génotypes possibles des femelles de *An. gambiae s.s.* pour le gène de résistance *kdr*,

- Evaluer un éventuel coût génétique associé à la résistance sur la longévité des femelles de *An. gambiae* s.s. et établir la relation entre l'âge physiologique et la structure génotypique du gène de résistance *Kdr* chez les femelles de *An. gambiae* s.s.,
- Déterminer la positivité des femelles de *An. gambiae* s.s. en protéine circumsporozoïtique de *P. falciparum*,
- Etablir la relation entre l'âge physiologique et l'infectivité au *P. falciparum* des femelles de *An. gambiae* s.s.

Les données relatives à ce chapitre sont publiées en partie dans l'**article 1**. L'article 5 (sous presse dans International Journal of mosquito research) est consacré au reste des données.

Anagonou et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:117  
DOI 10.1186/s13071-015-0731-7


**Parasites  
& Vectors**

RESEARCH
Open Access

## Application of Polovodova's method for the determination of physiological age and relationship between the level of parity and infectivity of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s, south-eastern Benin

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Roseric Azondékon<sup>1,3</sup>, Marc Agbogban<sup>1</sup>, Frédéric Oké Agbo<sup>1,2</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Kéfilath Badirou<sup>1,2</sup>, Ramziath Agbanrin-Youssouf<sup>1,2</sup>, Roseline Attolou<sup>1,2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Arthur Sovi<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

### **Relationship between physiological age, carrying knock down resistance gene and fecundity in *Anopheles gambiae* s.s**

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Michel Sèzonlin<sup>2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Bruno Akinro<sup>1,3</sup>, Rock Aïkpon<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,2</sup>, Arthur Sovi<sup>1,2</sup>, Zul Affolabi<sup>1</sup>, Martin Akogbéto<sup>1,2</sup> (sous presse dans International Journal of mosquito research)

## **2. Résultats**

### **2.1. Diversité culicidienne dans les villages de Itassoumba et Abomey-Takplikpo**

Le tableau VIII présente l'inventaire des moustiques récoltés entre juillet 2011 et octobre 2014 dans les localités de Itassoumba et Abomey-Takplikpo. Au total, 6422 spécimens de moustiques ont été récoltés sur homme, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire

dont 3165 (49,28%) à Itassoumba et 3257 (50,72%) à Abomey-Takplikpo. La faune culicidienne a été répartie respectivement en quatre (*Anopheles*, *Mansonia*, *Culex* et *Aedes*) et cinq genres (*Anopheles*, *Mansonia*, *Culex*, *Aedes* et *Uratenia*) dans les localités de Itassoumba et Abomey-Takplikpo où *Anopheles* est le genre majoritaire. Dix espèces de moustiques ont été identifiées à Itassoumba. Il s'agit de *An. gambiae*, *Anopheles pharoensis*, *Anopheles ziemanni*, *Aedes aegypti*, *Aedes vittatus*, *Aedes gr. palpalis*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex gr. decens*, *Culex nebulosus* et *Mansonia africana*. En plus de ces moustiques, d'autres espèces comme *Aedes luteocephalus*, *Culex tigripes*, *Culex annulioris*, *Culex spp* et *Uratenia billineata* ont été également collectées à Abomey-Takplikpo. L'espèce *An. gambiae s.s.* est le seul vecteur de paludisme rencontré dans les deux zones d'étude. Elle est prédominante (94,50%) au sein de la faune totale à Itassoumba où les autres espèces identifiées sont minoritaires. Cependant, une coprédominance de *M. africana* (33,53%) et de *An. gambiae s.s.* (33,10%) a été observée à Abomey-Takplikpo ( $p>0,05$ ). Ils sont suivis de *Cx quinquefasciatus* (11,54%) et *An. ziemanni* (7,09%). Les proportions des autres espèces identifiées à Abomey-Takplikpo sont faibles.

**Tableau VIII:** Diversité culicidienne dans les villages de Itassoumba et Abomey-Takplikpo, juillet 2011 à octobre 2014

Espèces de moustiques	Itassoumba		Abomey-Takplikpo	
	n	%	n	%
<i>Anopheles gambiae</i>	2991	94,50 <sup>a</sup>	1078	33,10 <sup>a</sup>
<i>Anopheles pharoensis</i>	1	0,03 <sup>c</sup>	85	2,61 <sup>d</sup>
<i>Anopheles ziemanni</i>	2	0,06 <sup>c</sup>	231	7,09 <sup>c</sup>
<i>Aedes aegypti</i>	9	0,28 <sup>c</sup>	27	0,83 <sup>e</sup>
<i>Aedes vittatus</i>	1	0,03 <sup>c</sup>	0	0,00 <sup>f</sup>
<i>Aedes luteocephalus</i>	0	0,00 <sup>c</sup>	3	0,09 <sup>f</sup>
<i>Aedes gr. palpalis</i>	3	0,09 <sup>c</sup>	2	0,06 <sup>f</sup>
<i>Culex quinquefasciatus</i>	59	1,86 <sup>b</sup>	376	11,54 <sup>b</sup>
<i>Culex gr decens</i>	2	0,06 <sup>c</sup>	17	0,52 <sup>e</sup>
<i>Culex nebulosus</i>	51	1,61 <sup>b</sup>	90	2,76 <sup>d</sup>
<i>Culex tigripes</i>	0	0,00 <sup>c</sup>	94	2,89 <sup>d</sup>
<i>Culex annulioris</i>	0	0,00 <sup>c</sup>	106	3,25 <sup>d</sup>
<i>Autres Culex</i>	0	0,00 <sup>c</sup>	47	1,44 <sup>e</sup>
<i>Mansonia africana</i>	46	1,45 <sup>b</sup>	1092	33,53 <sup>a</sup>
<i>Uratenia billineata</i>	0	0,00 <sup>c</sup>	9	0,28 <sup>ef</sup>
Total	3165	100,00	3257	100,00

n : nombre de moustiques, les proportions portant de différentes lettres sont significativement différentes

## 2.2. Comparaison des densités de *An. gambiae* s.s. collectées sur homme la nuit, par piège fenêtre et par aspersion intradomiciliaire

Le tableau IX présente le nombre de vecteurs *An. gambiae* s.s. récoltés par type d'échantillonnage de moustiques entre juillet 2011 et octobre 2014 dans les localités de Itassoumba et Abomey-Takplikpo.

Parmi les 2991 femelles de *An. gambiae* s.s. collectées à Itassoumba, 76,60% (n=2291), 21,20% (n=634) et 2,21% (n=66) sont respectivement capturées sur homme, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire (tableau IX). La comparaison des densités anophéliennes obtenues avec les trois types d'échantillonnage montre que la capture sur homme est le meilleur type d'échantillonnage des vecteurs suivi de la capture par piège-fenêtre ( $P<0,001$ ) (tableau IX). La même tendance a été observée à Abomey-Takplikpo où 1078 *An. gambiae* s.s. ont été capturés dont 81,91% (n=883) sur homme, 10,95% (n=118) par piège-fenêtre et 7,14% (n=77) par aspersion intradomiciliaire ( $P<0,001$ ) (tableau IX).

**Tableau IX** : Comparaison des densités de *An. gambiae* s.s. collectées sur homme, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire

Types de capture	Itassoumba		Abomey-Takplikpo	
	n	%	n	%
Appât humain	2291	76,60 <sup>a</sup>	883	81,91 <sup>a</sup>
Piège-fenêtre	634	21,20 <sup>b</sup>	118	10,95 <sup>b</sup>
Aspersion intra-domicil	66	2,21 <sup>c</sup>	77	7,14 <sup>c</sup>
Total	2991	100	1078	100

n : nombre de moustiques, les proportions portant de différentes lettres dans les colonnes sont significativement différentes

## 2.3. Etude de l'âge physiologique des femelles de *An. gambiae* s.s. en fonction des types d'échantillonnage de moustiques

Le tableau X montre les résultats de l'étude comparative de la structure de l'âge physiologique des anophèles collectés sur homme, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire dans les villages de Itassoumba et Abomey-Takplikpo. Les 450 anophèles disséqués à Itassoumba sont constitués de 200 spécimens des captures sur homme, 200 des captures par piège-fenêtre et 50 des captures par aspersion intradomiciliaire. De même, sur les



460 anophèles disséqués à Abomey-Takplikpo, 200, 200 et 60 ont été capturés respectivement sur homme, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire.

Dans les deux zones d'étude, le nombre de pontes effectuées par les moustiques échantillonnés est compris entre zéro et quatre (tableau X). A Abomey-Takplikpo, les proportions de moustiques nullipares collectés avec les trois types d'échantillonnage sont comparables ( $P>0,05$ ) (tableau X). Cependant, à Itassoumba, le taux de 42% ( $n=84$ ) de femelles nullipares collectées sur homme est significativement plus élevé que les taux similaires de 25,5% ( $n=51$ ) et 24% ( $n=12$ ) obtenus respectivement avec les piège-fenêtres et l'aspersion intradomiciliaire (tableau X). Dans les deux localités, aucune différence significative n'a été observée entre les taux de femelles unipares et multipares collectées avec les trois méthodes d'échantillonnage ( $P>0,05$ ) (tableau X). Globalement, sauf Itassoumba où le taux de femelles nullipares capturées sur homme est plus élevé que les taux similaires obtenus avec les piège-fenêtres et l'aspersion intradomiciliaire, les taux de femelles collectées avec les trois types d'échantillonnage sont comparables dans les deux localités, quel que soit le degré de parturité des moustiques.

**Tableau X** : Comparaison de l'âge physiologique des femelles de *An. gambiae* s.s. capturées avec différents types d'échantillonnage à Itassoumba et Abomey-Takplikpo

Age	Itassoumba						Abomey-Takplikpo					
	Appât humain		Piège-fenêtre		Asper intra		Appât humain		Piège-fenêtre		Asper intra	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	84	42 <sup>a</sup>	51	25,5 <sup>b</sup>	12	24 <sup>b</sup>	67	33,5 <sup>a</sup>	46	23 <sup>a</sup>	19	31,67 <sup>a</sup>
1	62	31 <sup>a</sup>	87	43,5 <sup>b</sup>	22	44 <sup>ab</sup>	70	35 <sup>a</sup>	81	40,5 <sup>a</sup>	26	43,33 <sup>a</sup>
2	32	16 <sup>a</sup>	41	20,5 <sup>a</sup>	11	22 <sup>a</sup>	40	20 <sup>a</sup>	50	25 <sup>a</sup>	9	15 <sup>a</sup>
3	16	8 <sup>a</sup>	13	6,5 <sup>a</sup>	4	8 <sup>a</sup>	14	7 <sup>a</sup>	17	8,5 <sup>a</sup>	4	6,67 <sup>a</sup>
4	6	3 <sup>a</sup>	8	4 <sup>a</sup>	1	2 <sup>a</sup>	9	4,5 <sup>a</sup>	6	3 <sup>a</sup>	2	3,33 <sup>a</sup>
Total	200	100	200	100	50	100	200	100	200	100	60	100

0 : nullipare, 1 : unipare, 2 : bipare, 3 : tripare, 4 : quadripare, asper : aspersion, intra : intradomiciliaire, n : nombre de moustiques, les proportions portant de différentes lettres sur les lignes sont significativement différentes

## 2.4. Etude du coût génétique associé à la résistance sur la longévité des femelles de *An. gambiae* s.s.

Sur 128 femelles Kisumu-SS gorgées, 61 (47,66%) sont parvenues à la première ponte, 42 (32,81%) à la deuxième ponte et 25 (19,53%) à la troisième ponte. De même, parmi les 111 anophèles Kisumu-RR gorgés, 55 (49,55%), 38 (34,23%) et 18 (16,22%) sont arrivées respectivement à une, deux et trois pontes. Quel que soit le degré de parturité, aucune différence significative n'a été observée entre les taux de survie des deux souches d'anophèles ( $P>0,05$ ) (tableau XI). Ces résultats montrent qu'il n'existe aucun coût génétique associé à la résistance sur la longévité des anophèles.

**Tableau XI:** Distribution des anophèles souche Kisumu (Kis-SS) et la souche porteuse du gène de résistance (Kis-RR) suivant le nombre de pontes

Age	Kis-SS		Kis-RR		P-value
	n	%	n	%	
1	61	47,66	55	49,55	0,871
2	42	32,81	38	34,23	0,924
3	25	19,53	18	16,22	0,620
Total	128	100,00	111	100,00	-

Kisumu : Kis, SS : homozygote sensible, RR : homozygote résistant

## 2.5. Relation entre l'âge physiologique et le portage du gène *Kdr* chez les *An. gambiae* s.s capturés à l'intérieur des habitations à Itassoumba et Abomey-Takplikpo

La mutation *Kdr* étant récessive, nous avons considéré les vecteurs de génotypes RS et SS comme des spécimens sensibles. Les moustiques de génotype RR sont les spécimens résistants.

A Abomey-Takplikpo, sur 400 anophèles passés à la PCR pour la recherche de la mutation *Kdr*, 323 et 77 sont respectivement des spécimens résistants et sensibles. Les moustiques les plus âgés des spécimens résistants et sensibles ont pondu quatre fois. En comparant les proportions de moustiques obtenus à différents niveaux d'âge entre les deux types de spécimens, aucune différence significative n'a été observée (tableau XII). 26,32% (n=85) des moustiques résistants sont des nullipares contre 24,68% (n=19) chez les sensibles ( $P=0,88$ ) ; 44,89% (n=145) des résistants sont des unipares contre 53,25% (n=41) chez les sensibles ( $P=0,23$ ). La même tendance a été observée chez les femelles multipares (tableau XII). A Itassoumba, nous avons observé aussi les mêmes tendances avec les 336 moustiques résistants et les 64 sensibles obtenus sur les 400 anophèles passés à la PCR (tableau XII). Il ressort de

ces observations que les moustiques résistants et les sensibles ont la même espérance de vie dans les habitations humaines utilisant les MILD.

**Tableau XII** : Répartition des moustiques sensibles et résistants suivant le degré de parturité à Abomey-Takplikpo et Itassoumba

Age	Abomey-Takplikpo					Itassoumba				
	RR		RS+ SS		p-value	RR		RS+ SS		p-value
	n	%	n	%		n	%	n	%	
0	85	26,32	19	24,68	0,88	96	28,57	14	21,88	0,34
1	145	44,89	41	53,25	0,23	139	41,37	31	48,44	0,36
2	67	20,74	10	12,99	0,16	77	22,92	12	18,75	0,75
3	22	6,81	5	6,49	1	18	5,36	6	9,38	0,34
4	4	1,24	2	2,6	0,72	6	1,79	1	1,56	1
Total	323	100	77	100	-	336	100	64	100	-

0 : nullipare, 1 : unipare, 2 : bipare, 3 : tripare, 4 : quadripare, n : nombre de moustiques, SS : homozygote sensible, RR : homozygote résistant, RS : hétérozygote

## 2.6. Relation entre l'âge physiologique et la fécondité des anophèles sensibles et résistants

Sur 101 anophèles de souche Kis-SS et 88 autres de souche Kis-RR examinés, les nombres moyens d'œufs pondus sont respectivement de 127 et 124. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux taux ( $P=0,376$ ) (tableau XIII). Ces résultats montrent qu'il n'existe aucun coût génétique associé à la résistance sur la fécondité des anophèles.

Chez les anophèles unipares ( $n=50$ ) de souche Kis-SS, la moyenne de 157 œufs pondus a connu une diminution significative allant à 130 chez les bipares ( $n=31$ ) [RR (bipare/unipare) = 0,72 ( $p=0,007$ )] et à 92 chez les tripares ( $n=20$ ) [RR (tripare/unipare) = 0,59 ( $p<0,001$ )] (tableau XIII). On note une baisse considérable de la fécondité suivant l'âge physiologique des moustiques. La même tendance a été observée chez les femelles de souche Kis-RR où la moyenne de 148 œufs pondus par les femelles unipares ( $n=45$ ) a connu une baisse modérée allant à 122 chez les bipares ( $n=28$ ) [RR (bipare/unipare) = 0,82 ( $p=0,11$ )] avant de chuter significativement à 102 chez les tripares ( $n=15$ ) [RR (tripare/unipare) = 0,69 ( $p=0,004$ )] (tableau XIII). Ces résultats montrent que la fécondité des anophèles diminue avec le nombre de cycles gonotrophiques.

**Tableau XIII** : Relation entre l'âge physiologique et la fécondité des anophèles Kis-SS et Kis-RR

Age	Souche Kis-SS			Souche Kis-RR		
	Nb mstq	Nb moy œufs	IC	Nb mstq	Nb moy œufs	IC
1	50	157	[133,4-184,5]	45	148	[125,1-173,8]
2	31	130	[108,6-154,4]	28	122	[101,3 -145,7]
3	20	92	[74,2 -112,8]	15	102	[83,1 -123,8]
Total	101	127	[105,8-151,1]	88	124	[103,1-147,8]

1: unipare, 2: bipare, 3: tripare, SS: homozygote sensible, Kiss : Kisumu, RR: homozygote résistant, Nb: nombre de moustiques, mstq : moustique, moy : moyenne, IC : intervalle de confiance

## 2.7. Relation entre l'âge physiologique et l'infectivité au *P. falciparum* des femelles de *An. gambiae* s.s. à Itassoumba et Abomey-Takplikpo

La présente étude a été effectuée sur 600 *An. gambiae* s.s. de différents niveau d'âge physiologique dans chacune des deux localités. Les taux d'infectivité moyens sont respectivement de 2,33% (n=14) et 3% (n=18) à Abomey-Takplikpo et Itassoumba. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux taux ( $p>0,591$ ) (tableau XIV). Dans les deux localités, les anophèles infectés sont ceux ayant pondu au moins deux fois. A Abomey-Takplikpo, le taux d'infectivité de 4,17% (n=6) chez les moustiques bipares a connu une augmentation significative allant à 15,63% (n=5) chez les femelles tripares [OR (tripare/bipare) = 4,25 [1,21–14,96] ( $p=0,03$ )] et 37,50% (n=3) chez les quadripares [OR (quadripare/bipare) = 13,8 [2,65–71,74] ( $p=0,007$ )] (tableau XIV). On note une augmentation considérable du taux d'infectivité suivant l'âge physiologique des vecteurs. Le même constat a été fait à Itassoumba où le taux d'infectivité de 5,39% (n=9) chez les moustiques bipares a connu une augmentation significative allant à 17,24% (n=5) chez les femelles tripares [OR (tripare/bipare) = 3,65 [1,13–11,84] ( $p=0,04$ )] et 30,77% (n=4) chez les quadripares [OR (quadripare/bipare) = 7,80 [2,01–30,27] ( $p=0,008$ )] (tableau XIV). Il ressort de ces observations que le taux d'infectivité des moustiques augmente significativement avec le nombre de cycles gonotrophiques.

**Tableau XIV** : Taux d'infectivité au *P. falciparum* en fonction de l'âge physiologique des femelles de *An. gambiae s.s.* à Abomey-Takplikpo et Itassoumba

Age	Abomey-Takplikpo				Itassoumba			
	n testé	Cs+	%Cs+	IC	n testé	Cs+	%Cs+	IC
0	164	0	0,00	[0 - 2,85]	153	0	0,00	[0 - 3,05]
1	252	0	0,00	[0 - 1,87]	238	0	0,00	[0 - 1,98]
2	144	6	4,17	[1,71 - 9,24]	167	9	5,39	[2,65 - 10,30]
3	32	5	15,63	[5,8 - 33,55]	29	5	17,24	[6,52 - 36,49]
4	8	3	37,50	[10,2 - 17,11]	13	4	30,77	[10,3 - 61,12]
	600	14	2,33	[1,33 - 3,99]	600	18	3	[1,84 - 4,79]

n= nombre de moustiques, CS+= positivité en protéine circumsporozoïtique de *P. falciparum*, IC= intervalle de confiance, %CS+= taux d'infectivité, 0 : nullipare, 1 : unipare, 2 : bipare, 3 : tripare, 4 : quadripare.

### 3. Discussion

Nos enquêtes montrent que la faune culicidienne est plus riche et plus diversifiée à Abomey-takplikpo qu'à Itassoumba, deux villages situés au sud-est du Bénin. La richesse spécifique de moustiques à Abomey-Takplikpo est due à une variabilité et à la dynamique des gîtes larvaires naturels ou artificiels, productifs de micro-écologie et de tailles différentes (Doannio *et al.*, 2006). Le seul vecteur *An. gambiae* s.s. présent dans les deux localités devrait faciliter le contrôle de la transmission du paludisme. Là où deux espèces du complexe coexistent, le contrôle du paludisme devient plus difficile, chaque espèce ayant son comportement vis-à-vis de l'homme (Burgess, 1960 ; Coz *et al.*, 1966 ; Pringle, 1962). A Itassoumba, *An. gambiae* s.s. représente la grande majorité (94,50%) des moustiques récoltés. La prédominance de *An. gambiae* s.s. dans la localité de Itassoumba avait été antérieurement observée par Sovi *et al.* (2013) et Tokponnon *et al.* (2014). Cela se justifie par la présence de nombreux bassins piscicoles et d'un périmètre maraîcher qui sont des sources potentielles de développement des larves d'anophèles. Carnevale *et al.* (1979) étaient déjà parvenus à une telle conclusion. Dans la localité de Abomey-Takplikpo, il a été noté une coprédominance de *An. gambiae* s.s. (33,10%) et *M. africana* (33,53%). Ces résultats corroborent ceux de Ossè *et al.* (comm ; pers.). Ce phénomène est lié à la présence de bas-fonds à eau ensoleillée recouverte d'herbes par endroits, constituant des gîtes mixtes favorables au développement des larves de *Mansonia* et de *Anopheles*.

Dans les deux sites d'étude, la collecte des moustiques a été faite sur homme la nuit, par piège-fenêtre et par aspersion intradomiciliaire. La capture sur homme a été le meilleur type d'échantillonnage des anophèles dans les deux localités. Ces résultats confirment ceux de plusieurs auteurs (Bailly-choumara, 1973 ; Dossou-yovo *et al.*, 1998 ; Zahouli *et al.*, 2011). La bonne performance des captures sur homme dans la collecte des vecteurs est imputable à la forte attraction olfactive et trophique des humains dans les deux sites d'étude. Dans ces deux zones d'étude, les proportions de moustiques âgés collectés sont comparables au niveau des trois types d'échantillonnage utilisés. Ces résultats indiquent que la collecte des vecteurs âgés n'est pas liée à un type d'échantillonnage. Cependant, à Itassoumba, la fréquence des jeunes femelles nullipares collectées sur homme est plus élevée que les fréquences similaires obtenues avec la capture par piège-fenêtre et l'aspersion intradomiciliaire. La présence des bassins piscicoles à Itassoumba entraîne une forte pullulation des anophèles avec un taux élevé de femelles nullipares dont le besoin de repas de sang est accru. Alors, les femelles nullipares sont attirées par les captureurs où la majorité d'elles sont piégées.

Au laboratoire, la longévité des anophèles Kis-SS (homozygotes sensibles) est comparable à celle des anophèles Kis-RR (homozygotes résistants). On peut dire en approximation qu'il n'existe aucun coût ou fardeau génétique associé à la résistance (*Kdr*) sur la longévité des moustiques. Cette interprétation doit être nuancée étant donné qu'il s'agit des populations de laboratoire dont la diversité génétique est faible du fait des accouplements préférentiels et de la dérive génétique. Il n'est donc pas exclu que les populations de moustiques rencontrés dans la nature présente un coût génétique associé à la résistance sur leur longévité. Il serait donc souhaitable qu'il y ait d'autres expériences sur des populations issues des milieux naturels afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus à l'issue de cette étude. Alternativement, il n'est pas exclu qu'un fardeau génétique lié à la longévité des moustiques soit porté par un autre gène ou un groupe de gènes dont les effets sont cumulatifs.

Contrairement à ce à quoi on s'attendait dans la population des moustiques capturés dans les habitations humaines utilisant les moustiquaires imprégnées d'insecticides, la longévité des moustiques sensibles et celle des moustiques résistants étaient comparables dans les localités de Itassoumba et Abomey-Takplikpo. En théorie, dans les habitations humaines utilisant les moustiquaires imprégnées d'insecticide (pyréthrinoïdes) à longue durée d'action, les moustiques résistants de génotype RR devraient vivre plus longtemps comparativement aux individus sensibles SS et RS. Les résultats contraires auxquels nous sommes parvenus montrent que l'effet létal des matériaux imprégnés ne sélectionne pas spécifiquement, parmi les moustiques qui entrent en contact avec l'insecticide, ceux qui sont sensibles. Ces observations confirment les travaux de Ossè *et al.* (2013). Dans ces conditions, tel que plusieurs auteurs l'ont déjà rapporté (Sovi *et al.*, 2014 ; Ossè *et al.*, 2013 ; Aizoun *et al.*, 2013), la mutation *Kdr* montrée dans la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes (Chandre *et al.*, 1999 ; Diabaté *et al.*, 2002 ; Akogbéto *et al.*, 2005) n'est pas probablement le seul mécanisme impliqué. Il a été montré que d'autres mécanismes, notamment des mécanismes enzymatiques sont impliqués dans cette résistance (Djouaka *et al.*, 2008 ; Aikpon *et al.*, 2014).

Si les moustiques sensibles ont pu survivre comme les résistants dans les habitations humaines, on peut aussi penser à une résistance comportementale (Haubruge & Amichot, 1998). Le mécanisme de résistance comportementale peut être dépendant du stimulus, ce qui implique une reconnaissance de la substance toxique par des récepteurs sensoriels de l'insecte créant une irritabilité (qui pousse l'insecte à quitter l'environnement toxique au contact de l'insecticide) et une répulsion (qui permet à l'insecte d'éviter le contact avec le pesticide) (Davidson, 1953). Ce type de mécanisme se rencontre essentiellement chez les Diptères. Les

adultes de *Haematobia irritans* au contact de la perméthrine ou de la deltaméthrine augmentent leur mobilité de manière à minimiser le temps de contact avec le pesticide (Lockwood *et al.*, 1984). Il n'existe aucun coût génétique associé à la résistance sur la fécondité des anophèles ce qui montre indirectement que le portage du gène de résistance *Kdr* n'a pas un impact sur la prolifération des anophèles. Nos travaux ont montré que la fécondité des moustiques diminue avec le nombre de pontes. Ces résultats sont similaires à ceux de Pajot (1976) et Briegel *et al.* (2002). Putnam & Shannon (1934) estiment que chaque ponte de *Aedes aegypti* contient 15 % d'œufs en moins que la précédente. Selon Pajot (1976), ce déclin de la fécondité s'explique par le fait qu'avec l'âge, la proportion des ovarioles qui produisent des œufs normaux diminue tandis que celle des ovarioles qui donnent des follicules dégénérés augmente. Quant à Briegel *et al.* (2002), au cours des cycles gonotrophiques, en dépit d'une quantité de sang ingérée à peu près stable dans le temps, de plus en plus de lipides nouvellement formés sont stockés dans les corps gras au détriment de la formation des œufs, ce qui a pour conséquence une baisse de la fécondité. Tous ces phénomènes entraînant la baisse de la fécondité reposent sur le vieillissement physiologique des moustiques.

Les taux d'infectivité moyens obtenus dans les populations de moustiques disséqués à Itassoumba et Abomey-Takplikpo sont similaires. Cette situation pourrait se justifier par la similarité des facteurs épidémiologiques, principalement les conditions climatiques et les habitudes à se protéger contre les piqûres de moustiques qui sont les mêmes dans les deux localités. A Itassoumba comme à Abomey-Takplikpo, les moustiques infectés au *P. falciparum* sont ceux ayant pondu au moins deux fois. Cette observation se justifie par la durée de la période d'incubation extrinsèque du *P. falciparum* qui est de 10 à 12 jours. C'est au bout de cette période que le moustique devient infectant (McDonald, 1957). Or, cette période est largement supérieure à la durée du cycle gonotrophique qui est de 4 à 5 jours à la première ponte chez *An. gambiae s.l.* (Beklemishev, 1940). Hamon (1963) a même montré qu'un anophèle ne peut transmettre le paludisme s'il est âgé de moins de deux semaines car la proportion d'êtres humains porteurs de gamétocytes est faible et, qu'il est rare que le premier repas soit infectant. Cette idée explique le fait que le taux d'infectivité des moustiques à Itassoumba soit de 5,39% chez les bipares, 17,34% chez les tripares et 30,77% chez les quadripares. A Abomey-Takplikpo, ce taux est de 4,17% chez les moustiques bipares, 15,63% chez les tripares et 37,50% chez les quadripares. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le risque d'infection des vecteurs augmente avec le nombre de repas de sang et par conséquent avec le nombre de pontes (Beklemishev *et al.*, 1959). Cela témoigne de l'objectif



principal de la pulvérisation intradomiciliaire qui vise à détruire les moustiques avant qu'ils atteignent un âge épidémiologiquement dangereux (Hamon, 1963).

#### **4. Conclusions**

*Anopheles gambiae* s.s. est le seul vecteur du paludisme dans les localités de Itassoumba et Abomey-Takplikpo. Dans ces deux localités utilisant les moustiquaires imprégnées d'insecticides, les moustiques résistants et les sensibles ont la même durée de vie. La longévité des moustiques ne serait pas seulement liée au portage du gène de résistance *Kdr*. Les anophèles infectés au *P. falciparum* sont ceux ayant pondu au moins deux fois. De plus, la probabilité d'être infecté augmente avec le nombre de cycles gonotrophiques chez les vecteurs. Ainsi, les anophèles les plus âgés sont les plus infectés au *Plasmodium*. Sur le plan pratique, la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dont le principe est de réduire la longévité des anophèles est la meilleure stratégie pour éviter que les moustiques développent plusieurs cycles gonotrophiques, et donc atteignent un âge épidémiologiquement dangereux.

## **Chapitre 5 :**

---

**Comportement trophique des femelles multipares de *Anopheles gambiae s.s.* et dynamique de la transmission du *Plasmodium falciparum***

## 1. Contexte et justification

Les résultats du chapitre précédent ont montré clairement que les anophèles les plus âgés sont les plus infectés au *P. falciparum*. Les moustiques infectés, épidémiologiquement dangereux, sont les femelles multipares ayant pondu au moins deux fois. Etant donné que la transmission du paludisme à l'homme se fait essentiellement la nuit, il s'avère utile d'étudier le rythme d'activité des vecteurs multipares ainsi que les périodes favorables à leur infectivité au *P. falciparum* pendant la nuit. Le but précis de ce chapitre de la thèse est d'établir la corrélation éventuelle entre le rythme d'activité des anophèles épidémiologiquement dangereux et les heures de transmission du paludisme.

Les données relatives à ce chapitre sont en cours de publication dans l'**article 6** (sous presse dans Parasites and Vectors).

### **Feeding behavior of multiparous *Anopheles gambiae* s.s females and transmission dynamics of *Plasmodium falciparum* in south eastern Republic of Benin**

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Bruno Akinro<sup>1,3</sup>, Martin Akogbéto<sup>1,2</sup> (sous presse dans Parasites and Vectors)

## 2. Résultats

### **2.1. Comportement trophique et cycle d'agressivité des femelles de *An. gambiae* s.s. à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Itassoumba**

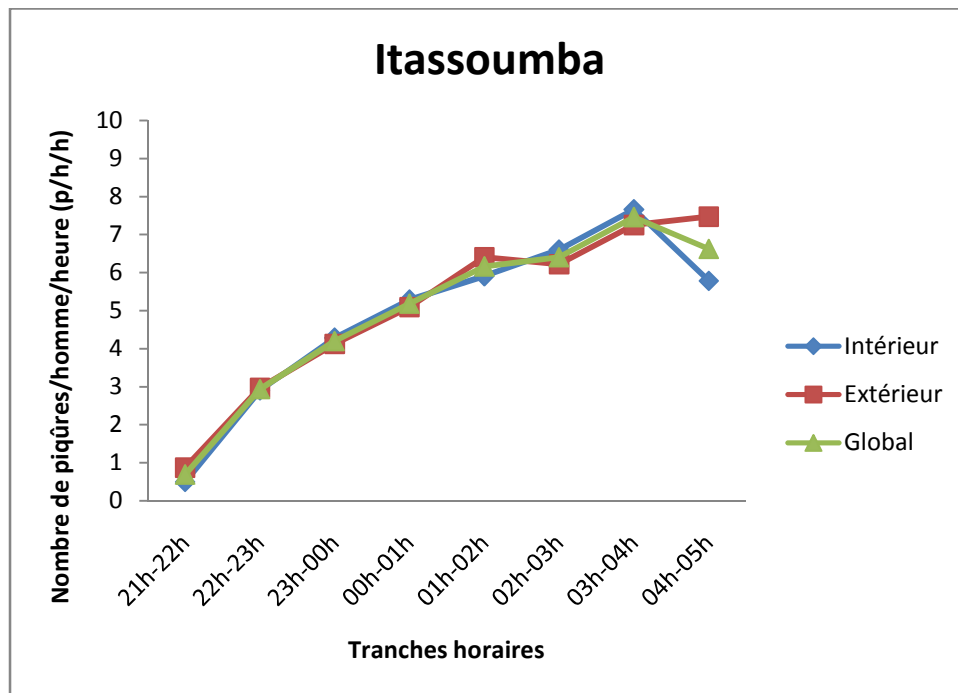
A Itassoumba, sur 2538 *An. gambiae* s.s, 49,05% (n=1245) ont été capturés sur homme à l'intérieur des habitations contre 50,95% (n=1293) à l'extérieur. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux taux de piqûre ( $p = 0,187$ ). Dans la zone d'étude, les taux de piqûre sont similaires à l'intérieur comme à l'extérieur des habitations.

Dans le village de Itassoumba, le cycle d'agressivité des femelles de *An. gambiae* s.s. se présente comme suit:

- A partir de 21 heures, les faibles agressivités de 0,5 piqûre par homme par heure (p/h/h) à l'intérieur et 0,88 p/h/h à l'extérieur augmentent progressivement pour atteindre respectivement 5,91 et 6,41 p/h/h à 02 heures du matin (figure 8).
- Entre 02 heures et 05 heures du matin, l'agressivité maximale de 7 p/h/h environ est presque stable à l'extérieur des habitations (figure 8). A l'intérieur, le rythme de

piqûre s'intensifie pour atteindre un pic (7,66 p/h/h) entre 03 heures et 04 heures avant de chuter à 5,78 p/h/h autour de 05 heures du matin (figure 8).

A l'intérieur comme à l'extérieur des habitations, les femelles de *An. gambiae s.s.* présentent une forte agressivité pendant la deuxième moitié de la nuit. Cette agressivité est plus accentuée vers la fin de la nuit à l'extérieur des habitations. Le cycle d'agressivité global des femelles de *An. gambiae s.s.* présente un pic (7,45 p/h/h) entre 03 heures et 04 heures du matin à Itassoumba (figure 8).



**Figure 8** : Cycle d'agressivité des femelles de *An. gambiae s.s.* capturées sur homme à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Itassoumba

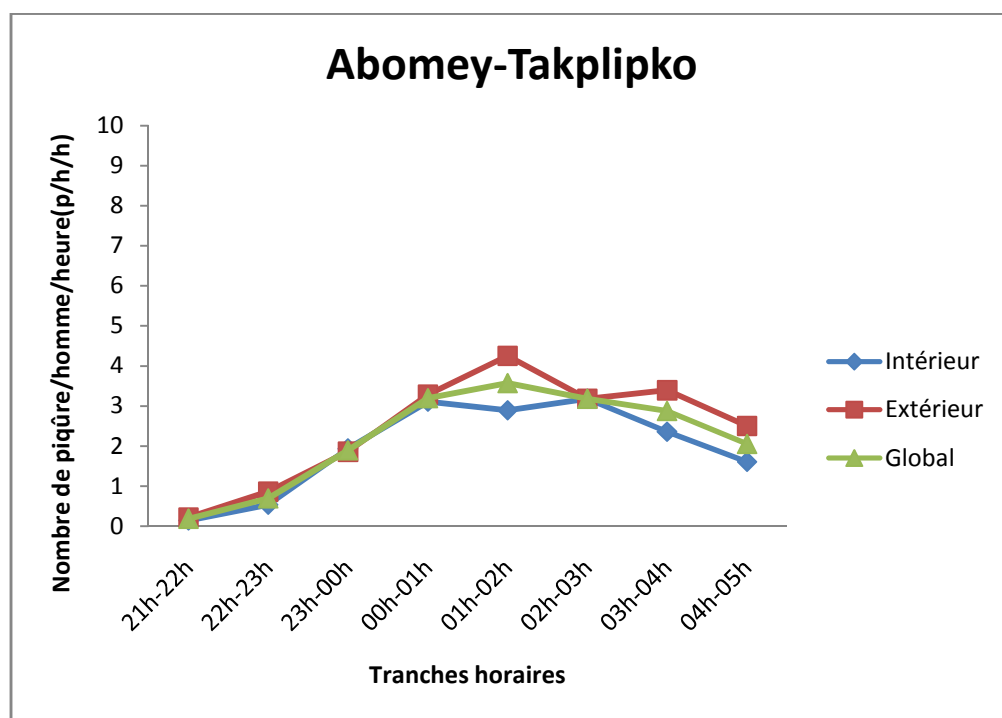
## 2.2. Comportement trophique et cycle d'agressivité des femelles de *An. gambiae s.s.* à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Abomey-Takplikpo

A Abomey-Takplikpo, sur 988 *An. gambiae s.s.*, 55,36% (n=547) et 44,64% (n=441) ont été capturés respectivement à l'extérieur et à l'intérieur des habitations. Il existe une différence significative entre les deux taux ( $P < 0,001$ ). Ainsi, dans cette localité, les femelles de *An. gambiae s.s.* se nourrissent aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations avec une préférence pour l'extérieur.

Dans le village de Abomey-Takplikpo, le cycle d'agressivité des femelles de *An. gambiae s.s.* se présente comme suit:

- A partir de 21 heures, les faibles agressivités de 0,14 p/h/h à l'intérieur et 0,21 p/h/h à l'extérieur augmentent progressivement pour atteindre respectivement 3,11 et 3,29 p/h/h à 01 heure du matin (figure 9).
- Entre 01 heure et 03 heures du matin à l'intérieur des habitations, l'agressivité maximale de 3 p/h/h environ est restée presque stable avant de chuter progressivement à 1,61 p/h/h vers 5 heures du matin (figure 9). A l'extérieur, l'activité de piqûre s'intensifie pour atteindre un pic (4,25 p/h/h) entre 01 heure et 02 heures matin avant de descendre progressivement à 2,5 p/h/h à 05 heures du matin (figure 9).

A l'intérieur comme à l'extérieur des habitations, les femelles de *An. gambiae s.s.* présentent une forte agressivité pendant la deuxième moitié de la nuit. Le cycle d'agressivité global des femelles de *An. gambiae s.s.* présente un pic (3,57 p/h/h) entre 01 heure et 02 heures du matin à Abomey-Takplikpo (Figure 9).



**Figure 9** : Cycle d'agressivité des femelles de *An. gambiae s.s.* capturées sur homme à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à Abomey-Takplikpo

### **2.3. Rythme d'activité en fonction de l'âge physiologique des femelles de *An. gambiae* s.s. à Itassoumba et à Abomey-Takplikpo**

A Itassoumba, 1008 femelles de *An. gambiae* s.s. ont été disséquées. Dans ce lot de moustiques, 28,77% (n=290) n'ont jamais pondu (nullipares) ; 28,00% (n=383) ont pondu une fois (unipares) ; 25,89% (n=261) ont pondu deux fois (bipares) ; 5,56% (n=56) ont pondu trois fois (tripares) et 1,79% (n=18) ont pondu quatre fois (quadripares). Parmi les 868 femelles disséquées à Abomey-Takplikpo, nous avons identifié 29,15% (n=253) de femelles nullipares ; 37,90% (n=329) d'unipares ; 26,15% (n=227) de bipares ; 5,18% (n=45) de tripares et 1,61% (n=14) de quadripares. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau XV.

Durant toutes les heures de captures de 21 heures à 05 heures du matin, la proportion des femelles nullipares n'a connu aucune variation significative dans les deux localités ( $p>0,05$ ). Cependant, sur les deux sites, on note une répartition inégale des moustiques unipares selon les heures de nos captures. La même tendance a été observée chez les femelles multipares (tableau XV). Les fortes proportions de moustiques unipares ont été capturées de 22 heures à 05 heures, et de 23 heures à 05 heures chez les femelles bipares (tableau XV). A Itassoumba, les proportions élevées de femelles tripares et quadripares ont été capturées plus tard entre 01 heure et 04 heures du matin qui correspond à la période regroupant la majorité des femelles tripares (n=37 ; 66,07%) et quadripares (n=12 ; 66,67%). La même tendance a été observée à Abomey-Takplikpo où les proportions élevées de femelles tripares et quadripares ont été capturées entre minuit et 4 heures du matin.

Dans nos deux zones d'étude, les moustiques nullipares sont en constante activité pendant la nuit. Par contre, il apparaît que les femelles pares entrent tardivement dans les habitations pour la prise de repas sanguin. Mais, dans ce lot de moustiques pares, les moins âgés entrent plus tôt dans les habitations comparativement aux plus âgés.

**Tableau XV** : Rythme d'activité en fonction de l'âge physiologique des femelles de *An. gambiae s.s.* à Itassoumba et à Abomey-Takplikpo

Itassoumba													Abomey-Takplikpo											
Ages	0		1		2		3		4		≥2		0		1		2		3		4		≥2	
Heures	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
21h-22h	20	6,90 <sup>a</sup>	14	3,7 <sup>a</sup>	12	4,59 <sup>a</sup>	2	3,57 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	14	4,18 <sup>a</sup>	16	6,32 <sup>a</sup>	10	3,04 <sup>a</sup>	7	3,08 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	7	2,45 <sup>a</sup>
22h-23h	32	11,03 <sup>a</sup>	36	9,4 <sup>b</sup>	12	4,59 <sup>a</sup>	4	7,14 <sup>a</sup>	2	11 <sup>a</sup>	18	5,37 <sup>a</sup>	28	11,07 <sup>a</sup>	30	9,12 <sup>b</sup>	13	5,73 <sup>ab</sup>	2	4,44 <sup>ab</sup>	1	7,143 <sup>a</sup>	16	5,59 <sup>ab</sup>
23h-00h	42	14,48 <sup>a</sup>	66	17,2 <sup>b</sup>	30	11,49 <sup>ab</sup>	2	3,57 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>	32	9,55 <sup>ab</sup>	36	14,23 <sup>a</sup>	58	17,63 <sup>c</sup>	25	11,01 <sup>bc</sup>	2	4,44 <sup>ab</sup>	0	0 <sup>a</sup>	27	9,44 <sup>b</sup>
00h-01h	36	12,41 <sup>a</sup>	62	16,2 <sup>b</sup>	39	14,94 <sup>b</sup>	6	10,71 <sup>a</sup>	2	11 <sup>a</sup>	47	14,03 <sup>b</sup>	32	12,65 <sup>a</sup>	56	17,02 <sup>bc</sup>	32	14,10 <sup>bc</sup>	6	13,3 <sup>ab</sup>	2	14,29 <sup>a</sup>	40	13,99 <sup>b</sup>
01h-02h	44	15,17 <sup>a</sup>	56	14,6 <sup>b</sup>	50	19,16 <sup>b</sup>	14	25,00 <sup>a</sup>	4	22 <sup>a</sup>	68	20,30 <sup>b</sup>	40	15,81 <sup>a</sup>	47	14,29 <sup>bc</sup>	47	20,70 <sup>c</sup>	13	28,9 <sup>b</sup>	3	21,43 <sup>a</sup>	63	22,03 <sup>c</sup>
02h-03h	36	12,41 <sup>a</sup>	52	13,6 <sup>b</sup>	48	18,39 <sup>b</sup>	14	25,00 <sup>a</sup>	4	22 <sup>a</sup>	66	19,70 <sup>b</sup>	34	13,44 <sup>a</sup>	48	14,59 <sup>bc</sup>	39	17,18 <sup>c</sup>	12	26,7 <sup>b</sup>	4	28,57 <sup>a</sup>	55	19,23 <sup>c</sup>
03h-04h	42	14,48 <sup>a</sup>	58	15,1 <sup>b</sup>	44	16,86 <sup>b</sup>	9	16,07 <sup>a</sup>	4	22 <sup>a</sup>	57	17,01 <sup>b</sup>	35	13,83 <sup>a</sup>	50	15,20 <sup>bc</sup>	38	16,74 <sup>c</sup>	7	15,6 <sup>ab</sup>	3	21,43 <sup>a</sup>	48	16,78 <sup>bc</sup>
04h-05h	38	13,10 <sup>a</sup>	39	10,2 <sup>b</sup>	26	9,96 <sup>ab</sup>	5	8,93 <sup>a</sup>	2	11 <sup>a</sup>	33	9,85 <sup>ab</sup>	32	12,65 <sup>a</sup>	30	9,12 <sup>b</sup>	26	11,45 <sup>bc</sup>	3	6,67 <sup>ab</sup>	1	7,143 <sup>a</sup>	30	10,49 <sup>bc</sup>
Total	290	100	383	100	261	100	56	100	18	100	335	100	253	100	329	100	227	100	45	100	14	100	286	100

n: nombre de moustiques, 0: nullipare, 1: unipare, 2: bipare, 3: tripare, 4: quadripare, 2: multipares, les proportions portant de différentes lettres dans les colonnes sont significativement différentes

## 2.4. Distribution horaire des *An. gambiae* s.s. infectés au *P. falciparum* à Itassoumba et Abomey-Takplikpo

Parmi les 1008 et 868 têtes-thorax de *An. gambiae* s.s. testés respectivement à Itassoumba et Abomey-Takplikpo pour la recherche de l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum*, 2,98% (n=30) ont été révélés positifs à Itassoumba contre 2,53% (n=22) à Abomey-Takplikpo. Dans les deux localités, la distribution des moustiques infectés est homogène durant les heures de captures de 21 heures à 05 heures du matin ( $P>0,05$ ) (tableau XVI). Toutefois, à Itassoumba, les infections sont plus fréquentes entre minuit et 4 heures du matin (tableau XVI), période regroupant la majorité des anophèles infectés (n=24 ; 80%). La même tendance a été observée à Abomey-Takplikpo où 68,18% (n=15) des infections ont été rencontrées entre 1 heure et 4 heures du matin (tableau XVI). Ces résultats montrent que les moustiques infectés entrent dans les habitations humaines pendant toutes les heures de la nuit. Mais, c'est dans la deuxième moitié de la nuit que la majorité des infections sont transmises à l'homme.

**Tableau XVI :** Distribution horaire du taux d'infectivité au *P. falciparum* chez *An. gambiae* s.s. à Abomey-Takplikpo et Itassoumba

Heures	Itassoumba			Abomey-Takplikpo		
	Nb mstq testés	Nb CS+	% CS+	Nb mstq testés	Nb CS+	% CS+
21h-22h	48	1	2,08 <sup>a</sup>	33	0	0,00 <sup>a</sup>
22h-23h	86	1	1,16 <sup>a</sup>	74	1	1,35 <sup>a</sup>
23h-00h	140	2	1,43 <sup>a</sup>	121	2	1,65 <sup>a</sup>
00h-01h	145	5	3,45 <sup>a</sup>	128	2	1,56 <sup>a</sup>
01h-02h	168	8	4,76 <sup>a</sup>	150	5	3,33 <sup>a</sup>
02h-03h	154	6	3,90 <sup>a</sup>	137	5	3,65 <sup>a</sup>
03h-04h	157	5	3,18 <sup>a</sup>	133	5	3,76 <sup>a</sup>
04h-05h	110	2	1,82 <sup>a</sup>	92	2	2,17 <sup>a</sup>
Total	1008	30	2,98	868	22	2,53

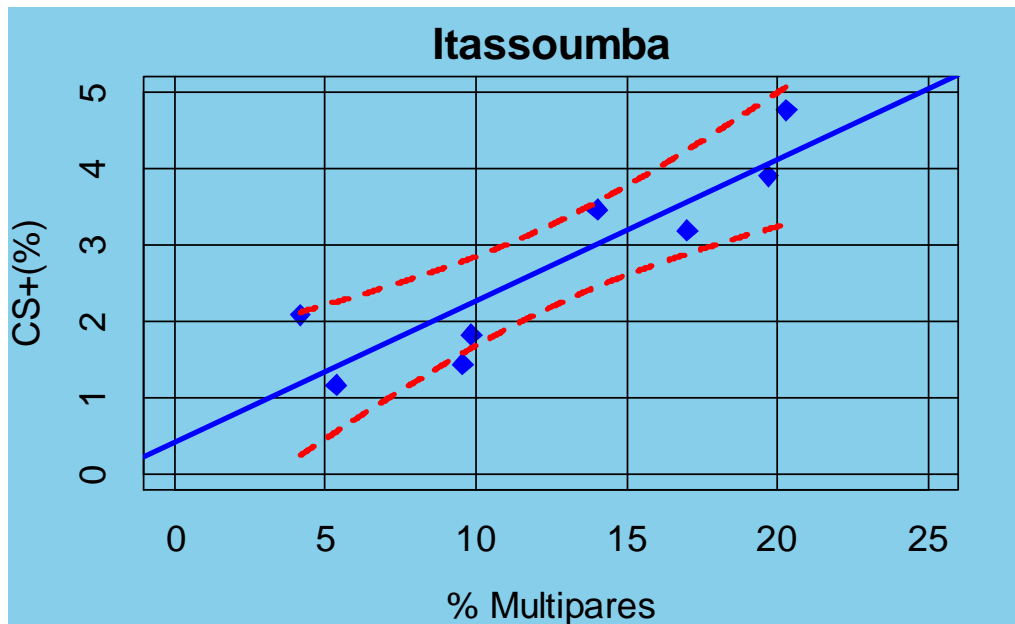
Mstq : moustique, Nb: nombre, CS+: positivité en protéine circumsporozoïtique de *P. falciparum*

## 2.5. Corrélation entre l'agressivité des femelles multipares de *An. gambiae* s.s. et la transmission du *P. falciparum* à Itassoumba et Abomey-Takplikpo

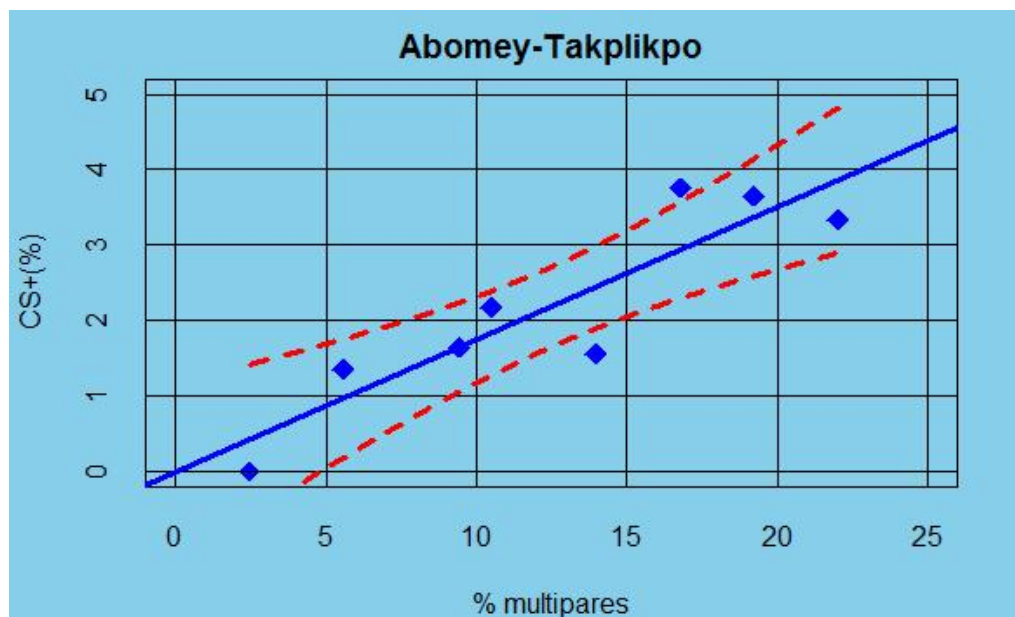
Les figures 10 et 11 montrent respectivement l'évolution de l'infectivité en fonction de l'agressivité des femelles multipares de *An. gambiae* s.s. à Itassoumba et Abomey-Takplikpo.



L'analyse de la corrélation dans les deux localités montre qu'il existe un lien étroit entre les deux paramètres ( $p=0,018$  ;  $r = 0,714$ ). A Itassoumba, le rythme d'agressivité des femelles multipares explique 89,51% ( $R^2=0,8951$ ) de la variabilité de l'infectivité des moustiques au *P. falciparum* (figure 10). De même, 90,17% ( $R^2=0,9017$ ) de la variabilité de l'infectivité des moustiques ont été expliquées par le rythme d'agressivité des femelles multipares à Abomey-Takplikpo (figure 11).



**Figure 10** : Evolution de l'infectivité en fonction de l'agressivité des femelles multipares de *An. gambiae* s.s. à Itassoumba



**Figure 11** : Evolution de l'infectivité en fonction de l'agressivité des femelles multipares de *An. gambiae* s.s. à Abomey-Takplikpo

### 3. Discussion

Les résultats de nos travaux ont montré qu'à Abomey-Takplikpo, l'agressivité extra-domiciliaire de *Anopheles gambiae* s.s. est supérieure à l'agressivité intra-domiciliaire. Ce comportement est différent de ce qui est connu de l'endophagie classique de l'espèce en zones rurales d'Afrique avec plus d'attraction sur l'homme à l'intérieur des habitations (Zahouli *et al.*, 2011). Cette modification de comportement trophique est probablement liée à l'effet excitorépulsif des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD) distribuées en 2011 par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) au Bénin (Tokponnon *et al.*, 2013) en utilisation à l'intérieur des habitations. Ces mêmes raisons expliquent les agressivités intra-domiciliaire et extra-domiciliaire qui étaient comparables dans le village de Itassoumba. La tendance à l'exophagie est associée à une exophilie délibérée marquée par de faibles densités de femelles gorgées, semi-gravides ou gravides et une courte durée du repos post-repas (Zahouli *et al.*, 2011). L'exophilie de *An. gambiae* s.s. peut être une composante de sa résistance aux pyréthrinoïdes (Chandre *et al.*, 1999 ; Koffi *et al.*, 1999) connue sous le nom de résistance comportementale en réponse à l'irritabilité des insecticides (Darriet *et al.*, 2002). Plusieurs études ont d'ailleurs montré que la résistance à l'effet létal des insecticides s'accompagne d'une résistance à leur effet irritant par une modification de comportement chez les individus résistants (Darriet *et al.*, 2002 ; Zahouli *et al.*, 2011 ; Haubruge & Amichot, 1998) qui quittent les maisons avant d'avoir absorbé la dose létale d'insecticide utilisé pour l'imprégnation des MILD. Selon d'autres auteurs (Gillies, 1954 ; Coz, 1971), cette modification de comportement trophique des vecteurs se rapproche de l'exophagie facultative en milieu urbain.

Le cycle d'agressivité globale des femelles de *An. gambiae* s.s, caractérisée par un pic au milieu de la nuit, a été plusieurs fois signalée en zones savaniques ouest-africaines (Dossou-Yovo *et al.*, 1999 ; Doannio *et al.*, 2002). Ce comportement démontre à quel point l'espèce est inféodée aux habitudes de son hôte humain. A Itassoumba, durant les dernières heures de nos captures de 4 heures et 5 heures du matin, l'agressivité des vecteurs (6,63 p/h/h) représente 88,99% du pic d'agressivité (7,45 p/h/h), laissant supposer que l'activité des vecteurs continue après 5 heures du matin. Cette observation fait appel à la mise en place d'une étude spécifique de l'agressivité des anophèles dans le village de Itassoumba. Il est à noter que dans le groupe des femelles pares caractérisées par une agressivité tardive la nuit (Haddow *et al.*, 1962 ; Dossou-yovo *et al.*, 1999), les moins âgées entrent dans les habitations avant les plus âgées. Fernandes & Briegel (2004) ont montré que la longévité maximale des femelles de *An. gambiae* nourries quotidiennement au sang et au jus sucré était de 54 jours alors qu'elle est de

20 jours lorsque ces mêmes femelles sont nourries au jus sucré seul. Cela montre que le sang fournit beaucoup d'éléments énergétiques permettant aux moustiques de vivre plus longtemps. Or, plus le moustique réalise de cycles gonotrophiques, plus le nombre de repas de sang pris est élevé. De ces deux observations, nous pouvons dire que, plus le nombre de cycles gonotrophiques est élevé plus les réserves énergétiques sont importantes chez le moustique. Ainsi, parmi les moustiques pares, les moins âgés sont sensés exprimer leur besoin en repas de sang avant les plus âgés qui ont plus de réserves énergétiques. D'après Detinova (1963), la baisse de mobilité sous le poids de l'âge n'est pas à négliger chez les individus âgés dans une population naturelle.

Dans nos deux zones d'étude, le rythme d'agressivité des femelles multipares explique 90% environ de la variabilité de l'infectivité des moustiques au *P. falciparum*. Ces résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation entre l'agressivité des femelles multipares et la transmission du *Plasmodium*. Cette corrélation observée entre les deux paramètres est favorisée certainement par les fréquences élevées d'individus porteurs de gamétocytes dans les localités de Itassoumba (Tokponnon *et al.*, 2014) et Abomey-Takplikpo (MS, 2014). Cela se traduit par le caractère endémique des deux localités vis-à-vis du paludisme. La disponibilité des individus porteurs de gamétocytes augmente la probabilité d'infection des moustiques épidémiologiquement dangereux (multipares). Alors, il est normal que le rythme d'agressivité des femelles multipares explique la variabilité de la transmission du paludisme. Par ailleurs, le lien étroit observé entre l'agressivité des femelles multipares et la transmission du paludisme justifie une fois encore l'objectif principal de la lutte antivectorielle qui vise à détruire les vecteurs avant qu'ils n'atteignent l'âge d'héberger de sporozoïtes au sein de leurs glandes salivaires dans les zones endémiques du paludisme (Hamon *et al.*, 1961). Ainsi, pour l'évaluation de l'efficacité des moyens de lutte antivectorielle, la longévité des vecteurs demeure l'un des indicateurs les plus appropriés. La longévité des moustiques s'exprime par le taux de parturité qui est le rapport du nombre de moustiques ayant pondu au moins une fois (femelles pares) sur le nombre total de moustiques disséqués (Boudin *et al.*, 1998). En Afrique, des études ont confirmé l'évolution du taux d'infectivité en fonction du taux de parturité des anophèles vecteurs (Hamon, 1963 ; Akogbéto *et al.*, 2011). Cependant, des résultats contraires ont été obtenus par d'autres auteurs (Ossè *et al.*, 2012).

A Itassoumba et à Abomey-Takplikpo, les moustiques infectés sont rencontrés durant toutes les heures de nos captures mais, les infections sont plus fréquentes dans la deuxième moitié de la nuit (entre minuit et 4 heures du matin). Cette situation se justifie par la majorité des femelles tripares et quadripares qui sont très actifs pendant cette période. Même s'il est

reconnu que les moustiques ayant pondu deux fois sont épidémiologiquement dangereux, la probabilité qu'ils soient infectés est faible comparativement aux femelles ayant pondu trois et quatre fois (Beklemishev *et al.*, 1959). Entre minuit et 4 heures du matin où la transmission du paludisme est plus fréquente, la population humaine endormie constitue une proie facile pour les moustiques (Dossou-yovo *et al.*, 1999). Alors, l'utilisation individuelle des MILD constitue un moyen de protection efficace contre le paludisme (Carnevale *et al.*, 1992). Selon une récente étude réalisée au sud du Kenya, une baisse drastique de plus de 90% du taux d'inoculation entomologique (TIE) chez *An. gambiae* après 13 ans d'utilisation des MILD avec un taux de couverture de plus de 86% et une moyenne de 1 MILD pour 2,5 personnes (Mutuku *et al.*, 2011) a été obtenue. Les travaux de Akogbéto *et al.* (2011) ont également montré une réduction de 72% de la densité agressive des anophèles et de 83,3% du TIE dans la commune de Dangbo située dans le département de l'Ouémé (Sud du Bénin) à la suite d'une utilisation massive des MILD. En dehors des heures de forte transmission, particulièrement du début de la nuit où les populations sont en éveil, le risque de recevoir une piqûre infectante n'est pas nulle. En ce moment, la protection contre les piqûres de moustiques ne doit pas être négligée. A cet effet, il serait très important d'avoir recours à d'autres mesures de lutte comme l'utilisation des répulsifs et autres produits similaires. Selon les travaux de Trape (2001), la situation épidémiologique du paludisme est toujours préoccupante tant que l'exposition individuelle n'est pas réduite à moins de 2 piqûres d'anophèles infectés par personne par an dans une localité. C'est seulement si cet objectif est atteint qu'on note une diminution durable et significative du nombre d'accès de paludisme au sein de la population (Alles *et al.*, 1998 ; Robert & Trape, 1997 ; Trape & Rogier, 1996). Dans ces conditions, le problème de la transmission du paludisme reste entier si rien n'est fait contre les piqûres de moustiques pendant la première moitié de la nuit où les populations sont en éveil.

#### **4. Conclusions**

Les piqûres de *An. gambiae* s.s. sont constantes toute la nuit avec des fréquences élevées dans la deuxième moitié de la nuit à Itassoumba et Abomey-Takplikpo. Dans le groupe des femelles pares, les moins âgées entrent tôt dans les habitations comparativement au plus âgées. L'agressivité des femelles multipares explique la variabilité de la transmission du *P. falciparum*. Toutefois, il est important de répéter cette étude dans d'autres zones avant d'aller à une conclusion générale. Si la transmission du paludisme est pérenne au cours de la nuit, elle est plus fréquente dans la deuxième moitié, période au cours de laquelle, la majorité des

infections sont transmises à l'homme. Alors, une bonne utilisation des MILD demeure le moyen de protection le plus efficace contre le paludisme. De plus, au moment où les populations sont en éveil la nuit, l'utilisation des répulsifs (pommades ou autres produits similaires) devrait être une alternative contre les piqûres infectantes de moustiques.

## **Chapitre 6 :**

---

## **Discussion générale**

## **1. La méthode de Polovodova basée sur le comptage des dilatations folliculaires dans la détermination de l'âge physiologique chez *An. gambiae* s.s.**

La méthode de Polovodova (1949) basée sur la technique d'injection d'huile a montré sa bonne performance pour la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae* s.s (Hoc & Wilkes, 1995), principal vecteur du paludisme au Bénin (Akogbéto *et al.*, 2011). Le nombre de dilatations présentes sur les ovarioles confirme effectivement le nombre de cycles gonotrophiques développés par les moustiques. L'efficacité de la méthode de Polovodova s'explique par le fait que l'huile de paraffine injectée dans les espaces inter-ovariolaires facilite l'isolement des ovarioles sans casser leur pédicelle. Cependant, la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires n'est pas indiquée pour la détermination du nombre de pontes chez les moustiques. Par ailleurs, l'injection d'huile dans les ovaires est difficile, demande de dextérité manuelle et exige beaucoup de temps. Ces raisons justifient le faible nombre de moustiques que nous avons examinés par heure (6 à 8 spécimens). La réceptivité de l'huile injectée est relativement faible chez les femelles nullipares, ce qui ne facilite pas l'isolement des ovarioles intimement liés au début de leur développement. Chez les femelles pares, le passage des œufs pondus augmenterait l'ouverture de la lumière du calice et de l'oviducte commun, ce qui n'est pas le cas chez les nullipares. Au cours de nos dissections, des sous-estimations du nombre de pontes ont été enregistrées chez les femelles pares, observations déjà faites dans d'autres études (Rosay, 1969 ; Hoc & Wilkes, 1995). Cette situation est imputable à la fragilité du pédicelle des ovarioles. Plusieurs auteurs (Hamon *et al.*, 1961 ; Hamon, 1963 ; Giglioli, 1965) ont montré qu'au cours de l'isolement des ovarioles permettant la lecture des dilatations folliculaires, le pédicelle est susceptible de se rompre sur les moindres coups d'aiguille. Dans ce cas, il en résulte que des femelles multipares soient identifiées comme des unipares (Brady, 1963). Cette fragilité du pédicelle des ovarioles explique les difficultés d'applicabilité de la technique de dilacération classique des ovaires pour la détermination du nombre de pontes chez les moustiques. Cela justifie vraisemblablement l'unique dilatation observée par Giglioli (1965) chez les femelles multipares de *An. melas* et *An. funestus*, deux espèces intervenant dans la transmission du paludisme. Comme d'autres auteurs (Rosay, 1969 ; Bellamy & Corbet, 1974 ; Nayar & Knight, 1981), nous avons noté également des surestimations du nombre de pontes dont l'origine reste à élucider. Tel que d'autres auteurs (Hoc & Wilkes, 1995 ; Hoc, 1995) l'ont aussi signalé chez les spécimens sauvages en Tanzanie, les aberrations (surestimations et sous-estimations) du nombre de pontes étaient minoritaires dans nos échantillons. Les ovarioles sur lesquels le nombre de dilatations correspondait exactement au nombre de pontes

sont faibles chez les moustiques. Ce constat a été déjà fait par plusieurs auteurs (Hayashi & Kurihara, 1965 ; Liu, 1965 ; Hugo *et al.*, 2008). Alors, nous recommandons une lecture minutieuse de la grande majorité des ovarioles avant les prises de décision sur le nombre de pontes des moustiques. Eu égard aux difficultés et à la technicité liées à son application, la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile pour la détermination du nombre de pontes des moustiques devrait être réservée pour des fins de recherche approfondie.

Si la dilacération classique des ovaires n'est pas indiquée pour la détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae s.s.*, elle a montré sa bonne performance dans la reconnaissance des femelles nullipares et pares. Nous avons obtenu une bonne corrélation entre la présence de dilatation folliculaire et le statut nullipare ou pare des moustiques. Ces résultats confirment ceux de Lewis (1958). Chez les moustiques unipares, le pédicelle est très court, rendant difficile sa rupture au cours de l'isolement des ovarioles. De même, chez les femelles multipares, le pédicelle s'allonge au fur et à mesure que le nombre de cycles gonotrophiques augmente et devient très fragile (Beklemishev *et al.*, 1959 ; Mondet, 1996). Toutefois, au cours de la dilacération classique des ovaires, la rupture du pédicelle maintient souvent la dilatation formée à la base du follicule au cours du dernier cycle gonotrophique. Alors, quel que soit le nombre de cycles gonotrophiques développés par le moustique, on note au moins la persistance d'une dilatation folliculaire après la rupture du pédicelle (Lewis, 1958 ; Mondet, 1996). A l'image de la méthode usuelle de Detinova (1945) basée sur la lecture des trachéoles ovariennes qui permet la lecture de 50 à 60 spécimens à l'heure, la dilacération des ovaires est aussi rapide et permet d'examiner 70 moustiques environ par heure. Contrairement à la méthode de Detinova (1945), l'observation des dilatations est possible au-delà du stade II-âgé. La dilacération classique des ovaires peut être facilement utilisée par les techniciens pour la reconnaissance des moustiques nullipares et pares.

## **2. L'âge physiologique et le portage du gène de résistance *Kdr* chez *An. gambiae s.s.***

Au laboratoire, la longévité des anophèles Kis-SS (homozygotes sensibles) est comparable à celle des anophèles Kis-RR (homozygotes résistants). Ces résultats montrent qu'il n'existe aucun coût génétique associé à la résistance sur la longévité des anophèles. Etant donné que les anophèles sensibles sont plus exposés à l'effet létal des matériaux imprégnés d'insecticides (Ossè *et al.*, 2012), les moustiques résistants devraient avoir une espérance de vie plus élevée que les moustiques sensibles dans les zones où la pression de sélection par les MILD ou la PID est forte. Or, la longévité des moustiques sensibles et celle des moustiques



résistants sont comparables à Itassoumba et Abomey-Takplikpo où les moustiquaires imprégnées d'insecticides (pyréthrinoides) à longue durée d'action sont utilisées contre la transmission du paludisme. Si la réduction de la densité des vecteurs a été montrée suite à l'utilisation des moustiquaires imprégnées (Lengeler, 2004), nos résultats indiquent que les matériaux imprégnés ne sélectionnent pas, parmi les moustiques qui entrent en contact de l'effet insecticide, ceux qui sont sensibles. Ces observations confirment les travaux de Zahouli *et al.* (2011) et Ossè *et al.* (2013). Tel que plusieurs auteurs l'ont déjà rapporté (Aikpon *et al.*, 2013 ; Sovi *et al.*, 2014 ; Ossè *et al.*, 2013 ; Aizoun *et al.*, 2013), la mutation *Kdr* montrée dans la résistance des vecteurs aux pyréthrinoides (Chandre *et al.*, 1999 ; Diabaté *et al.*, 2002 ; Akogbéto *et al.*, 2005), n'est pas probablement le seul mécanisme impliqué. Il a été en effet montré que d'autres mécanismes, notamment des mécanismes enzymatiques, sont impliqués dans cette résistance (Djouaka *et al.*, 2008; Aikpon *et al.*, 2014). Toutefois, il s'avère important d'approfondir les recherches dans ce domaine afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs aux produits insecticides. Bien que l'étude de la fécondité des vecteurs ne fasse pas partie de nos objectifs de départ, nous avons observé par ricochet qu'il n'existe aucun coût génétique associé à la résistance sur la fécondité (nombre d'œufs pondus) des anophèles. Cependant, nous avons montré que la fécondité des anophèles diminue avec le nombre de cycles gonotrophiques. Il a été montré que d'autres facteurs peuvent intervenir dans le nombre d'œufs pondus par les moustiques. Il s'agit par exemple de la quantité et la qualité des réserves protéiques accumulées par le moustique au cours des stades pré-imaginaux (Klowden *et al.*, 1988 ; Amalraj *et al.*, 2005), de la température d'élevage des larves (Carvalho *et al.*, 2002 ; Alto & Juliano 2001), de la taille du moustique et de son alimentation (Gary & Foster, 2001). Dans le cadre de notre étude, l'alimentation des larves d'anophèles de la souche de référence Kisumu a été assurée en utilisant 10 grammes de croquette de chat pour 450 ml d'eau et 100 larves. Les adultes gorgés pour la ponte ont été nourris grâce à un tampon de coton hydrophile imbibé de jus de miel à 10% qui est renouvelé chaque jour.

### **3. L'âge physiologique et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* chez *An. gambiae* s.s.**

Dans nos deux sites d'étude, les moustiques infectés, épidémiologiquement dangereux, sont ceux qui ont pondu au moins deux fois. Ce phénomène est lié à la durée du cycle de développement du principal hématozoaire du paludisme, *P. falciparum*, à l'intérieur du moustique qui est de 10 à 12 jours. C'est au bout de cette période que le moustique devient infectant, présentant de sporozoïtes dans les glandes salivaires (McDonald, 1957). Or, cette

période est largement supérieure à la durée du premier cycle gonotrophique des anophèles qui est de 4 à 5 jours (Beklemishev, 1940). Hamon (1963) a montré que dans les conditions moyennes de l'Afrique intertropicale, un anophèle ne peut guère transmettre le paludisme s'il est âgé de moins de deux semaines. Par ailleurs, nous aurions pu chercher aussi à déterminer l'âge épidémiologiquement dangereux (au moins deux pontes) des moustiques dans des zones arides. Les longues périodes de sécheresse (3 à 6 mois), souvent marquées par l'absence plus ou moins prolongée des gîtes de ponte, contraignent les moustiques à retenir leurs œufs dans les ovaires en attendant que les conditions redeviennent meilleures (Govoetchan *et al.*, 2013). Dans ces conditions, il est possible de rencontrer des moustiques ayant pondu une fois mais portant de sporozoïtes dans les glandes salivaires. Nous pourrions donc assister à une influence des conditions climatiques sur l'âge épidémiologiquement dangereux des anophèles vecteurs.

Dans les populations humaines, les individus porteurs de gamétocytes ne sont pas souvent nombreux, et il est rare que le premier repas soit infectant (Hamon, 1963). Cette observation indique que le risque de prélever de sang infecté sur l'homme augmente avec le nombre de repas de sang. Par conséquent, l'infectivité des moustiques devrait évoluer avec le nombre de pontes. Cette hypothèse est bien confirmée à travers les résultats que nous avons obtenus à Itassoumba et Abomey-Takplikpo. La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dont le but est de détruire les moustiques avant qu'ils n'atteignent un âge épidémiologiquement dangereux vient à point nommé.

#### **4. L'agressivité des femelles multipares de *An. gambiae* s.s. et la transmission du *Plasmodium falciparum***

Du moment où nous avons observé que les moustiques infectés dans nos sites d'étude sont ceux qui ont pondu au moins deux fois, l'étude du rythme d'activité des anophèles nous a montré que les femelles multipares entrent majoritairement dans les habitations humaines dans la deuxième moitié de la nuit. Cependant, les femelles moins âgées sont en activité du crépuscule à l'aube à Itassoumba et Abomey-Takplikpo. L'activité tardive des femelles multipares est liée à l'accumulation des réserves nutritives issues des repas de sang après plusieurs cycles gonotrophiques. Alors, parmi les moustiques, les moins âgés sont sensés exprimer leur besoin en repas de sang avant les plus âgés qui ont plus de réserves nutritives. Selon Detinova (1963), le poids de l'âge aurait un impact sur la mobilité des vecteurs. Le plateau technique utilisé au cours de nos travaux ne nous permettait malheureusement pas de vérifier cette hypothèse.

La fréquence des individus porteurs de gamétocytes est relativement élevée à Itassoumba (Tokponnon *et al.*, 2014) et Abomey-Takplikpo (MS, 2014), deux localités endémique du paludisme (Sovi *et al.*, 2013 ; Tokponnon *et al.*, 2014). Or, dans nos zones d'étude, les moustiques parviennent à développer deux cycles gonotrophiques au bout de 10 à 12 jours. Pendant cette période, l'anophèle se nourrit environ 4-6 fois sur l'homme (Hamon, 1963) et est susceptible d'être en contact avec une poche de gamétocytes. Ces raisons justifient la probable augmentation du risque d'infection chez les moustiques épidémiologiquement dangereux (multipares) à Itassoumba et Abomey-Takplikpo. Ce qui se traduit par la forte corrélation qui existe entre l'agressivité des femelles multipares et leur infectivité au *P. falciparum* dans nos zones d'étude. Le rythme d'agressivité des femelles multipares expliquaient plus de 80% de la variabilité de l'infectivité des moustiques au *P. falciparum* dans les deux localités d'étude. Si l'infectivité des moustiques dépend de leur longévité, la disponibilité des individus porteurs de gamétocytes est un facteur déterminant. Alors, la corrélation entre l'agressivité des femelles multipares et la transmission du paludisme *P. falciparum* mérite d'être étudiée dans d'autres sites de niveau d'endémicité relativement bas. Cela va nous permettre de bien cerner l'impact du facies épidémiologique sur l'infectivité des moustiques ayant atteint un âge épidémiologiquement dangereux.

En concordance avec le rythme d'activité des femelles multipares, la majorité des infections palustres sont transmises à l'homme dans la deuxième moitié de la nuit dans nos sites d'étude, période favorable à leur infectivité au *P. falciparum*. L'utilisation individuelle des MILD constitue alors le moyen de protection le plus efficace contre le paludisme (Carnevale *et al.*, 1992). A cet effet, la distribution en 2011 des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD) par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) au Bénin (Tokponnon *et al.*, 2013) est une œuvre salubre. Toutefois, il est important de sensibiliser les populations, surtout dans les villages, sur l'importance d'une bonne utilisation des moustiquaires distribuées. Des enquêtes ont montré que des moustiquaires offertes par le PNLN en 2011 sont utilisées pour la pêche, la protection des piscicultures et périmètres maraîchers (Gnaguenon *et al.*, 2014). Nous avons également fait ce constat à Itassoumba et Abomey-Takplikpo. Dans ces deux localités, en dehors des heures de forte transmission du paludisme, du début de la nuit à 23 heures environ où les populations sont en éveil sur les terrasses et les vérandas à cause de la chaleur et le manque de l'électricité, le risque de recevoir une piqûre infectante n'est pas nul. A cet effet, nos travaux suggèrent l'utilisation des répulsifs et autres produits similaires contre les piqûres de moustiques.

## **Conclusion générale et perspectives**

La détermination du nombre de pontes chez *An. gambiae* s.s. est bien possible avec la méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile dans les ovaires. Le nombre de dilatations présentes sur les ovarioles traduit le nombre de cycles gonotrophiques développés par le moustique, ce qui n'est pas possible à étudier avec la méthode de Detinova basée sur la lecture des trachéoles ovariennes. Cependant, il est observé que la technique d'injection d'huile demande de dextérité manuelle et de technicité. La méthode de Polovodova basée sur la technique d'injection d'huile devrait être réservée pour des fins de recherches approfondies. Par ailleurs, nous comptons poursuivre la présente étude sur *An. melas* et *An. funestus* afin de mieux explorer l'applicabilité de la méthode de Polovodova pour la détermination du nombre de pontes chez les vecteurs.

Quant à la méthode de Polovodova basée sur la dilacération classique des ovaires, elle n'est pas efficace pour la détermination du nombre de pontes chez les moustiques. Elle est indiquée pour la reconnaissance des femelles nullipares et pares. Avec un peu d'attention et d'habileté, elle est comparable à la méthode usuelle de Detinova (lecture des trachéoles ovariennes) pour la distinction des moustiques nullipares et pares.

Au laboratoire, les anophèles des souches de référence Kisumu-sensible et Kisumu-résistante ont la même espérance de vie. Il en résulte qu'il n'existe aucun coût génétique associé au portage du gène *Kdr* sur la longévité des anophèles. De même, dans les habitations humaines utilisant les MILD à Itassoumba et Abomey-Takplikpo, les taux de survie des vecteurs sensibles et résistants sont comparables. La mutation *Kdr* n'est donc pas le seul mécanisme impliqué dans la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes. Il s'avère nécessaire d'approfondir les recherches afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette résistance. Il est observé qu'aucun coût génétique n'est associé au portage du gène *Kdr* sur la fécondité des anophèles qui diminue avec le nombre de cycles gonotrophiques.

Les moustiques capables de porter de sporozoïtes dans les glandes salivaires sont ceux qui ont pondu au moins deux fois à Itassoumba et Abomey-Takplikpo, deux zones intertropicales humides. Des efforts de recherches doivent être déployés dans les zones arides afin de cerner l'impact des facteurs climatiques sur l'âge épidémiologiquement dangereux des moustiques. Dans les zones arides, pendant les longues périodes de sécheresse (3 à 6 mois), souvent marquées par l'absence plus ou moins prolongée des gîtes de ponte, la durée du cycle gonotrophique peut s'étendre sur plusieurs mois, ce qui est largement supérieure à la durée du cycle de développement du *P. falciparum* (10 à 12 jours) chez le moustique.

Dans nos sites d'étude, le taux d'infectivité des moustiques augmente avec l'âge physiologique, autrement dit avec le nombre de pontes chez les anophèles. Ainsi, les femelles les plus âgées sont les plus infectées au *P. falciparum*. La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dont le principe est de réduire la longévité des anophèles est alors la meilleure stratégie pour éviter que les moustiques atteignent un âge épidémiologiquement dangereux.

Le rythme d'agressivité des femelles multipares explique la variation de la transmission du *P. falciparum* à Itassoumba et Abomey-Takplikpo, deux zones de niveau d'endémicité palustre relativement élevé. La disponibilité des individus porteurs de gamétocytes est un facteur déterminant dans l'infectivité des moustiques. Alors, avant d'aller à une conclusion générale, la corrélation entre l'agressivité des femelles multipares et la transmission du *P. falciparum* mérite d'être étudiée dans d'autres sites de niveau d'endémicité relativement bas.

La majorité des moustiques infectés entrent dans les habitations humaines dans la deuxième moitié de la nuit. Alors, une bonne utilisation des MILD demeure le moyen de protection le plus efficace contre le paludisme. De plus, au moment où les populations sont en éveil la nuit, l'utilisation des produits répulsifs devrait être une complémentaire contre les piqûres infectantes de moustiques.

## Références

1. Aïkpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, Oké-Agbo F, Akogbéto M. (2013). Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit vectors*. **6**, 192.
2. Aïkpon R, Sèzonlin M, Ossè R, Akogbéto M. (2014). Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. *Parasit Vectors*. **7**, 568.
3. Aïzoun N, Aïkpon R, Padonou GG, Oussou O, Oké-Agbo F, Gnanguenon V, Ossè R, Akogbéto M. (2013). Mixed-function oxidases and esterases associated with permethrin, deltamethrin and bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in the south-north transect Benin, West Africa. *Parasit Vectors*. **6**, 223.
4. Akogbéto M, Djouaka R, Noukpo H. (2005). Use of agricultural insecticides in Benin. *Bull Soc Pathol Exot Fil*. **98**, 400-405.
5. Akogbéto M, Djouaka RF, Kinde-Gazard DA. (2006). Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malar J*. **5**, 22.
6. Akogbéto M, Padonou GG, Bankole HS, Kinde-Gazard D, Gbedjissi GL. (2011). Dramatic Decrease in Malaria Transmission after Large-Scale Indoor Residual Spraying with Bendiocarb in Benin, an Area of High Resistance of *Anopheles gambiae* to Pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*. **85**, 586–593.
7. Alles HK, Mendis KN, Carter R. (1998). Malaria mortality rates in South Asia and in Africa: implications for control. *Parasitol Today*. **14**, 369-375.
8. Alto BW, Juliano SA. (2001). Temperature effects on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in the laboratory. *J Med Entomol*. **38**, 548-556.
9. Amalraj DD, Sivagnaname N, Das PK. (2005). Effect of food on immature development, consumption rate, and relative growth rate of *Toxorhynchites splendens*

(Diptera: Culicidae), a predator of container breeding mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **100**, 893.

10. Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **31**, 109-118.

11. Antonio-Nkondjio C, Kerahe CH, Simard F, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, Fontenille D. (2006). Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J Med Entomol*. **43**, 1215-1221.

12. Asidi AN, N' Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW. (2005). 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*. **4**, 25.

13. Badolo A, Ilboudo-Sanogo E, Ouedraogo AP, Costantini C. (2004). Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Trop Med Inter Hlth*. **9**, 330-334.

14. Bailly-Choumara H. (1973). Étude comparative de différentes techniques de récolte de moustiques adultes (Diptera: Culicidae) faite au Maroc, en zone rurale. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc*. **53**, 135-187.

15. Bar-Zeev M, Self LS. (1966). A note on the use of window traps as a tool for evaluating insecticides. *Mosq News*. **26**, 205-207.

16. Beier JC. (1998). Malaria parasite development in mosquitoes. *Annual review of entomology*. **43**, 519-543.

17. Beklemishev WN. (1940). Le cycle gonotrophique, principe de base de la biologie de *An. gambiae*. *Vop Fiziol Ekol Malar Komara*. **1**, 3.



18. Beklemishev WN, Detinova TS, Polovodova VP. (1959). Determination of physiological age in Anophelines and of age distribution in Anopheline populations in the USSR. *Bull Wld Hlth Org.* **21**, 223-232.
19. Bellamy RE, Corbet PS. (1974). Occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes. *Mosq News.* **34**, 334-335.
20. Benjamini Y, Yekutieli D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Stat.* **29**, 1165–1188.
21. Birley MH. (1991). Methods of forecasting the vector-borne disease implications in development of a water resources project. In *Techniques for environmentally sound water resources development*. 50-60p.
22. Boudin C, Bonnet S, Tchuinkam T, Gouagna LC, Gounoue R, Manga L. (1998). L'évaluation des niveaux de transmission palustre: méthodologie et paramètres. *Méd Trop.* **58**, 69-75.
23. Brady J. (1963). Results of age-grouping dissections on four species of *Anopheles* from Southern Ghana. *Bull Wld Hlth Org.* **29**, 147-153.
24. Briegel H, Hefti M, DiMarco E. (2002). Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* **48**, 547-554.
25. Brooke BD, Kloke G, Hunt RH, Koekemoer LL, Temu EA, Taylor ME, Small G, Hemingway J, Coetzee M. (2001). Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res.* **91**, 265-272.
26. Brun A, Cuany A, Le Mouel T, Berge J, Amichot M. (1996). Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem Mol Biol.* **26**, 697-703.

27. Brunhes J, Le Goff G, Geoffroy B. Anophèles afro-tropicaux. (1997). Descriptions d'espèces nouvelles et changements de statuts taxonomiques (Diptera: Culicidae). *Ann Soc Entomol.* **33**, 173-183.
28. Burgess RW. (1960). Comparative susceptibility of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles melas* Theo. to infection by *Plasmodium falciparum* in Liberia, West Africa. *Am J trop Med Hyg.* **9**, 652-6552.
29. Burkot TR, Graves PM, Wirtz RA, Gibson FD. (1987). The efficiency of sporozoïtes transmission in the human malarias *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Bull Wld Hlth Org.* **65**, 375-380.
30. Carnevale P, Bosseno MF, Molinier, Lancien J, Le Pont F, Zoulani A. (1979). Etude du cycle gonotrophique d'*Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) (Giles, 1902) en zone de forêt dégradée d'Afrique Centrale. *Cahiers ORSTOM sér Ent Méd Parasitol.* **17**, 55-75.
31. Carnevale P, Robert V. (1987). Introduction of irrigation in Burkina Faso and its effect on malaria transmission. In *Joint WHO/FAO/UNEP Panel of Experts on Environmental Management for Vector Control.* **7**, 7-11.
32. Carnevale P, Bitsindou P, Diomande L, Robert V. (1992). Insecticide impregnation can restore the efficacy of torn bed nets and reduce man vectors contacts in malaria endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **86**, 362-364.
33. Carnevale P, Robert V, Manguin S, Corbel V, Fontenille D, Garros C, Rogier C, Roux J. (2009). Les anophèles : biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. Marseille: IRD. 391p (Didactiques).
34. Carrara GC, Petrarca V, Niang M, Coluzzi M. (1990). *Anopheles pharoensis* and transmission of *Plasmodium falciparum* in the Senegal River delta, West Africa. *Med Vet Entomol.* **4**, 421-4.

35. Carvalho SC, Martins Junior A, Lima JB, Valle D. (2002). Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **97**, 1117-1120.
36. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté A, Carnevale P, Guillet P. (1999). Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia*. **41**, 319-22.
37. Charlwood JD, Lopes J. (1980). The age-structure and biding behavior of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Brazil. *Bull Entomol Res*. **70**, 549-555.
38. Christophers SR. The development of the egg follicle in anophelines. (1911). *Paludism*. **2**, 73-88.
39. Coetzee M, Fontenille D. (2004). Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol*. **34**, 599-605.
40. Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*. **3619**, 246-274.
41. Coleman M, Casimiro S, Hemingway J, Sharp B. (2008). Operational Impact of DDT Reintroduction for Malaria Control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. *J Med Entomol*. **45**, 885-890.
42. Collins FH, Sakai RK, Vervick KD, Paskewitz S, Seeley DC, Miller LH, Collins WE, Campbell CC, Gwadz RW. (1986). Genetic selection of a plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science*. **236**, 607-610.
43. Collins FH (1994). Prospects for Malaria Control through the Genetic Manipulation of its Vectors. *Parasitol Today*. **10**, 370-371.

44. Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Italian J Zool.* **52**, 45-63.
45. Coluzzi M, Sabatini A, Della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science.* **298**, 1415-1418.
46. Coosemans M, Van Gompel. (1998). Les principaux arthropodes vecteurs de maladies. Quels risques pour le voyageur d'être piqué? D'être contaminé. *Bull Soc Pathol Exot.* **91**, 467-473.
47. 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.
48. Cornet M, Chateau R, Valade M, Dieng PL, Raymond H, Lorand A. (1978). Données bio-écologiques sur les vecteurs potentiels du virus amaril au Sénégal oriental. Rôle des différentes espèces dans la transmission du virus. *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd et Parasitol.* **16**, 315-341.
49. Cornet M, Raymond H, Dieng. (1975). Etudes sur les vecteurs sylvatiques du virus amaril. Essai de mise en évidence de la survie de femelles en saison sèche dans un foyer endémique au Sénégal Oriental. *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd et Parasitol.* **13**, 215-222.
50. Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D. (1999). Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia.* **41**, 595-611.
51. Costantini C, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E. (2004). Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afro-tropical vector mosquitoes. *Trans R Soc trop Med Hyg.* **98**, 644-652.

52. Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, Ose K, Fotsing JM, Sagnon N, Fontenille D, Besansky NJ, Simard F. (2009). Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology*. **9**, 16.
  
53. Coz J, Hamon J, Sales S, Eyraud M, Brengue SJ, Subra R. (1966). Etudes entomologiques sur la transmission du paludisme humain dans une zone de forêt humide dense, la région de Sass-andra, République de Côte-d'Ivoire. *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd*. **7**, 13-42.
  
54. Coz J, Davidson G, Chauvet G, Hamon J. (1968). La résistance des anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et à Madagascar. *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol*. **6**, 207-210.
  
55. Coz J. (1971). Etudes comparatives des fenêtres et des vérandas-pièges comme moyen de sortie pour les moustiques. *Cah ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol*. **4**, 239-245.
  
56. Crampton JM, Comley I, Eggleston P, Hill S, Hughes M, Knapp T, Lycett G, Urwin R, Warren A. (1992). Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **87**, 43-49.
  
57. Cuany A, Handani J, Berge J, Fournier D, Raymond M, Georgiou GP, Pasteur N. (1993). Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol*. **45**, 1-6.
  
58. Curtis CF. (1994). The case for Malaria Control by Genetic Manipulation of its Vectors. *Parasitol Today*. **10**, 371-374.
  
59. Curtis CF, Mnzava AE. (2001). Lutte antipaludique: comparaison entre les pulvérisations domiciliaires et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide. *Bull Org mond santé*. **4**, 145-156.

60. Dabiré KR, Diabaté A, Agostinho F, Alves F, Manga L, Faye O, Baldet T. (2008). Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (*kdr*) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot.* **101**, 119-123.
61. Darriet F, Robert V, Tho Vien N, Carnevale P. (1984). Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées.
62. Darriet, F, Robert V, Carnevale P. (1987). Evaluation de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoïdes et un juvénoïde dans la lutte contre *Culex quinquefasciatus*. *Cahiers ORSTOM. Entomol Méd Parasitol.* **25**, 119-126.
63. Darriet F, N'Guessan R, Hougard JM, Traoré-Lamizana M, Carnevale P. (2002). Un outil expérimental indispensable à l'évaluation des insecticides: les cases pièges. *Bull Soc Pathol Exot.* **95**, 299-303.
64. Das MK, Prasad R. N. (1991). Evaluation of mosquito fish *Gambusia affinis* in the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian J Malariol.* **28**, 171-177.
65. Davidson G. (1953). Experiments on the effect of residual insecticides in houses against *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Bull Entomol Res.* **44**, 231-245.
66. Davidson G. (1956). Insecticide résistance in *Anopheles gambiae* Giles: a case of simple Mendelian inheritance. *Nature.* **178**, 863-863.
67. Davidson G, Hamon J. (1962). A case of dominant dieldrine resistance in *Anopheles gambiae* Giles. *Nature.* **196**, 1012.
68. Della Torre A, Fanello C, Akogbéto M, Dossou-Yovo J, Favia G, Petrarca V, Coluzzi M. (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol.* **10**, 9-18.

69. Detinova TS. (1945). The determination of the physiological age of the females of *Anopheles gambiae* by changes in the tracheal system of the ovaries. *Medskaya Parazit.* **14**, 45-49.
70. Detinova TS. (1962). Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Wld Hlth Org. Monogr Series* N°47.
71. Detinova TS. (1963). Méthode à appliquer pour classer par groupe d'âge les diptères présentant une importance médicale. *Org Mond Santé Sér Monogr.* **47**, 220
72. Djènontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudenoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F. (2010). 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.
73. Djogbénou L, Dabiré R, Diabaté A, Kengne P, Akogbéto M, Hougaard JM, Chandre F. (2008). Identification and geographic distribution of the *ace IR* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* **78**, 298-302.
74. Djogbénou L. (2009). Lutte antivectorielle contre le paludisme et résistance des vecteurs aux insecticides en Afrique. *Med Trop.* **69**, 160-164.
75. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbéto M, Ranson H, Hemingway J, 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**, 538.
76. Dia I, Lochouarn L, Boccolini D, Costantini C, Fontenille D. (2000). Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite.* **7**, 179-184.

77. Dia I, Konate L, Samb B, Sarr JB, Diop A, Rogerie F, Faye M, Riveau G, Remoue F, Diallo M, Fontenille D. (2008). Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Trop.* **105**, 145-153.
78. Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, Hougard JM. (2002). The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* **67**, 617-622.
79. Diabaté A, Dabire RK, Kim Eh, Dalton R, Millogo N, Baldet T, Simard F, Gimnig JE, Hawley WA, Lehmann T. (2005). Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol.* **42**, 548-553.
80. Diabaté A, Dabire RK, Heidenberger K, Crawford J, Lamp WO, Culler Le, Lehmann T. (2008). Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evol Biol.* **8**, 5.
81. Dimopoulos G. (2003). Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cellular Microbiology.* **5**, 3-14.
82. Doannio JM, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibé ME, Chauvancy G, Chandre F *et al.* (2002). La dynamique de la transmission du paludisme à Kafiné, un village rizicole en zone de savane humide de Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot.* **95**, 11-16.
83. Doannio, JM, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibe ME, Chauvancy G, Riviere F. (2006). Comparison of specific composition and mosquitoes population dynamics in two villages of the centre of Cote-d'Ivoire, with and without irrigated rice growing area. *Bull Soc Pathol Exot.* **99**, 204-206.
84. Doerig C, Baker D, Billker O, Blackman MJ, Chitnis C, Dhar Kumar S, Heussler V, Holder AA, Kocken C, Krishna S, Langsley G, Lasonder E, Menard R, Meissner M, Pradel G,



Ranford-Cartwright L, Sharma A, Sharma P, Tardieux T, Tatu U, Alano P. (2009). Signalling in malaria parasites. The MALSIG consortium. *Parasite*. **16**, 169-182.

85. Dossou-Yovo J, Ouattara A, Doannio JM, Diarrassouba S, Chauvancy G. (1998). Malaria surveys in a humid savannah region in Cote d'Ivoire. *Med Trop*. **58**, 51-56.

86. Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Doannio J, Darriet F, Carnevale P. (1999). Le cycle d'agressivité d'*Anopheles gambiae* s.s. à l'intérieur des maisons et la transmission du paludisme dans la région de Bouaké (Côte d'Ivoire). Intérêt de l'utilisation de la moustiquaire imprégnée. *Bull Soc Pathol Exot*. **92**, 198-200.

87. Ellison JR, Hampton EN. (1982). Age determination using the apodeme structure in adult screwworm flies (*Cochliomyia hominivorax*). *Journal of insect physiology*. **28**, 731-736.

88. Fanello C, Petrarca V, Della Torre A, Santolamazza F, Dolo G. (2003). The pyrethroid knockdown resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. **12**, 241- 245.

89. Fettene M, Hunt RH, Coetzee M, Tessema F. (2004). Behaviour of *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* sp. B mosquitoes and malaria transmission in southwestern Ethiopia. *Afr Entomol*. **12**, 83-87.

90. Fernandes L, Briegel H (2004). Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol*. **30**, 11-26.

91. Fillinger U, Kannady K, William G, Vanek MJ, Dongus S, Nyika D, Geissbuhler Y, Chaki PP, Govella NJ, Mathenge EM, Singer BH, Mshinda H, Lindsay SW, Tanner M, Mtasiwa D, De Castro MC, Killeen GF. (2008). A tool box for operational mosquito larval control: preliminary results and early lessons from the Urban Malaria Control Programm in Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J*. **7**, 20.

92. Fillinger U, Ndenga B, Githeko A, Lindsay SW. (2009). Integrated malaria vector control with microbial larvicides and insecticide-treated nets in western Kenya: a controlled trial. *Bull Wld Hlth Org.* **87**, 655-665.
93. Fillinger U, Lindsay SW. (2006). Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Trop Med Inter Hlth.* **11**, 1629-1642.
94. Fournier D. (2005). Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact.* **157**, 257-261.
95. Fox AS, Brust RA. (1994). How do dilatations form in mosquito ovarioles? *Parasitol Today.* **10**, 19-23.
96. Gary RE, Foster WA. (2001). Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* **38**, 22-28.
97. Geissbuhler Y, Kannady K, Chaki PP, Emidi B, Govella NJ, Mayagaya V, Kiama M, Mtasiwa D, Mshinda H, Lindsay SW, Tanner M, Fillinger U, DE Castro MC, Killeen GF. (2009). Microbial larvicide application by a large-scale, community-based program reduces malaria infection prevalence in urban Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS One.* **4**, 5107.
98. Germain M, Herve JP, Geoffroy B. (1974). Evaluation de la durée du cycle trophogonique d'*Aedes africanus* (Théobald), vecteur potentiel de fièvre jaune, dans une galerie forestière du sud de la République Centrafricaine. *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd et Parasitol.* **12**, 127-134.
99. Ghosh SK, Tiwari SN, Sathyanarayan TS, Sampath TRR, Sharma VP, Nanda Nutan, Joshi Hema, Adak T, Subbarao SK. (2005). Larvivorous fish in wells target the malaria vector sibling species of the *Anopheles culicifacies* complex in villages in Karnataka, India. *Trans R Soc trop Med Hyg.* **99**, 101-105.

100. Giglioli MEC. (1965). The age composition of *Anopheles melas* Theobald (1903) populations collected simultaneously by different methods in Gambia, West Africa. *Cahiers ORSTOM Ser Entomol Med.* **3-4**, 11-26.
101. Gillies M. (1954). Studies in House Leaving and Outside Resting of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in East Africa. II. The Exodus from Houses and the House Resting Population. *Bull Entomol Res.* **45**, 375-387.
102. Gillies MT, Wilkes TJ. (1965). A study of the age composition of *Anopheles gambiae* Giles and *An. funestus* Giles in north-eastern Tanzania. *Bull Entomol Res.* **56**, 237-262.
103. Gillies MT, De Meillon B. (1968). The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Sth Afr Inst Med Res.* **54**, 343.
104. Gillies MT, Coetzee M. (1987). A supplement to the *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Afro-tropical Region). Johannesburg, South Africa. *Sth Afr Inst Med Res.* **55**, 14.
105. Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabaté A, Simard F. (2010). A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol.* **21**, 1087-1092.
106. Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabiré RK, Simard F. (2011). Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol.* **26**, 9-17.
107. Gimonneau G, Pombi M, Dabiré RK, Diabaté A, Morand S, Simard F. (2012). Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit Vectors.* **5**, 65.
108. Gnanguenon V, Azondekon R, Frederic O, Sovi A, Ossè R, Padonou G, Aïkpon R, Akogbéto MC. (2013). Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets. *BMC Pub Hlth.* **13**, 751.

109. Guillet P, N'guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, Carnevale P. (2001). Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol.* **15**, 105-112.
110. Gorgas WC (1910). Malaria prevention on the Isthmus of Panama. In: ROSS R. *The Prevention of Malaria*. 346-352.
111. Govoetchan R, Sovi A, Aikpon A, Salako A, Oké Agbo F, Asidi A, Akogbéto A. (2013). The impact of oviposition-site deprivation in gravid females of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) on fecundity, trophic behaviour and life expectancy. *Int J Trop Ins Sc.* **33**, 207–215.
112. Haddow AJ, Ssenkubuge Y. (1962). Laboratory observations on the oviposition-cycle in the mosquito *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles. *Ann Trop Med Parasitol.* **56**, 352-355.
113. Hamon J. (1955). Biologie d'*Anopheles funestus*. In : *Biologie des anophèles d'AOF et d'AEF. Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol.* **2**, 6.
114. Hamon J, Chauvet G, Thélin L. (1961). Observations sur les méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des femelles d'anophèles. *Bull Wld Hlth Org.* **24**, 437- 443.
115. Hamon J. (1963). Etude de l'âge physiologique des femelles d'anophèles dans les zones traitées au DDT, et non traitées, de la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. *Bull Org Mond Santé.* **28**, 83-109.
116. Harbach RE. (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull Entomol Res.* **94**, 537-553.
117. Haubruge E, Amichot M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol Agron Soc Environ.* **2**, 161–174.

118. Hayashi S, Kurihara T. Studies on the age of mosquitoes. (1965). The determination of physiological age of *Culex pipens pallens* by the relics formed at ovarioles after the oviposition. *Jap J Sanit Zool.* **16**, 29-33.
119. Hemingway J, Karunaratne SH. (1998). Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol.* **12**, 1-12.
120. Hemingway J, Hawkes NJ, Mccarroll L, Ranson H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* **34**, 653-665.
121. Hoc TQ, Charlwood JD. (1990). Age determination of *Aedes cantans* using the ovarian oil injection technique. *Med Vet Entomol.* **4**, 227- 233.
122. Hoc QH. (1995). Morpho-histological changes in the ovarioles and determination of physiological age in haematophagous insects of medical importance. *Zool Pol.* **40**, 5-65.
123. Hoc TQ, Wilkes TJ. (1995). The ovarioles structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and its use in determining physiological age. *Bull Ent Res.* **85**, 59- 69.
124. Hugo LE, Quick-Miles S, Kay BH, Ryan PA. (2008). Evaluations of mosquito age grading techniques based on morphological changes. *J Med Entomol.* **45**, 353-369.
125. Institut National de la Statistique Appliquée et de l'Economie: *Recensement général de la population du Bénin.* (2002). Cotonou, Benin.
126. Keiser J, Singer BH, Utzinger J. (2005). Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* **5**, 695- 708.
127. Kenneth JR. (2002). Epidemiology: An Introduction, *Oxford University Press.*

128. Kinde-Gazard D, Baglo T. (2012). Assessment of microbial larvicide spraying with *Bacillus thuringiensis israelensis*, for the prevention of malaria. *Méd Malad Infect.* **42**, 114-118.
129. Klowden MJ, Blackmer JL, Chambers GM. (1988). Effects of larval nutrition on the host seeking behavior of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* **4**, 73-75.
130. Koenrardt CJM, Majambres, Hemerik, Takken W. (2004). The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae* s.l. *Entomol Exp Appl.* **112**, 125-134.
131. Koffi AA, Darriet F, N'Guessan R, Doannio JM, Carnevale P. (1999). Evaluation au laboratoire de l'efficacité d'insecticide de l'alphacyperméthrine sur les populations d'*Anopheles gambiae* de Côte d'Ivoire résistantes à la perméthrine et à la deltaméthrine. *Bull Soc Pathol Exot.* **92**, 62-66.
132. Lengeler C. (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
133. Lewis DJ. (1958). The recognition of nulliparous and parous *Anopheles gambiae* by examining the ovarioles. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **52**, 456- 461.
134. Lewis DJ. (1970). Determination of parous rates in phlebotomine sandflies with special reference to Amazonian species. *Bull Entomol Res.* **60**, 209-219.
135. Lines DJ, Wilkes TJ, Lyimo EO. (1991). Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoites rates in *Anopheles gambiae* in Tanzania. *Parasitol.* **102**, 167-177.
136. Lines J. (1996). Mosquito nets and insecticides for net treatment: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa. *Trop Med Inter Hlth.* **1**, 616-632.
137. Liu T. (1965). Observations on the physiological age of *Culex pipiens pallens* Coquillett and *Aedes albopictus*. *Acta Entomol Sinica.* **14**, 179-185.

138. Lockwood JA, Sparks TC, Story RN. (1984). Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behaviour. *Bull Entomol Soc Am.* **30**, 41–51.
139. 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.
140. Lundwall E, Pennetier C, Corbel V, De Gentile L, Legros F. (2005). Malaria: what about exposure prophylaxis? *Revue du Praticien.* **55**, 841-848.
141. 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.
142. McCabe ET, Barthel WF, Gertler SI, Hall SA. (1954). Insect repellents, III, N, Ndiethylamides<sup>1</sup>. *Journal of Organic Chemistry.* **19**, 493.
143. McDonald. (1957). The epidemiology and control of malaria, *London, Oxford University Press.* 252 p.
144. Millest AL, Cheke RA, Howe MA, Garms R. (1992). Determining the ages of adult females of different members of *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) by the pteridine accumulation method. *Bull Entomol Res.* **82**, 219-266.
145. Ministère de la Santé. (2014). Annuaire des statistiques sanitaires 2013. Cotonou : Direction de la Programmation et de la Prospective.
146. Mondet B. (1993). Application de la méthode de Polovodova à la détermination de l'âge physiologique des *Aedes* (Diptera: culicidae) vecteurs de la fièvre jaune. *Ann Soc Entomol.* **29**, 61-76.

147. Mondet B. (1996). Epidémiologie des arboviroses: utilisation et intérêt de la détermination de l'âge physiologique des femelles de moustiques vecteurs. *Bull Soc Path Ex.* **89**, 155-160.
148. Mohamed AA. (2003). Study of larvivorous fish for malaria vector control in Somalia, 2002. *East Mediterr Health J.* **9**, 618-626.
149. Mokry JE. (1980). A method for estimating the age of field-collected female *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simulium). *Tropenmed Parasitol.* **31**, 374-380.
150. Monographie OMS. (1963). 220p.
151. Moon RD, Kaya HK. (1981). A comparison of methods for assessing age structure and abundance of populations of non-diapausing female *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol.* **18**, 289-297.
152. Morsy TA, El Kadry AA, Salama MM, Sabry AH, El Sharkawy IM. (1995). Studies on the bionomics and vector competence of adult anopheline mosquitoes in El Faiyum Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* **25**, 213-44.
153. Mouchet J. (1994). Le DDT en santé publique. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé.* **4**, 257-262.
154. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *John Libbey Eurotext.*
155. Mouchet J, Gariou J. (1966). *Anopheles moucheti* au Cameroun. *Cahiers ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol.* **4**, 71-81.
156. Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M, Lemieux L, Herzog M, Abadon M, Beyssat Arnauty V, Hyrien O, Robert De Saint Vincent B, Georghiou GP. (1990). Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*.



*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **87**, 2574-2578.

157. Mutuku FM, King CH, Mungai P, Mbogo C, Mwangangi J, Muchiri EM, Walker ED, Kitron U. (2011). Impact of insecticide-treated bed nets on malaria transmission indices on the south coast of Kenya. *Malar J.* **10**, 356.

158. Najera JA, Zaim M. (2004). Lutte contre les vecteurs du paludisme: Critères et procédures de prise de décision pour une utilisation raisonnée des insecticides. *Geneva: World Health Organization.*

159. Nassir E, Abdel-Muhsin AM, Suliaman S, Kenyon F, Kheir A, Geha H, Ferguson HM, Walliker D, Babiker HA. (2005). Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol.* **35**, 49-55.

160. Nayar JK, Knight JW. (1981). The occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes: *Culex nigripalpus*. *Mosq News.* **41**, 281-287.

161. Nentwig G (2003). Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitol Res.* **90**, 40-48.

162. N'guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M. (2007). Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Em Infect Dis.* **13**, 199-206.

163. Njan Nloga A, Robert Vincent, Toto JC, Carnevale P. (1993). *Anopheles moucheti*, vecteur principal du paludisme au Sud-Cameroun. *Bulletin de Liaison et de Documentation – OCEAC.* **26**, 63-67.

164. Ohba M, Saitoh H, Miyamoto K, Higuchi K, Mizuki E. (1995). *Bacillus thuringiensis* serovar higo (flagellar serotype 44), a new serogroup with a larvicidal activity preferential for the anopheline mosquito. *Lett Appl Microbiol.* **21**, 316-318.

165. Ossè R, Aikpon R, Padonou G, Oussou O, Yadouleton A, Akogbeto M. (2012). Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasit Vectors*. **5**, 163.
166. Ossè R, Aikpon R, Sovi A, Padonou GG, Oké-Agbo F, Gnanguenon V, Akogbéto M. (2013). Long lasting insecticidal nets use, efficacy and physical integrity in a vector resistance area after a nationwide campaign in southern Benin, West Africa. *J Public Health Epidemiol*. **5**, 325-335.
167. Pajot FX. (1976). Contribution à l'étude écologique d'*Aedes* (*Stegomyia*) *simpsoni* (Theobald, 1905) (Diptera, Culicidae). Observations concernant les stades préimaginaux. *Cahiers ORSTOM. Sér Entomol Med Parasit*. **14**, 31-48.
168. Pal MK, Tandon N. (2001). Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bacticide) against *Anopheles stephensi* breeding in Calcutta city. *J Commun Dis*. **33**, 143-146.
169. Pauron D, Barhanin J, Amichot M, Pralavorio M, Berge JB, Lazdunski M. (1989). Pyrethroid receptor in insect Na<sup>+</sup> channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. *Biochemistry*. **28**, 1673-1677.
170. Pennetier C, Corbel V, Hougard, JM. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. (2005). *Am J Trop Med Hyg*. **72**, 739-744.
171. Perry R. (1912). Malaria in the jeypore Hill Tract and adjoining coastland. *Paludism*. **5**, 32.
172. Phillips Margaret, Mills A, Dye Christopher. (1993). Guidelines for cost-effectiveness analysis of vector control. *Wld Hlth Org*. **3**, 192 (PEEM guidelines series).
173. Polovodova VP. (1949). The determination of the physiological age of female *Anopheles* by the number of gonotrophic cycles completed. *Med Parazitol Parazitar Bolezni*. **18**, 352–355.

174. Prapanthadara L, Hemingway J, Kettermann AJ. (1995a). DDT-resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania based on increased DDT deshydrochlorinase activity of glutathion-S-transferases. *Bull Entomol Res.* **85**, 267-274.
175. Prapanthadara L, Hemingway J, Kettermann AJ. (1995b). Partial purification and characterization of Glutathion-S-Transferase involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pestic Biochem Physiol.* **47**, 119-133.
176. Prasad H, Prasad RN, Haq S. (1993). Control of mosquito breeding through *Gambusia affinis* in rice fields. *Indian J Malariol.* **30**, 57-65.
177. Pringle G. (1962). Experimental malaria infections in “saltwater” and “freshwater” *Anopheles gambiae* from East Africa. *Trans R Soc trop Med Hyg.* **56**, 379-382.
178. Prior A, Torr SJ. (2002). Host selection by *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* feeding on cattle in Zimbabwe. *Med Vet Entomol.* **16**, 207-213.
179. Putnam P, Shannon RC. (1934). The biology of *Stegomyia* under laboratory conditions: egg-laying capacity and longevity of adults. *Proc Entomol Soc.* **36**, 217-242.
180. Ramirez-Perez J, Rassi E, Convit J, Ramirez A. (1976). Epidemiological importance of age groups in colonies of *Simulium metallicum* (Diptera: Simuliidae) in Venezuela. *Boln sanit. pan-am.* **80**, 105-122.
181. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol.* **9**, 491- 497.
182. Ranson H, N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control. *Trends Parasitol.* **27**, 91-98.

183. R Development Core Team. (2011). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
184. Robert GN. (1998). Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statist Med.* **17**, 857-872.
185. Robert V, Carnevale P. (1984). Les vecteurs du Paludisme en Afrique sub-saharienne. *Etudes Médicales.* **2**, 79-90.
186. Robert V, Trape JF. (1997). Lutter contre le paludisme en réduisant sa transmission? Présentation de la controverse. *Médecine/sciences.* **13**, 678-682.
187. Rosay B. (1961). Anatomical indicators for assessing the age of mosquitoes: the teneral adult (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* **54**, 526-529.
188. Rosay B. (1969). Anatomical indicators for assessing age of mosquitoes: changes in ovarian follicles. *Ann Entomol Soc Am.* **62**, 605-611.
189. Sabatinelli G, Blanchy S, Majori G, Papakay M. (1991). Impact of the use of larvivorous fish *Poecilia reticulata* on the transmission of malaria in FIR of Comoros. *Ann Parasitol Hum Comp.* **66**, 84-88.
190. Saitoh H, Higuchi K, Mizuki E, Ohba M. (1998). Larvicidal toxicity of Japanese *Bacillus thuringiensis* against the mosquito *Anopheles stephensi*. *Med Vet Entomol.* **12**, 98-102.
191. Saunders DS. (1962). Age determination for female tsetse flies and the age compositions of samples of *Glossina pallidipes* Aust, *G. palpalis fuscipes* Newst and *G. Brevipalpis* Newst. *Bull Entomol Res.* **53**, 579-595.
192. Scott J, Brogdon W, Collins F. (1993). Identification of single specimens of the *An. gambiae* complex by PCR. *Am J Trop Med Hyg.* **49**, 520-529.

193. Self LS, Pant CP. (1966). Insecticide susceptibility and resistance in population of *Anopheles gambiae*, *Culex fatigans* and *Aedes aegypti* in Southern Nigeria. *Bull Wld Hlth Org.* **34**, 960-962.
194. Service MW. (1964). Dieldrin resistance in *Anopheles funestus* Giles from an unsprayed area in Northern Nigeria. *J Trop Med Hyg.* **67**, 190.
195. Service MW, Davidson G. (1964). A high incidence of dieldrin resistance in *Anopheles gambiae* GILES from an unsprayed area in Northern Nigeria. *Nature.* **203**, 209-210.
196. Sherman IW, Eda S, Winograd E. (2003). Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes and Infection.* **5**, 897-909.
197. Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, Fotsing JM, Fontenille D, Besansky NJ, Costantini C. (2009). Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* **9**, 17.
198. Sitaraman NL, Karim MA, Reddy GV. (1975). Observations on the use of *Gambusia affinis* Holbrooki to control *A. stephensi* breeding in wells. Results of two years' study in Greater Hyderabad City-India. *Indian J Med Res.* **63**, 1509-1516.
199. Snow, Wilkes TJ. (1977). Age composition and vertical distribution of mosquito populations in the Gambiae, West Africa. *J Med Entomol.* **13**, 507-513.
200. Sokolova MI. (1983). Diagnostic significance of ovariole structure for determination of the physiological age of blood sucking mosquitoes (Culicidae: Diptera). *Medskaya Parazit.* **52**, 53-58.
201. Sovi A, Djègbè I, Soumanou L, Tokponnon F, Gnanguenon V, Azondékon R, Oké-Agbo F, Okè M, Adéchoubou A, Massougboji A, Corbel V, Akogbéto M. (2014). Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau

(southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). *BMC Infect Dis.* **14**, 103.

202. Sovi A, Govoétchan R, Tokponnon F, Hounkonnou H, Aïkpon R, Agossa F, Gnanguenon V, Salako AS, Agossou C, Ossè R, Okè M, Gbénou D, Massougbojji A, Akogbéto M. (2013). Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasit Vectors.* **6**, 352.

203. Spielman A. (1994). Why Entomological Antimalarial Research should not Focus on Transgenic Mosquitos. *Parasitol Today.* **10**, 374-376.

204. Tiffen M. (1991). Guidelines for the incorporation of health safeguards into irrigation projects through intersectoral cooperation with special reference to the vector-borne diseases 2nd. *Wld Hlth Org.* **1**, 81.

205. Tokponnon FT, Aholoukpe B, Denon EY, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Kinde-Gazard D, Akogbeto M. (2013). Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation -wide scale up of their distribution in Benin. *Parasit Vectors.* **6**, 265

206. Tokponnon FT, Ogouyémi AH, Sissinto Y, Sovi A, Gnanguenon V, Cornélie S, Adéothy AA, Ossè R, Wapo A, Gbénou D, Oke M, Kinde-Gazard D, Kleinschmidt I, Akogbeto M, Massougbojji A. (2014). Impact of long-lasting, insecticidal nets on anaemia and prevalence of *Plasmodium falciparum* among children under five years in areas with highly resistant malaria vectors. *Malar J.* **13**, 76.

207. Trape JF, Rogier C. (1996). Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today.* **12**, 236 – 240.

208. Usenger RL. (1966). Monography of Cimicidae. (Thomas Say Fondation, Vol. 7). *Entomol Soc Am, College Park, Maryland.*

209. Venables WN, Ripley BD. (2002). Modern Applied Statistics with S. Springer.

210. Vermynen, M. (1967). Distribution of Anopheles of the Republic of Rwanda and the Republic of Burundi. *Rivista di malariologia*. **46**, 13.
211. 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**, 239-244.
212. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie 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.
213. Welch WH. (1897). Adaptation in pathological processes. *Science*. **22**, 813-832.
214. White GB. (1985). *Anopheles bwambae sp.n.*, a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (Diptera : Culicidae). *Systematic Entomology*. **10**, 501-522.
215. WHO. (1976). Resistance of disease vectors to pesticides. 10p.
216. WHO. (2000). In: A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control During Pregnancy in the African Region.
217. WHO. (2006a). Pesticides and their application: for the control of vectors and pests of public health importance 6th. *Wld Hlth Org*, Geneva. 114p.
218. WHO. (2006b). Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). *WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP*. 3p.
219. WHO. (2011). Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44610> [Consulté le 5 Juin 2013].

220. WHO. (2012). Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. *Wld Hlth Org*, Geneva. 131p.
221. WHO. (2013). World Malaria Report 2012. *Wld Hlth Org*, Geneva.
222. WHO. (2014). World Malaria Report 2013. *Wld Hlth Org*, Geneva.
223. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG. (1987). Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Org.* **65**, 39-45.
224. Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbéto M. (2009). Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J.* **8**, 103.
225. Yadouleton AW, Martin T, Padonou GG, Chandre F, Alex A, Djogbenou L, Dabiré R, Aikpon R, Glitoh I, Akogbéto M. (2011). Cotton pest management strategies on the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* populations in northern Benin. *Parasit Vectors.* **4**, 60.
226. Zahouli ZBJ, Tchicaya ES, Nsanzabana C, Donzé J, Utzinger J, N’Goran EK, Koudou. (2011). Caractéristiques bioécologiques d’*Anopheles gambiae* s.s. en zones de riziculture irriguée au centre de la Côte d’Ivoire. *Med Trop.* **71**, 575-581.



# **Annexes**

## **Annexe 1 : Articles publiés**

RESEARCH

Open Access

# Application of Polovodova's method for the determination of physiological age and relationship between the level of parity and infectivity of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s, south-eastern Benin

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Roseric Azondékon<sup>1,3</sup>, Marc Agbogban<sup>1</sup>, Frédéric Oké-Agbo<sup>1,2</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Kèfilath Badirou<sup>1,2</sup>, Ramziath Agbanrin-Youssouf<sup>1,2</sup>, Roseline Attolou<sup>1,2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Arthur Sovi<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** Polovodova method based on counting follicular dilatations estimates the number of egg-laying in mosquitoes. However, some researchers doubt the reliability of this method because of the absence of multiple dilatations in vectors after many gonotrophic cycles. It is in this context of controversy that our study was carried out to evaluate the importance of follicular dilatations in the determination of parity levels in *An. gambiae* s.s. Moreover, the application of this method allowed us to clarify the evolution of vectors' infectivity to *P. falciparum* according to their parity level.

**Methods:** We used two techniques to determine the parity level in *An. gambiae* s.s. We used two batches of wild strain mosquitoes reproduced after a known number of egg-laying in laboratory. The first batch was submitted to oil injection in the ovaries using a micropipette. In the same way, the classic technique of ovaries dilaceration (a technique based on the Polovodova method) was applied to the second batch. In order to assess relationship between parity level and mosquitoes' infectivity, Polovodova method was applied on vectors collected on humans. Finally, Heads and thoraces of these vectors were individually analyzed for *P. falciparum* antigen detection using an ELISA assay.

**Results:** In the first batch including 50 female mosquitoes "never laid", 50 "laid once", 50 "laid twice" and 48 "three times", oil injection technique revealed 42 nulliparous, 44 uniparous, 46 biparous and 44 triparous respectively. Overall, Polovodova method was effective using oil injection technique ( $p > 0.05$ ). On the other hand, in the second batch that has a similar number of laying to the first batch, the application of Polovodova method through classical technique of ovaries dilaceration was ineffective with multiparous females ( $p < 0.05$ ). Moreover, probability of vector infectivity increased with the number of egg-laying ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** Our results revealed that the Polovodova method is reliable for estimating the number of egg-laying in *Anopheles gambiae* s.s. using oil injection technique in the ovaries. The study has also showed an increased likelihood of infectivity in vectors according to the number of egg-laying.

**Keywords:** *Anopheles gambiae* s.s, Parity level, Classical dilaceration, Oil injection, Infectivity

\* Correspondence: [rodrigue.anagonou@yahoo.fr](mailto:rodrigue.anagonou@yahoo.fr)

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin

<sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Calavi, Bénin

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

## Background

The physiological age of insects, vectors of disease, was assessed by several methods [1]. These methods included ovarian tracheoles [2], decreased fecundity [3], copulation index [4], copulation marks [5], fat modifications [6], cuticular changes [7], appearance of Malpighian tubules [8,9], intestinal changes [10], accumulation of fluorescent compounds in specific cells [11], wing tear, and scales removal in mosquitoes [12,13]. Likewise, it is assumed that after each egg-laying, dilatation is observed at the region of follicular tube where the egg originated from. In theory, the number of dilatations in the ovarioles (follicles) must equal to the number of egg-laying in female mosquitoes – which is an indicator of physiological age [14,15]. In tropical Africa, this method has been widely used to determine the physiological age of malaria vectors [16].

Several studies reported the existence of several dilatations in multiparous *An. gambiae* and concluded that the method of Polovodova [14] is applicable to this species in order to estimate their number of egg-laying [17–19]. However, the absence of multiple dilatations was also observed in the same species after several egg-laying [20–22]. These differences explain some reservations observed by some researchers in the use of the method of Polovodova for the determination of number of egg-laying (parity level) in mosquitoes. It is in this context of controversy among different authors that this study was initiated. Furthermore, the application of results of Polovodova method for physiological age determination allowed us to verify if the likelihood of infectivity in *An. gambiae* to *Plasmodium falciparum* is higher in older females. In order to count the number of follicular dilatations per egg-laying, Polovodova method was applied to females of *An. gambiae* s.s. reared in laboratory after larval collection. The relationship between physiological age and infectivity of vectors to *P. falciparum* was verified in female adult of *An. gambiae* s.s. collected by human landing catch.

## Methods

### Study area

This study was carried out at Adjarra and Ifangni districts in Benin (Figure 1).

### Adjarra

In Adjarra district, located 06°27'00' N and 01°56'00' E, the study was conducted in the village of Abomey-takplikpo (Figure 1). Adjarra is located in the department of Oueme with a population of 60,112 inhabitants and an area of 112 km<sup>2</sup> [23]. It is bordered in the north by Avrankou district, in the south by Seme-Podji district, in the west by Porto-Novo district and in the east by Nigeria. The climate is sub-equatorial with two dry

seasons and two rainy seasons. The average rainfall is 1200 mm per year. The hydrographic network of this district includes the lagoon of Porto-Novo in the south and Aguidi River in the northeast. The vegetation is sparse; it is composed of shrubs, grass and by sacred forests relics.

### Ifangni

Entomological surveys were conducted at Itassoumba (Figure 1) in the district of Ifangni (Province of Plateau) located 06°38'56'N and 02°43'14'E, with a population of 71,606 inhabitants and an area of 242 km<sup>2</sup> [23]. The climate is Guinean with two dry seasons and two rainy seasons. The annual precipitation is between 800 mm and 1400 mm. The vegetation includes sacred forest relics, plantations of oil palms, shrubs and tall grass. Itassoumba is crossed by swamps. In the dry season, the breeding sites of *An. gambiae* s.l. are scarce. However, breeding sites are particularly permanent in Itassoumba due to the presence of fish ponds and vegetable farming. Once animal feed reserved for small fry and fish are present on the surface of the water, they constitute a source of food favoring the proliferation of malaria vectors.

### Study on wild *Anopheles gambiae* s.s. reared at insectarium

#### Sampling of *An. gambiae* s.s. larvae

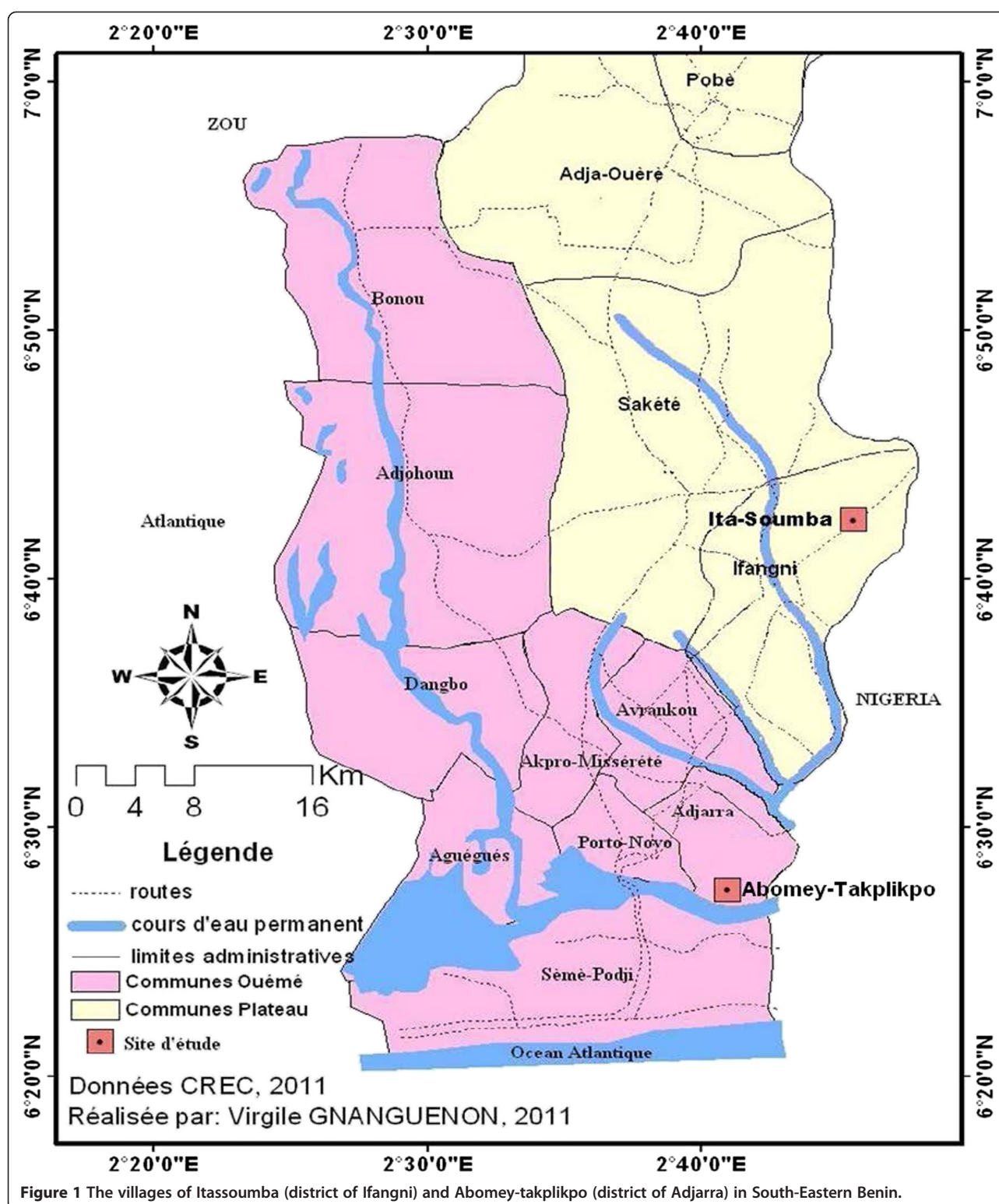
Collection of larvae was only conducted in Itassoumba because of the permanent presence of *An. gambiae* s.s. breeding sites [24,25]. This sampling was performed according to the method of “Dipping” with ladles fitted with long handles, plastic buckets, cups, bottles, containers and a filter cloth.

#### Rearing of larvae

At the Insectarium, larvae were placed in trays containing breeding site water. They were distributed on average in lots of 100 per tray to not only optimize their growth, but also to avoid cannibalism. The use of breeding site water, was to avoid the influence of chemical residues such as sodium hypochlorite (NaOCl) on larval growth. The larvae were fed with croquette of cat (5 g mixed in 500 ml of breeding site water for at least 80 larvae). Each tray was covered with an untreated net and stored in insectarium conditions (relative humidity ranges from 70–80% with a temperature between 25 and 30 degrees). Photoperiodicity was assured by fluorescent lights. After emergence, adult mosquitoes were collected and put in a cubic cage. Females were isolated in a cage and fed with 10% honey solution.

#### Induction of egg-laying in *Anopheles gambiae*

Females aged from 5 to 6 days were fed with blood from guinea pigs, placed in cages at 19 hours and removed the



next morning at 7 hours. Fed females were placed in other cages and were re-fed two days later, after complete digestion of the first blood meal. The additional blood meal was used to complete the maturation of ovaries in nulliparous

females. Females that have taken two blood meals were put on an individual egg-laying. A sample of blood fed nulliparous and parous mosquitoes was dissected at different stages of ovarian development [26].

For individual egg-laying, female of *An. gambiae* s.s. was put in a cup covered by a piece of untreated net. A nest box was placed at the bottom of each cup (cotton swab moistened with water upon a Whatman paper of 5 cm radius). Mosquito was fed with 10% honey solution every day. This served as food for gravid females in experimentation. After the first egg-laying, a sample of uniparous mosquitoes was dissected after 24 hours of observation. The observation time allowed mosquitoes to release any residual eggs.

The remaining uniparous mosquitoes, once released into cage, were blood fed again for the second egg-laying round. After the observation period, a sample was also dissected. The experiment was repeated on the remaining biparous mosquitoes to obtain triparous mosquitoes.

#### **Dissection of the ovaries and determination of the physiological age of reared mosquitoes**

Polovodova method was applied with oil injection technique on a batch of 198 mosquitoes divided into four samples of known ages. The ovaries of each mosquito were dissected on a slide in a physiological liquid (0.9% Natrichlorid + Neutral Red 1/5000 to 1/3000) using a binocular microscope. The ovaries were extracted carefully while maintaining the common and lateral oviducts. Paraffin oil was injected into the ovaries through the common oviduct using a glass micropipette with an opening of 0.05 µm at the tip. At this step, we observed swelling of the ovary which had received paraffin oil. The colored ovary was carefully opened from its dorsal face using dissecting needles. The samples were mounted onto a slide and read under an incorporated (4X-10X) camera microscopy. Thus, the maximum number of dilatations (indicator of physiological age) carried by the ovarioles was recorded.

Similarly, the same Polovodova method was applied with the classic (conventional) ovaries dilaceration on 200 mosquitoes divided in four samples of known ages. When the ovaries were dissected in the physiological liquid, ovarioles are simply and carefully isolated with dissecting needles. The maximum number of dilatations carried by the ovarioles was also recorded.

#### **Study on adults *Anopheles gambiae* s.s. collected by human landing catch**

##### ***Sampling of adult mosquitoes and determination of physiological age***

Mosquitoes were caught on man from 9:00 p.m. to 5:00 am. Collections were carried out inside and outside houses using hemolytic tubes and torch. After each collection, *An. gambiae* s.l. were identified morphologically [27,28]. Their physiological age was determined by the Polovodova method [14] applied with oil injection technique.

#### **Conservation of biological materials**

Dissected mosquitoes were divided in two parts (head-thorax and carcass) and stored in Eppendorf tubes containing silica gel at -20° C. Each Eppendorf tube was labeled (date, place of capture and order number of mosquito).

#### **Infectivity of vectors in *Plasmodium falciparum* and identification of *An. gambiae* s.l. species**

Head-thorax of each vector was used to detect circumsporozoitic antigen of *P. falciparum* (CSP) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies against the CSP [29]. The carcasses were used individually for species identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) [30].

#### **Statistical analysis**

Mid-p tests and Fisher's Exact [31] were used to assess the effectiveness of oil injection techniques and classical dilacerations of ovaries for determination of the number of egg-laying in mosquitoes. The odds ratio was estimated using the unconditional method of maximum likelihood (Wald). Confidence intervals were estimated using the estimation of normal approximation (Wald) method. The effect of Christophers' ovarian development stages on the effectiveness of physiological age determination techniques was assessed using logistic regression. The non-conformity indicator factor to the actual age of mosquito as endogenous factor and indicator of Christophers' ovarian development stages was taken into account as exogenous factor, followed by an analysis of deviance with the likelihood ratio test [32]. The method of definition of "contrasts" allowed us to compare the influence of Christophers' stages on the effectiveness of physiological age determination techniques. Poisson's regression was used to assess the relationship between infectivity and physiological age of mosquitoes. The likelihood ratio test was used to estimate the significance level of the relationship. Statistical tests were performed using R-2.15.2 software [33].

#### **Ethical consideration**

Ethical approval for this study was received from the Ministry of Health [N°007/2010]. Mosquito collectors gave prior informed consent and they were vaccinated against yellow fever. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive malaria treatments.

#### **Results**

##### **Structure of observed age in anopheles after oil injection and conventional ovaries dilaceration**

Polovodova method was applied with conventional ovaries dilaceration on lot 1 and with oil injection on





**Figure 2** Ovariole devoid of dilatation observed from oil injection technic (Photo CREC, 2013).



**Figure 4** Ovariole with two dilatations observed from oil injection technic (Photo CREC, 2013).

lot 2 of mosquitoes at different ovaries development stages (Additional file 1).

#### Structure of ovariole in nulliparous and parous females *Anopheles gambiae* s.s.

Polovodova method applied with oil injection technique and conventional ovaries dilaceration revealed several types of ovarioles in nulliparous and parous *An. gambiae* s.s. females. Overall, we observed ovaries with no dilatation (Figure 2) and ovarioles with one (Figure 3) or several dilatations (Figures 4 and 5). Mosquitoes with one, two or three dilatations were those that laid eggs once

(uniparous), twice (biparous) and three times (triparous). However, those with no dilatation are nulliparous.

#### Efficacy of conventional ovaries dilaceration for the determination of the number of egg-laying in females *Anopheles gambiae* s.s.

In total, 200 mosquitoes where determined physiological age using Polovodova conventional ovaries dilacerations were examined (Table 1). These mosquitoes were divided into four samples of 50 mosquitoes (respectively nulliparous, uniparous, biparous and triparous). The conventional ovaries dilaceration technique was effective in the determination



**Figure 3** Ovariole with one dilatation observed from oil injection technic (Photo CREC, 2013).



**Figure 5** Ovariole with three dilatations observed from oil injection technic (Photo CREC, 2013).

**Table 1 Efficacy of conventional ovaries dilaceration for determination of the number of egg-laying in *Anopheles gambiae* s.s**

Age	Sample	Nb conformity	Total mosquito	% conformity	OR	IC-95%(OR)	P
p0	Control	50	200	25	1.00	-	-
	CDT	38	200	19	0.70	[0.44-1.13]	0.184
p1	Control	50	200	25	1.00	-	-
	CDT	42	200	21	0.79	[0.50-1.27]	0.406
p2	Control	50	200	25	1.00	-	-
	CDT	7	200	3,5	0.11	[0.04-0.25]	<0.0001
p3	Control	50	200	25	1.00	-	-
	CDT	1	200	0,5	0.02	[0.002-0.01]	<0.0001

CDT: Conventional ovaries dilaceration technique, p0: nulliparous, p1: uniparous, p2: biparous, p3: triparous, Nb: number, IC: Confidence interval, p: p-value, OR: odds ratio.

of nulliparous and uniparous mosquitoes. With this technique, physiological age of 38 nulliparous females and 42 uniparous was confirmed (Table 1). However, this technique showed its inefficacy with multiparous mosquitoes. On 50 biparous mosquitoes, the technique just recognized 7 ( $p < 0.0001$ ). Only one mosquito was revealed triparous on the 50 dissected using the conventional ovaries dilaceration ( $p < 0.0001$ ). This result suggests that conventional ovaries dilaceration is not applicable to the determination of the number of egg-laying in *Anopheles gambiae* s.s.

#### Efficacy of oil injection technique into ovaries for determination of the number of egg-laying in females *Anopheles gambiae* s.s.

One hundred and ninety eight *An. gambiae* s.s. was examined with Polovodova oil injection technique (Table 2). This technique was applied on 4 samples representing nulliparous mosquitoes ( $n = 50$ ), uniparous ( $n = 50$ ), biparous ( $n = 50$ ) and triparous ( $n = 48$ ). Overall, the physiological age was confirmed in respectively 42 nulliparous mosquitoes, 44 uniparous, 46 biparous and 44 triparous. No significant difference was observed between the number of egg-laying and the number of dilatations observed on the ovarioles regardless of the level of parity. Oil injection technique in ovaries is more likely applicable for the

determination of the number of egg-laying in *An. gambiae* s.s. However, in this study, we were unsuccessful in determining the physiological age of all mosquitoes examined.

#### Influence of ovaries development on the determination of the number of egg-laying of anopheles using conventional ovaries dilaceration technique and oil injection into ovaries

Out of 200 mosquitoes examined with Polovodova conventional ovaries dilacerations method, a failure rate of 56% ( $n = 112$ ) of egg-laying was observed (Table 3). This rate was similar to all ovaries development stages ( $p = 0.4948$ ). However, a significant difference was observed ( $p = 0.0274$ ) with oil injection technique (Table 3). We noted that these failures did not depend on the development level of the ovaries.

#### Variation of *Anopheles gambiae* s.s. infectivity to *Plasmodium falciparum* according to physiological age

In Adjarra and Ifangni, the infected *Anopheles gambiae* s.s. were those that have laid eggs at least 2 times (Table 4). The infectivity rate of biparous *An. gambiae* mosquitoes was 35.75% in Adjarra. This rate was high in triparous mosquitoes (66.67%) (Table 4). A high infectivity rate was observed in old *Anopheles gambiae* s.s. The same observation was made in Ifangni where the infectivity

**Table 2 Efficacy of oil injection technique into ovaries for the determination of the number of egg-laying in *Anopheles gambiae* s.s**

Age	Sample	Nb conformity	Total mosquito	% conformity	OR	IC-95%(OR)	P
p0	Control	50	198	25,25	1.00	-	-
	OIT	42	198	21,21	0.80	[0.55-1.27]	0.4049
p1	Control	50	198	25,25	1.00	-	-
	OIT	44	198	22,22	0.85	[0.53-1.34]	0.554
p2	Control	50	198	25,25	1.00	-	-
	OIT	46	198	23,23	0.90	[0.57-1.42]	0.725
p3	Control	48	198	24,24	1.00	-	-
	OIT	44	198	22,22	0.89	[0.55-1.42]	0.721

OIT: Oil injection technique, p0: nulliparous, p1: uniparous, p2: biparous, p3: triparous, Nb: number, IC: Confidence interval, p: p-value, OR: odds ratio.



**Table 3 Relation between Christophers' ovarian development stages and the the number of egg-laying undetermined by Polovodova method based on oil injection and conventional dilaceration techniques**

Stage	CDT				OIT			
	N	Ind	Total	% Ind	P	N	Ind	Total
I	11	25	44.00	0.4948	6	19	31.58a	0.0274
II	88	149	59.06		13	152	08.55b	
III	9	18	50.00		1	20	05.00b	
IV	4	8	50.00		2	7	28.57a	
Total	112	200	56		22	198	11.11	

CDT: Conventional ovaries dilaceration technique; OIT: Oil injection technique; Ind: indetermination; N: Number; p = p-value; I, II, III et IV: Christophers' ovarian development stages.

rate was respectively 33.33% for biparous and 100% for triparous mosquitoes (Table 4).

A significant increase of infectivity with parity level was observed in Ifangni (OR = 5.65 [4.68, 6.81],  $p < 0.0001$ ) and-Adjarra (OR = 6.02 [4.62, 7.85],  $P < 0.0001$ ).

## Discussion

The application of oil injection and conventional ovaries dilaceration techniques showed the importance of follicular dilatations in the determination of physiological age in *An. gambiae* s.s. Despite difficulties related to oil injection into ovaries, this technique was accurate for the determination of the number of egg-laying in mosquitoes. A positive correlation was obtained between the number of egg-laying and the number of follicular dilatations observed after oil injection technique in ovaries [16,34]. The efficacy of oil injection technique is related to obtaining intact ovarioles made possible by the use of paraffin oil in inter-ovarian spaces. In addition to isolation failure observed in nulliparous females at the beginning of stage I-II, we noted some under estimation of the number of egg-laying in parous females. This observation was also reported by Rosay [35], and Hoc and Wilkes [16]. Several studies showed the fragility of ovarioles pedicel, susceptible to being broken by needles during isolation of ovaries [22,36,37]. In this condition, it is

normal that, confirmed multiparous females appear as uniparous or nulliparous [20]. The origin of the overestimation of the number of egg-laying observed needs to be clarified [35,38,39]. However, the follicular degenerative origin of dilations often occurred at stage II-III during the gonotrophic cycle [40,41]. According to some authors [16], the degenerative cycles observed during subsequent gonotrophic cycles justify the overestimation of recorded numbers of egg-laying. Overall, over and under estimations of the number of egg-laying were very few (1 to 3 for 50 mosquitoes) in our study samples [34]. As previously reported from other studies, ovarioles on which the number of dilatations overlaps exactly to the number of egg-laying are few in mosquitoes [42-44]. Therefore, if Polovodova method is applicable by oil injection for the estimation of egg-laying in *An. gambiae* s.s, it is necessary to make a meticulous reading of the majority of ovarioles before counting the number of egg-laying mosquitoes.

The extreme fragility of pedicle was the cause of inefficiency of conventional ovaries dilaceration, mainly in multiparous mosquitoes. In these mosquitoes, the pedicles lengthen with the increase of dilatations number. This fact does not often allow the isolation of intact ovarioles during classical dilaceration.

Application of oil injection technique was not easy and appeared impossible at the beginning of this study. It was difficult to introduce the tip of the micropipette into the common external lumen of the oviduct before introducing paraffin oil. This technique is usually applied by experts. This explains the small rate of mosquitoes examined by oil injection technique (6 to 8 specimens per hour) during dissection session. According to Beklemishev *et al.*, [45], for systematic use in evaluation of the efficacy of malaria control tools, a physiological age estimation method must be easy and fast. The receptivity of injected oil is relatively low in nulliparous females and did not facilitate the isolation of ovarioles at the beginning of the development of mosquitoes. More likely, the passage of eggs laid could allow opening of calyx light and of common oviduct in parous females. In case

**Table 4 Relation between physiological age and infectivity to *P. falciparum* of human landing *An. gambiae* s.s. females caught at Adjarra and at Ifangni**

egg-laying number	Adjarra				Ifangni			
	n	CS+	%CS+	IC	n	CS+	%CS+	IC
0	18	0	0	[0-18,55]	24	0	0	[0-14,25]
1	81	0	0	[0-4,45]	86	0	0	[0-4,20]
2	14	5	35,75	[12,75-64,86]	21	7	33,33	[14,58-56,97]
3	3	2	66,67	[9,43-98,16]	4	4	100	[39,75-100]
Total	116	7	06,03	[2,46-12,04]	135	11	08,14	[04,14-14,11]

n = Mosquitoes number, CS + = Positivity to circumsporozoite antigen, IC = Confidence interval, %CS + = Infectivity rate, 0: nulliparous, 1: uniparous, 2: biparous, 3: triparous.

of conventional ovaries dilaceration, it requests some manual dexterity in mosquitoes which are in Christopher's stage I-II mean. At the beginning of their development, the ovarioles are mostly stacked together until their isolation requests more applications. This phenomenon can justify failures of some ovarioles isolation observed in stage I and II during the study.

For mosquitoes collected using human landing catch, only those that have laid at least two times were found positive to *P. falciparum* in both districts of the study. This is justified by the extrinsic incubation time duration of *P. falciparum* which is 10 to 12 days in *An. gambiae* s.s. before mosquitoes become infectious [46]. This duration is due to the gonotrophic cycle time which is 4 to 5 days for the first egg-laying in *An. gambiae* s.l. [47]. Hamon [36] reported that Anopheles mosquitoes cannot transmit malaria when they have less than two weeks, because the percentage of human carriers of gametocytes is low and it is also rare for the first blood meals to be infectious. This idea explains the reason why infectivity rate was high in biparous and triparous mosquitoes in Adjarra and Ifangni. These results confirm the hypothesis that the likelihood for *An. gambiae* mosquitoes of being infected increases with the number of blood meals and the number of egg-laying [45].

## Conclusion

Polovodova classical ovaries dilaceration method is not indicated for the determination of egg-laying in *An. gambiae* s.s. Polovodova oil injection method is more effective but more difficult to handle. Overall, the number of dilatations observed on ovarioles was confirmed with the number of egg-laying of mosquitoes. The use of oil injection technique allowed us to demonstrate that vectors' likelihood of being infected increases with the number of gonotrophic cycles. Infectious mosquitoes observed are those that have laid eggs at least 2 times.

## Additional file

**Additional file 1: Tableau Structure of physiological age of wild anopheles reared at insectarium.**

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

RA, GP, RO and MA conceived the study. RA, GP, MAG, MA and RO have participated in the design of the study. RA, AS, MAG and RO carried out the field activities and the laboratory analyses. RA, KB, RAT, RAA, MAG have participated in laboratory studies. VG has contributed to the mapping. FO did statistical analyzes. RA and MA drafted the manuscript. RA, FA, RAZ, AS and MA critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful to the USAID through PMI (President Malaria Initiative) and Bill & Melinda GATES Foundation which supported financially this study. The authors would also like to thank the populations of Adjarra and Ifangni for their collaboration.

## Author details

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin. <sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Calavi, Bénin. <sup>3</sup>University of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA.

Received: 22 October 2014 Accepted: 12 February 2015

Published online: 22 February 2015

## References

- Charlwood JD, Lopes J. The age-structure and biding behavior of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Brazil. *Bull Entomol Res.* 1980;70:549–55.
- Detinova TS. The determination of the physiological age of the females of *Anopheles gambiae* by changes in the tracheal system of the ovaries. *Med Parazit.* 1945;14:45–9.
- Mokry JE. A method for estimating the age of field-collected female *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae). *Tropenmed & Parasitol.* 1980;31:374–80.
- Waloff N. Some methods of interpreting trends in field populations. *Prod X Int Congr Entomol.* 1958;2:675–6.
- Usenger RL. Monography of Cimicidae. *Entomol Soc Am.* 1966;7:1–585.
- Moon RD, Kaya HK. A comparison of methods for assessing age structure and abundance of populations of non-diapausing female *Musca autumnalis* (Diptera, Muscidae). *J Med Entomol.* 1981;18:289–97.
- Ellison JR, Hampton EN. Age determination using the apodeme structure in adult screw worm flies (*Cochliomyia hominivorax*). *J Insect Physiol.* 1982;28:731–6.
- Lewis DJ. Determination of parous rates in phlebotomine sandflies with special reference to Amazonian species. *Bull Entomol Res.* 1970;60:209–19.
- Ramirez-Perez J, Rassi E, Convit J, Ramirez A. Epidemiological importance of age groups in colonies of *Simulium metallicum* (Diptera: Simuliidae) in Venezuela. *Boln of sanit pan-am.* 1976;80:105–22.
- Rosay B. Anatomical indicators for assessing the age of mosquitoes: the teneral adult (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 1961;54:526–9.
- Millest AL, Cheke RA, Howe MA, Garms R. Determining the ages of adult females of different members of *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) by the pteridine accumulation method. *Bull Entomol Res.* 1992;82:219–66.
- Perry R. Malaria in the jeypore Hill Tract and adjoining coastland. *Paludism.* 1912;5:32.
- Saunders DS. Age determination for female tsetse flies and the age compositions of samples of *Glossina pallidipes* Aust, *G. palpalis fuscipes* Newst and *G. brevipalpis* Newst. *Bull Entomol Res.* 1962;53:579–95.
- Polovodova VP. The determination of the physiological age of female *Anopheles* by the number of gonotrophic cycles completed. *Med Parazitol Parazitar Bolezni.* 1949;18:352–5.
- Detinova TS. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Wld Hlth Org.* 1962;47:1–216. Monograph Series.
- Hoc TQ, Wilkes TJ. The ovarioles structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: culicidae) and its use in determining physiological age. *Bull Ent Res.* 1995;85:59–69.
- Gillies MT, Wilkes TJ. A study of the age composition of *Anopheles gambiae* Giles and *A. funestus* Giles in North-eastern Tanzania. *Bull Entomol Res.* 1965;56:237–62.
- Snow WF, Wilkes TJ. Age composition and vertical distribution of mosquito populations in the Gambia, West Africa. *J Med Entomol.* 1977;13:507–13.
- Lines DJ, Wilkes TJ, Lyimo EO. Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoites rates in *Anopheles gambiae* in Tanzania. *Parasitology.* 1991;102:167–77.
- Brady J. Results of age-grouping dissections on four species of *Anopheles* from Southern Ghana. *Bull Wld Hlth Org.* 1963;29:147–53.
- Giglioli MEC. The age composition of *Anopheles melas* Theobald (1903) populations collected simultaneously by different methods in Gambia, West Africa. *Cahiers ORSTOM, Ser Entomol Med.* 1965;3–4:11–26.

22. Hamon J, Chauvet G, Thélin L. Observations sur les méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des femelles d'anophèles. *Bull Wld Hlth Org.* 1961;24:437–43.
23. Institut National de la Statistique Appliquée et de l'Economie. Recensement général de la population du Bénin. Cotonou, Benin: INSAE; 2002.
24. Sovi A, Azondékon R, Aikpon RY, Govoétchan R, Tokponnon F, Agossa F, et al. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasit Vectors.* 2013;6:319.
25. Arthur S, Renaud G, Filémon T, Hermine H, Rock A, Fiacre A, et al. Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasit Vectors.* 2013;6:352.
26. Christophers SR. The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism.* 1991;2:73–88.
27. Gillies MT, De Meillon B. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. *Publ S Afr Inst Med Res.* 1968;54:343.
28. Gillies MT, Coetzee MA. Supplement to the *Anophelinae* of Africa South of the Sahara, 2nd edn. *Publ S Afr Inst Med Res.* 1987;55:143.
29. Burkot TR. Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Trop Med Hyg.* 1984;33(5):783–8.
30. Scott J, Boogdon W, Collins F. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:520–9.
31. Kenneth R. *Epidemiology: An Introduction.* Oxford: Oxford University Press; 2002.
32. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S.* New York: Springer; 2002.
33. Development Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2011. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
34. Hoc QH. Morpho-histological changes in the ovarioles and determination of physiological age in haematophagous insects of medical importance. *Zoologica Poloniae.* 1995;40(1-4):5–65.
35. Rosay B. Anatomical indicators for assessing age of mosquitoes: changes in ovarian follicles. *Ann Entomol Soc Am.* 1969;62:605–11.
36. Hamon J. Etude de l'âge physiologique des femelles d'anophèles dans les zones traitées au DDT, et non traitées, de la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. *Bull Org Mond Santé.* 1963;28:83–109.
37. Giglioli MEC. The problem of age determination in *Anopheles melas* Theobald (1903), by Polovodova's method. *Cahiers ORSTOM, Ser Entomol Med and Parasitol.* 1965;3–4:157–66.
38. Bellamy RE, Corbet PS. Occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes. *Mosq News.* 1974;34:334–5.
39. Nayar JK, Knight JW. The occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes: *Culex nigripalpus*. *Mosq News.* 1981;41:281–7.
40. Hoc TQ, Charlwood JD. Age determination of *Aedes cantans* using the ovarian oil injection technique. *Med Vet Entomol.* 1990;4:227–33.
41. Fox AS, Brust RA. How do dilatations form in mosquito ovarioles? *Parasitol Today.* 1994;10:19–23.
42. Hayashi S, Kurihara T. Studies on the age of mosquitoes. I. The determination of physiological age of *Culex pipiens pallens* by the relics formed at ovarioles after the oviposition. *Jap J Sanit Zool.* 1965;16:29–33.
43. Liu T. Observations on the physiological age of *Culex pipiens pallens* Coquillett and *Aedes albopictus*. *Acta Entomol Sinica.* 1965;14(2):179–85 (in Chinese).
44. Hugo LE, Quick-Miles S, Kay BH, Ryan PA. Evaluations of mosquito age grading techniques based on morphological changes. *J Med Entomol.* 2008;45(3):353–69.
45. Beklemishev WN, Detinova TS, Polovodova VP. Determination of physiological age in Anophelines and of age distribution in Anopheline populations in the USSR. *Bull Wld Hlth Org.* 1959;21:223–32.
46. McDonald G. *The Epidemiology and Control of Malaria.* London: Oxford University Press; 1957. p. 252.
47. Beklemishev WN. Le cycle gonotrophique, principe de base de la biologie de *An. gambiae*. *Vop Fiziol Ekol Malar Komara.* 1940;1:3.

**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](http://www.biomedcentral.com/submit)



## Full Length Research Paper

## Development of new combined method based on reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations for determining the physiological age of *Anopheles gambiae* s.s.

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Roseric Azondékon<sup>1</sup>, Bruno Akinro<sup>1</sup>, Frédéric Oké-Agbo<sup>1,2</sup>, Gil Germain Padonou<sup>1,2</sup>, Renaud Govoetchan<sup>1,2</sup>, Rock Aikpon<sup>1,2</sup>, Arthur Sovi<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin.

<sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin.

Received 19 November, 2014; Accepted 5 January, 2015

The conventional dilaceration of ovaries is binding at the beginning of ovary development. However, reading ovarian tracheoles was very easy in stage I-II mean. The combination of both methods can really reduce the number of age indeterminations recorded with the two methods separately. The present study aimed to identify a method capable of determining physiological age of mosquitoes regardless of their ovarian development stage. In the present study, mosquitoes were caught in houses using window traps. After identification of *Anopheles gambiae* s.l species, their ovaries were dissected in distilled water. An ovary was left in distilled water for tracheoles reading and the other in a physiological liquid to search for follicular dilatation after dilaceration of ovary. The other body parts of mosquitoes were used to identify the species of the *A. gambiae* complex by polymerase chain reaction. The ovarian tracheoles reading method was unable to determine physiological age of 25% (n=28) of 112 *A. gambiae* s.s. analyzed. With follicular dilations observation method, the physiological age of 16.96% (n=19) mosquitoes was not determined; but, the age indetermination rates were reduced to 0.89% by combining the two methods. The combination of ovarian tracheoles reading method and follicular dilatation observation method significantly reduced (almost null) the number of physiological age indeterminations recorded using the two methods separately.

**Key words:** *Anopheles gambiae* s.s, ovary, physiological age, ovarian tracheoles, classical dilacerations, follicular dilatation.

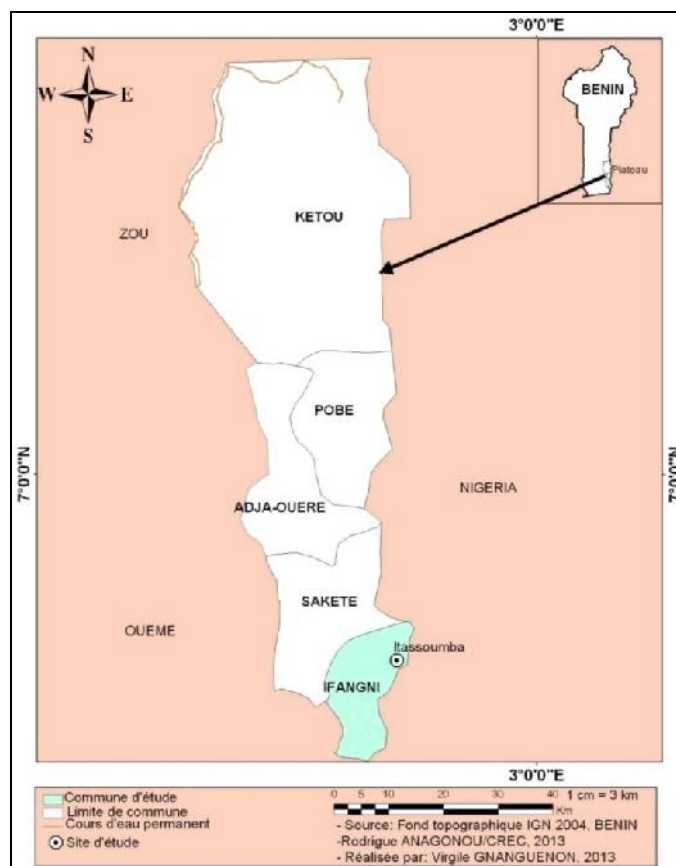
### INTRODUCTION

In 2013, the number of malaria cases was estimated at 198 million in the world with 82% in Africa region and

causing 584000 deaths (WHO, 2014). In the same period, the number of deaths due to malaria was

\*Corresponding author. E-mail: [rodrigue.anagonou@yahoo.fr](mailto:rodrigue.anagonou@yahoo.fr). Tel: (+229) 96 12 18 63.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](#)



**Figure 1.** Map showing the village of Itassoumba in the district of Ifangni, Benin.

estimated at 2288 in Benin (OMS, 2014; MS, 2014). Vector control is the main strategy for malaria prevention. The aim of vector control is to reduce the number of infectious vectors (Hamon et al., 1961). Vector longevity is one of the most used indicators for assessing the effectiveness of vector control programs. According to Polovodova method, the number of dilatations observed on ovarioles should be equal to the number of egg-laying (physiological age) in females of mosquitoes (Hugo et al., 2008). Difficulties observed when applying Polovodova method justify the use of Lewis method (Mondet, 1996) to facilitate the identification of nulliparous females which have not laid and those which have laid at least once during their live cycle. With Lewis method, ovarioles are separated in a physiological serum and the absence (nulliparous females) or presence (parous females) of dilatations on ovarioles (follicles) is verified with a microscope (Hamon et al., 1961). At the beginning of ovaries' development, ovarioles are more joined one to others and their isolation is not easy during classical dilaceration of ovaries. In a sample where the number of mosquitoes at beginning of their ovarian development is important, Lewis method becomes difficult and therefore

leads to an impossibility to determine physiological age of mosquitoes dissected. However, the usual method of Detinova based on ovarian tracheoles aspects is easily with mosquitoes in stage I-II mean of their ovarian development (Hugo et al., 2008). In a representative sample where about 1/5 of the specimens are not examined, the representativeness of the sample size is weakened. The combination of ovarian tracheoles reading method and follicular dilatations observation method can really reduce the number of mosquitoes whose physiological age cannot be determined when both methods are used separately. The aim of this study was to explore a method capable of determining physiological age of all mosquitoes submitted for examination regardless of their ovarian development stage.

## METHODOLOGY

### Study area

Entomological surveys were carried out between May and November 2013 at Itassoumba (Figure 1) in Ifangni district (Province of plateau) located 06°38'56"N and 02°43'14"E in South-east of Benin with 71606 inhabitants (INSAE, 2002). Itassoumba





**Figure 2.** Nulliparous ovary (tracheoles coiled) according to Detinova (CREC, 2013).

has a rugged relief with the presence of some depressions. The climate is Guinean with two dry and rainy seasons: a great rainy season from March to July, a small dry season in August, a small rainy season from September to November and a great dry season from December to February. Itassoumba recorded an annual rainfall between 800 and 1400 mm water. The vegetation includes relics of sacred forests, plantations of oil palms, shrubs and tall grasses. Itassoumba is crossed by swamps. In the dry season, the breeding sites of *Anopheles gambiae* s.l are scarce. They are particularly permanent in Itassoumba due to the presence of fish ponds and marshes for vegetable farming.

#### Sampling of mosquitoes

Mosquitoes were caught using window traps from 6 to 18 h. Indoor biting and outdoor resting mosquitoes were collected and kept separately in Eppendorf tube until taken to the laboratory.

#### Identification, dissection of ovaries and determination of physiological age of females of *A. gambiae* s.l

Mosquitoes species collected were morphologically identified (Gillies and Coetzee, 1987; Gillies and De Meillon, 1968). The ovaries of mosquitoes were dissected in distilled water using binocular microscope. One ovary of each mosquito is put on lamella in distilled water and the second on other lamella in physiological liquid (Natrachlorid 0.9% + Neutral red 1/5000-1/3000). After drying, tracheoles of ovaries were examined with a microscope (4-10x) using Detinova method (Hugo et al., 2008). The tracheoles are wound (platoons) in nulliparous mosquitoes but are unwound in parous females. Moreover, the presence of follicular dilatation was verified after classical dilaceration of ovaries transferred in physiological liquid. According to Lewis method (Mondet, 1996), parous mosquitoes have at least one dilatation on their ovarioles but the nulliparous females do not have one.

#### Characterization of *A. gambiae* species complex

Abdomen, wings and legs of dissected mosquitoes were used for *A. gambiae* species identification using PCR (Scott et al., 1993).

#### Statistical analysis

To assess the reliability of method based on the observation of follicular dilatations for the determination of physiological age, we have compared the percentage of parous and nulliparous females between Detinova and Lewis methods by estimating the p-values using Fisher test.

Pairwise comparison of unreadable lamellas following the ovarian development stages was done using pairwise comparison test of multiple proportions (Robert, 1998) with Holm adjustment of p-value (Benjamini and Yekutieli, 2001). The same approach was used for the comparison of indetermination rate obtained by combining Lewis and Detinova methods to that obtained using these methods separately. All statistical analyses were done using R.2.15.2 (Development Core Team, 2011).

## RESULTS

#### Structure of ovaries and ovarioles showing physiological age in *A. gambiae* s.s.

Figures 2 and 3 shows respectively after microscopic observations, the curled aspect of ovarian tracheoles and the absence of follicular dilatation in nulliparous females. However, Figures 4 and 5 show respectively the absence of curled aspect of tracheoles and the presence of a follicular dilatation in parous females.

#### Comparison of ovarian tracheoles reading method and follicular dilatations observation method for determination of physiological age in *A. gambiae* s.s.

On 112 females of *A. gambiae* s.s. examined, 20 (17.86%) and 16 (14.28%) nulliparous females were identified respectively by ovarian tracheoles aspect and the observation of follicular dilatations. No significant difference was observed between these two rates ( $p=0.505$ ) (Table 1). 64 (57.14%) females were parous according to ovarian tracheoles method against 77 (68.75%) for follicular dilatations observation method. No



**Figure 3.** Nulliparous ovary (no dilatation) according to Lewis (CREC, 2013).



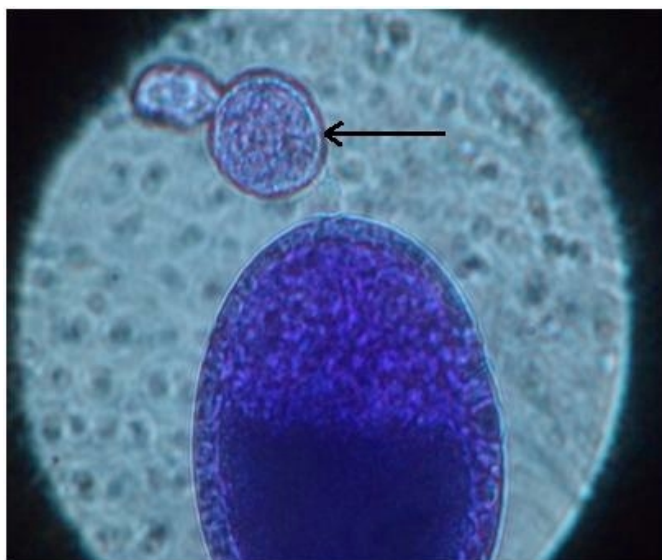
**Figure 4.** Parous ovary (tracheoles unwound) according to Detinova (CREC, 2013).

significant difference was observed between these two rates ( $p=0.314$ ) (Table 1). These results confirm that the use of follicular dilatations is a reliable method for *A. gambiae* s.s physiological age determination.

#### **Influence of ovarian development stage on ovarian tracheoles reading method and the follicular dilatations observation method for determination of *A. gambiae* s.s. physiological age**

With 112 mosquitoes examined by ovarian tracheoles reading method, 25% ( $n=28$ ) were unreadable and this

rate increased significantly with ovaries development ( $p<0.05$ ) (Table 2). The unreadable ovaries were 4.94% at stage I-II mean against 85.71% at stage II aged-IV of ovaries development (Table 2). According to the follicular dilatations observation method, the distribution of 16.96% ( $n=19$ ) of mosquitoes whose age was not determined was homogenous following the ovarian development (Table 2). The majority of indeterminations (84.21%) was recorded in stage I-II mean with the observation of follicular dilatations (Table 2). Overall, the indeterminations of physiological age recorded with ovarian tracheoles reading method were associated with ovaries development. However, with follicular dilatations observa-



**Figure 5.** Parous ovariole (having a dilatation) according to Lewis (CREC, 2013).

**Table 1.** Reliability of the observation of follicular dilatations for the determination of physiological age of *A. gambiae* s.s.

Parity	Tracheoles	Dilatation	p-value
Nulliparous	20 (17.86%)	16 (14.28%)	0.505
Parous	64 (57.14%)	77 (68.75%)	0.314
Unreadable	28 (25.00%)	19 (16.96%)	
Total	112 (100.00%)	112 (100.00%)	-

tion method, no association was observed between the indeterminations of physiological age and the development stage of ovaries.

#### **Efficacy of combination ovarian tracheoles reading method and follicular dilatations observation method for the determination of physiological age of *A. gambiae* s.s.**

The two methods based on the reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations were applied simultaneously on 112 females *A. gambiae* s.s (Table 3). The ovarian tracheoles reading method was not able to determine the physiological age of 25% (n=28) *A. gambiae* s.s. while follicular dilatations observation method was not able to determine 16.96% (n=19). The indetermination rate of the physiological age was almost null (00.89%) with the combination of the two methods on the same sample (Table 3). A significant difference was observed between the indeterminations obtained with the two methods separately and those obtained with their combination ( $p < 0.001$ ).

Overall, the combination ovarian tracheoles reading method and follicular dilatations observation method significantly reduced (almost null) the number of mosquito whose physiological age could not be determined using these methods separately.

#### **DISCUSSION**

The results of this study confirm the inefficacy of Detinova method (1962) observed from stage II age of ovarian development. Several authors (Germain et al., 1974; Cornet et al., 1978) showed that from stage II age, the reserves of vitellus become enormous and recover completely tracheoles network making ovaries unreadable after drying. Reading of ovarian tracheoles is the basic method used for the determination of physiological age of mosquitoes. This method is rapid, cheaper and easy to apply once the ovaries are extracted (Beklemishev et al., 1959). In addition, mosquitoes collected using human landing catch are more indicated for the application of Detinova method based on the ovarian tracheoles aspect. Human landing catch provides overall starve and pre-gravid mosquitoes which are in



**Table 2.** Variation of indetermination rate of physiological age following the development of ovarian stages after the reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations.

Stage	Total Mstq	Tracheoles		Dilatation	
		N (i)	% (i)	N (i)	% (i)
I	12	0	0.00 <sup>b</sup>	7	58.33 <sup>a</sup>
IId	50	2	4.00 <sup>b</sup>	5	10.00 <sup>b</sup>
IIIm	19	2	10.53 <sup>b</sup>	4	21.05 <sup>ab</sup>
IIIf	14	9	64.29 <sup>a</sup>	0	0.00 <sup>b</sup>
III	11	9	81.82 <sup>a</sup>	2	18.18 <sup>ab</sup>
IV	6	6	100.00 <sup>a</sup>	1	16.67 <sup>ab</sup>
Total	112	28	25.00	19	16.96

d: Beginning, m: mean, f: aged, N: number, Mstq: mosquito, i: indetermination. Percentages which carry same letters in exposant were not significantly different ( $p>0.05$ )

**Table 3.** Results of the combination of the reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations for the determination of the physiological age of *A. gambiae* s.s.

Methods age	N mstq	N (i)	% (i)
Dilatations	112	19	16.96a
Tracheoles	112	28	25a
Trac & dil	112	1	0.89b

Trac: Tracheole, dil: dilatation, N: number, mstq: mosquito, i: indetermination. Percentages which carry same letters in exposant were not significantly different ( $p>0.05$ ).

stage I-II mean of their ovarian development. However, window trap catch and indoor residual morning spray catch have the advantage to provide not only, starve and pre-gravid mosquitoes, but also blood fed mosquitoes whose ovaries are over stage II mean.

Classical dilaceration of ovaries requests technical delicacy for physiological age determination of vectors (Mondet, 1996). Ovarioles isolation is not easy at stage I and II, beginning of ovaries development. At the beginning of ovaries' development, the ovarioles are joined one to another and their separation requests manual dexterity; this is not the case for mosquitoes at stage II aged-IV. This phenomenon explains the high number of indetermination age (16/19) recorded in mosquitoes at stage I-II mean of their ovarian development.

The fragility of pedicle of ovarioles was demonstrated (Mondet, 1993; Hoc and Wilkes, 1995b). In nulliparous mosquitoes, the pedicle of ovarioles is very short; this facilitates maintaining ovarioles intact during their isolation. However, in parous females, the pedicle of ovarioles elongates with successive egg-laying (Mondet,

1996). This phenomenon generates and extreme fragility of pedicle susceptible to breakage on the smallest needle moves during isolation of ovarioles (Mondet, 1993; Giglioli, 1965b). After ovarioles isolation, we observed at least a follicular dilatation in parous females during dissections.

This study shows that, the combination of ovarian tracheoles reading method and the follicular dilatations observation was very efficient for determination of *A. gambiae* s.s. physiological age. On 112 mosquitoes examined with the combination of the two methods, the physiological age of only one mosquito (0.89%) was not determined. These results show that the combination of Detinova and Lewis methods is able to determine the physiological age of all mosquitoes submitted for examination. This efficiency confirms the reciprocal complementarity of efficacy that exists between ovarian tracheoles reading method and follicular dilatations observation method. In addition, the combined application of the two methods is constraining when it is not implemented in team. Even for an experimented researcher, the combination of both methods on a

representative sample requests more time. For a systematic use in vector control evaluation, an easy and very rapid physiological age estimation method must be encouraged (Hamon et al., 1961).

## Conclusion

The combination of ovarian tracheoles reading method and follicular dilatations observation method is very efficient for *A. gambiae* s.s. physiological age determination. It can be used over stage II age without physiological age indetermination. However, the combination of both methods requires technical expertise and delicacy. Also, the application seems difficult when it is not realized in team.

## Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Bill & Melinda GATES Foundation which supported financially this study. Rodrigue ANAGONOU obtained financial support for his doctoral training from Ministry of the Higher Education and of Scientific Research.

## REFERENCES

- Beklemishev WN, Detinova TS, Polovodova VP (1959). Determination of physiological age in Anophelines and of age distribution in Anopheline populations in the USSR. Bull. World Health Organ. 21:223-232.
- Benjamini Y, Yekutieli D (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. The Annals Stat. 29(4):1165-1188.
- Cornet M, Chateau R, Valade M, Dieng PL, Raymond H, Lorand A (1978). Données bio-écologiques sur les vecteurs potentiels du virus amaril au Sénégal oriental. Rôle des différentes espèces dans la transmission du virus. Cahiers O.R.S.T.O.M., Sér. Entomol. Méd. et Parasitol. 16:315-341.
- Detinova TS (1962). Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monogr Ser World Health Organ. 47:13-191.
- Development Core Team (2011). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Germain M, Herve JP, Geoffroy B (1974). Evaluation de la durée du cycle trophogonique d'*Aedes africanus* (Théobald), vecteur potentiel de fièvre jaune, dans une galerie forestière du sud de la République Centrafricaine. Cahiers O.R.S.T.O.M., Sér. Entomol. Méd. et Parasitol. 12:127-134.
- Giglioli MEC (1965b). The problem of age determination in *Anopheles melas* Théobald (1903), by Polovodova's method. Cahiers ORSTOM, Ser. Entomol. Méd. et Parasitol. 3 & 4:157-166.

- Gillies MT, De Meillon B (1968). The Anophelinae of Africa south of the Sahara. Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. 54:343.
- Gillies MT, Coetzee MA (1987). Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara, 2nd edn. Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. 55:143.
- Hamon J, Chauvet G, Thélin L (1961). Observations sur les méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des femelles d'anophèles 24:437-443.
- Hoc TQ, Wilkes TJ (1995b). The ovarioles structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: culicidae) and its use in determining physiological age. Bull. Ent. Res. 85:59-69.
- <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485300052020>
- Hugo LE, Quick-Miles S, Kay BH, Ryan PA (2008). Evaluations of mosquito age grading techniques based on morphological changes. J. Med. Entomol. 45(3):353-369.
- <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/45.3.353>
- Institut National de la Statistique Appliquée et de l'Economie (INSAE) (2002). Recensement général de la population du Bénin. Cotonou, Benin: INSAE.
- Ministère de la Santé (2014). Annuaire des statistiques sanitaires 2013.
- Mondet B (1993). Application de la méthode de Polovodova à la détermination de l'âge physiologique des *Aedes* (Diptera : culicidae) vecteurs de la fièvre jaune. Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.). 29(1):61-76.
- Mondet B (1996). Epidémiologie des arboviroses: utilisation et intérêt de la détermination de l'âge physiologique des femelles de moustiques vecteurs. Bull. Soc. Path. Ex. 89:155-160.
- Robert GN (1998). Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. Statist. Med. 17: 857-872.
- [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19980430\)17:8<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19980430)17:8<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E)
- Scott J, Boogdon W, Collins F (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by PCR. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49:520-529.
- World Health Organization (WHO) (2014). World Malaria Report. World Health Organization, Geneva.



# Journal of Coastal Life Medicine

journal homepage: [www.jclmm.com](http://www.jclmm.com)

Original article

doi:10.12980/JCLM.3.2015J5-52

©2015 by the Journal of Coastal Life Medicine. All rights reserved.

## Observation of granulations in the basal body of ovarioles and follicular dilatations for the determination of physiological age of *Anopheles gambiae* s.s.

Rodrigue Anagonou<sup>1,2\*</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Fiacre Agossa<sup>1,2</sup>, Bruno Akinro<sup>1</sup>, Armand Akpo<sup>1,2</sup>, Martial Gbegbo<sup>1</sup>, Albert Salako<sup>1</sup>, Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center of Entomological research of Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin

<sup>2</sup>Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey Calavi, Calavi, Benin

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 May 2015

Accepted 23 May 2015

Available online 11 Jun 2015

#### Keywords:

*Anopheles gambiae* s.s.

Physiological age

Ovarioles

Dilatations

Granulations

### ABSTRACT

**Objective:** To explore ovariole basal body granulations and follicular dilatations for determining physiological age in *Anopheles gambiae* s.s. (*An. gambiae* s.s.).

**Methods:** Mosquitoes were collected by using window trap catch and identified morphologically. For the first lot of mosquitoes, they were dissected, and ovary was left in distilled water for reading ovarian tracheoles and the second was cut and transferred to another blade in a physiological liquid for verification of ovariole basal body granulations. The same approach was followed with the second lot of mosquitoes where follicular dilatations were found after classic dilaceration of ovaries were transferred into physiological liquid. The other body parts of mosquitoes were used to identify the species of the *An. gambiae* s.s. complex by PCR.

**Results:** Among the 123 *An. gambiae* s.s. of the first lot, the method of Detinova determined the age of 89 mosquitoes versus 114 for the observation of granulations ( $P > 0.05$ ). Among the 112 *An. gambiae* s.s. of the second lot, the method of Detinova determined the age of 84 mosquitoes versus 93 for the observation of follicular dilatations ( $P > 0.05$ ). Unlike the method of Detinova, observation of follicular dilatations and basal body granulations of ovarioles were possible beyond the stage II Christophers.

**Conclusions:** Overall, the observation of follicular dilatations and ovariole basal body granulations are reliable for the determination of the physiological age in *An. gambiae* s.s. Furthermore, these two methods can be used beyond the stage II.

## 1. Introduction

The physiological age of malaria vectors is an important indicator in the evaluation of vector control means. The main objective of vector control means is to destroy vectors that are able to have sporozoites in their salivary gland[1]. The common method used to determine the physiological age of mosquitoes is the one described by Detinova, which is based on the aspect of ovarian tracheoles[2-4]. However, this method is not applicable in vectors of which the ovaries have evolved beyond stage II[2]. In this case, human landing catch is the appropriate type of mosquitoes sampling. Human landing catch allows capturing mosquitoes of stage I-II,

and this favors ovarian tracheole method. Unfortunately, this kind of sampling causes ethical problems. Despite of all precautions to protect capturers, some are bitten by mosquitoes before catching them.

Window trap catch and the collection of residual mosquitoes in interior of houses have the advantage of providing starved mosquitoes, but they are fewer in quantity and some of them have already taken a partial blood meal. Consequently, among mosquitoes caught by using window trap or spray, there are females of beyond stage II-mean. It is, therefore, important to explore other determination methods of physiological age which can be used to examine the ovaries beyond stage II. Thus, this study was implemented to study other determination methods of physiological age of anopheles. If the observation of follicular dilatations and granulations of basal bodies have been used, they are not well known for the determination of physiological age of malaria vectors[5-7].

\*Corresponding author: Rodrigue Anagonou, Center of Entomological research of Cotonou, 06 BP 2604 Cotonou, Benin.

Tel: (+229) 96 12 18 63

E-mail: [rodrigue.anagonou@yahoo.fr](mailto:rodrigue.anagonou@yahoo.fr)

Foundation Project: Supported by Bill & Melinda GATES Foundation and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Benin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

The study was conducted (between May and November 2013) in the region of Plateau in the south-east part of Benin and specifically at Itassoumba in the district of Ifangni (Figure 1). This region has an area of 3264 km<sup>2</sup>, with a total population of 407 116 inhabitants[8]. The number of malaria cases recorded there in 2011 and 2012 were 40512 and 33745 respectively[9-11]. The village of Itassoumba has rugged relief with the presence of some depressions. We found Guinean climate alternated during year between two dry and two rainy seasons: a long rainy season from March to July and a short dry season during the month of August, a short rainy season from September to November and a long dry season from December to February. Itassoumba recorded annual precipitation between 800 mm and 1400 mm. The vegetation is composed of sacred forests, plantations of oil palms, shrubs and tall grasses. Itassoumba has swamps scattered all over. In the dry season, the breeding sites of *Anopheles gambiae* s.l. (*An. gambiae* s.l.) are scarce but permanent in Itassoumba due to the presence of fish ponds and marshes for market gardening. When animal feed reserved for fish gets onto the water's surface, it provides a source of food for the proliferation of malaria vectors, *Anopheles*.



**Figure 1.** Map of the village of Itassoumba in the district of Ifangni, Benin.

### 2.2. Sampling of mosquitoes

Indoor biting and outdoor resting mosquitoes were collected by using window trap from 6 p.m. to 6 a.m.

### 2.3. Identification, dissection of ovaries and determination of physiological age of females *An. gambiae* s.l.

Anophelines collected were morphologically identified to species by using taxonomic keys of Aikpon *et al.* and Ossè *et al.*[3,12]. The ovaries of the first lot of *An. gambiae* s.l. were dissected in distilled water with a microscope. Each mosquito ovary was left in distilled water and the second was cut and transferred to another blade in a physiological liquid (Natriumchlorid 0.9% + Neutral red 1/5000-1/3000). Similarly, the same approach was followed with the second lot of mosquitoes.

After drying, the ovarian tracheoles left in the distilled water were examined by the method of Detinova[2,3]. The presence of granulations was directly verified in the basal ovariole body transferred in the physiological liquid in the first lot of mosquitoes. The presence of granulations in the basal body of ovariole indicated that the mosquitoes were parous. Nulliparous females were without granulations[5]. In the second lot of mosquitoes, the presence of follicular dilatation was found after the classical dilaceration of ovaries transferred in the physiological liquid. Mosquitoes with at least a follicular dilatation were parous. Those without dilatation were nulliparous[2,6].

### 2.4. Characterization of *An. gambiae* species complex

Abdomen, wings and legs of dissected mosquitoes were used individually for *An. gambiae* species identification using PCR according to the protocol of Mala *et al.*[13,14].

### 2.5. Statistical analysis

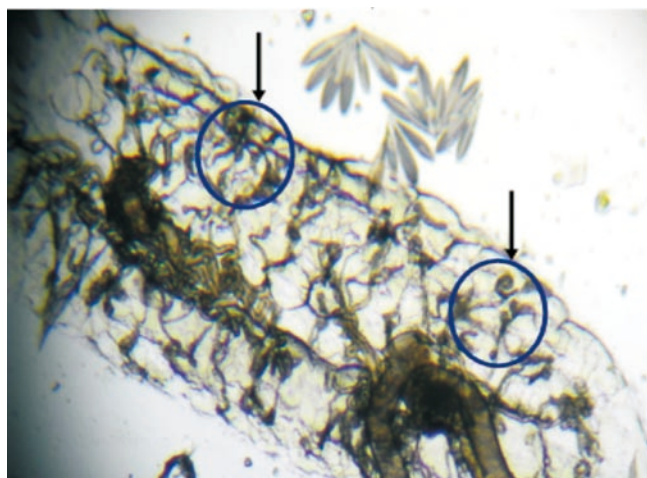
To appreciate the reliability of methods based on the observation of follicular dilatations and the ovariole basal body granulations for the determination of physiological age, we compared the percentage of parous and nulliparous females between Detinova method and those of follicular dilatations and of granulations by calculating the *P*-values using Fisher's test. Also, pairwise comparison of unreadable lamellas following the ovarian development stages was done using pairwise test of comparison of multiple proportions with adjustment of *P*-value of Holm[2]. All analyses were done by using R.2.15.2[15,16].

## 3. Results

### 3.1. Structure of ovaries

Figures 2, 3 and 4 show the curled aspect of ovarian tracheoles, the basal body without granular ovarioles and the absence of follicular dilatations in nulliparous females respectively. However, Figures 5, 6 and 7 show the non-curved aspect of ovarian tracheoles, the presence of granulations in the basal body of ovarioles and the presence of a follicular dilatation in parous females respectively.

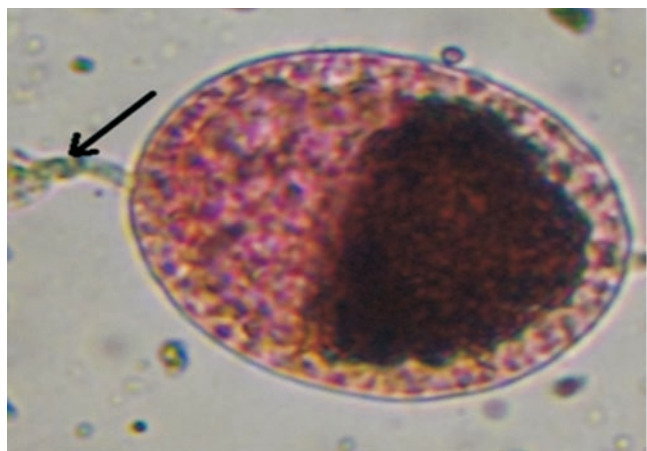




**Figure 2.** Nulliparous ovary (coiled tracheoles) according to Detinova (100 ×; CREC, 2013).



**Figure 3.** Nulliparous ovary (no granulations) according to Hoc (40 ×; CREC, 2013).



**Figure 4.** Nulliparous ovary (no dilatation) according to Lewis (40 ×; CREC, 2013).

### 3.2. Comparison of the reading of ovarian tracheoles and observation of granulations in the basal body of ovarioles

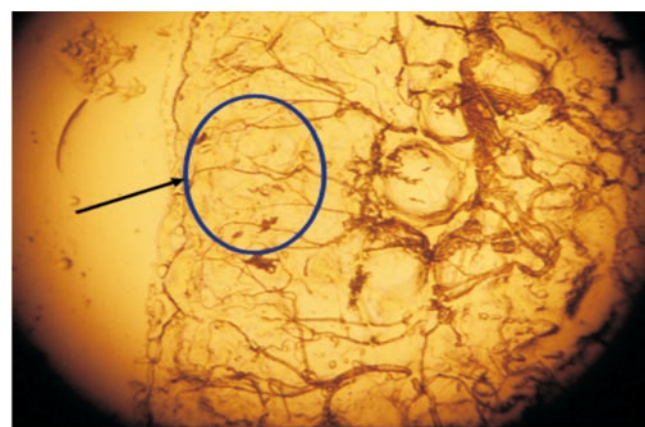
Among 123 females of *Anopheles gambiae* s.s. (*An. gambiae* s.s.) examined, 33.34% ( $n = 41$ ) were identified nulliparous by the reading of ovarian tracheoles and 30.08% ( $n = 37$ ) were identified nulliparous by the observation of granulations in the basal body of

ovarioles (Table 1). No significant difference was observed between these two rates ( $P = 0.651$ ). In the same lot of mosquitoes, 39.02% ( $n = 48$ ) were identified parous from the reading of ovarian tracheoles and 62.60% ( $n = 77$ ) were identified parous by the observation of granulations of ovarioles. The determination of physiological age based on the observation of granulation seemed to be more effective than the method based on the reading of ovarian tracheoles ( $P = 0.009$ ) (Table 1). The use of granulations present in the basal body of ovarioles was a reliable method for the determination of physiological age in *An. gambiae* s.s.

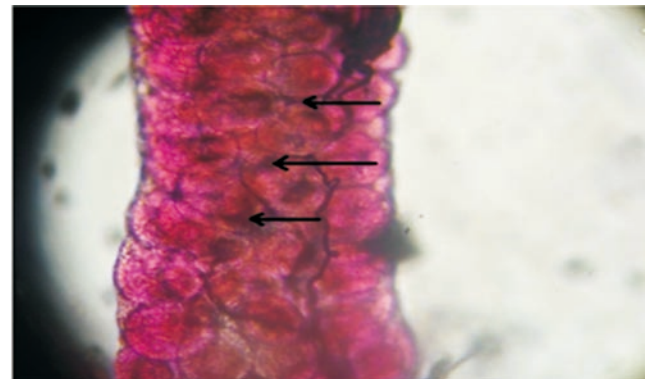
**Table 1**

Reliability of the observation of granulations in the basal body of ovarioles for the determination of the physiological age in *An. gambiae* s.s.

Age	Tracheoles	Granulations	<i>P</i> -value
Nulliparous	41 (33.34%)	37 (30.08%)	0.651
Parous	48 (39.02%)	77 (62.60%)	0.009
Unreadable	34 (27.64%)	9 (7.32%)	-
Total	123 (100.00%)	123 (100.00%)	-



**Figure 5.** Parous ovary (unwound tracheoles) according to Detinova (100 ×; CREC, 2013).



**Figure 6.** Parous ovary according to Hoc (40 ×; CREC, 2013).

### 3.3. Comparison of the reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations

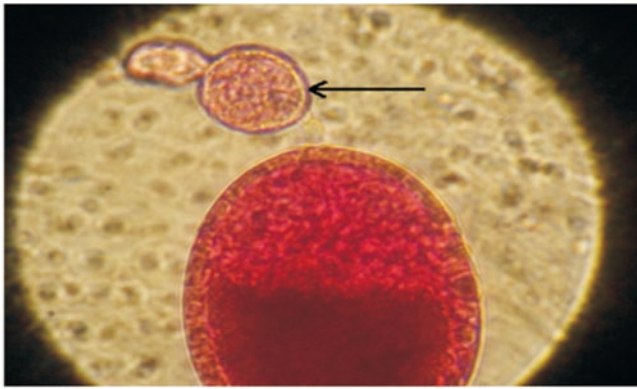
Among 112 *An. gambiae* s.s. examined, 17.86% ( $n = 20$ ) nulliparous females were identified based on the reading of ovarian tracheoles and 14.29% ( $n = 16$ ) were identified by the observation of follicular dilatations. No significant difference was observed between these rates ( $P = 0.505$ ). Also, 57.14% ( $n = 64$ ) of females were parous from ovarian tracheoles against 68.75% ( $n = 77$ ) with the follicular dilatations. No significant difference was observed between these two rates ( $P = 0.314$ ) (Table 2). The use of follicular

dilatations also appeared to be reliable for the determination of the physiological age in *An. gambiae* s.s.

**Table 2**

Reliability of follicular dilatations for the determination of the physiological age in *An. gambiae* s.s.

Age	Tracheoles	Dilatations	P-value
Nulliparous	20 (17.86%)	16 (14.29%)	0.505
Parous	64 (57.14%)	77 (68.75%)	0.314
Unreadable	28 (25.00%)	19 (16.96%)	-
Total	112 (100.00%)	112 (100.00%)	-



**Figure 7.** Parous ovariole (with a dilatation) according to Lewis (40 ×; CREC, 2013).

### 3.4. Influence of development stage of ovaries on ovarian tracheole reading, granulations in the basal body and follicular dilatation observation for the determination of anopheles physiological age

Among the 235 ovaries examined by Detinova method, 26.38% ( $n = 62$ ) were unreadable. The illegibility rate increased significantly with the development of ovaries from stage II ( $P < 0.001$ ) (Table 3). Concerning the method based on the observation of granulations in the basal body of ovarioles, only 7.32% ( $n = 9$ ) of ovaries were not read out of a total of 123 and the fail rate showed the same tendency following the stages of ovarian development ( $P > 0.05$ ) (Table 3). In the same way, regarding the use of follicular dilatations, the repartition of 16.96% ( $n = 19$ ) of failures recorded among the 112 mosquitoes examined was the same ( $P > 0.05$ ) following the ovarian development stages (Table 3). Nevertheless, the majority of failures (16/19) were observed between the stages I and II mean with the method of follicular dilatations (Table 3).

**Table 3**

Variation of indetermination rate of the physiological age following the ovarian development stages by three methods.

Stages	Tracheoles			Granulations			Dilatations		
	Total	N (fails)	%	Total	N (fails)	%	Total	N (fails)	%
	mstq		(fails)	mstq		(fails)	mstq		(fails)
I	40	0	0.00 <sup>b</sup>	28	1	3.57 <sup>a</sup>	12	7	58.33 <sup>a</sup>
IId	91	6	6.59 <sup>b</sup>	41	2	4.88 <sup>a</sup>	50	5	10.00 <sup>b</sup>
IIm	39	6	15.38 <sup>b</sup>	20	2	10.00 <sup>a</sup>	19	4	21.05 <sup>ab</sup>
IIf	33	22	66.67 <sup>a</sup>	19	2	10.53 <sup>a</sup>	14	0	0.00 <sup>b</sup>
III	23	19	82.61 <sup>a</sup>	12	2	16.67 <sup>a</sup>	11	2	18.18 <sup>ab</sup>
IV	9	9	100.00 <sup>a</sup>	3	0	0.00 <sup>a</sup>	6	1	16.67 <sup>ab</sup>
Total	235	62	26.38	123	9	7.32	112	19	16.96

Percentages which carry the same letters in exposant were not significantly different ( $P > 0.05$ ). d: Beginning; m: Mean; f: Aged; mstq: Mosquito. <sup>a,b</sup>: Standard letters used to differentiate the values that are statistically different.

## 4. Discussion

The follicular dilatations and the granulations of basal body of ovarioles are very useful for the determination of the physiological age in *An. gambiae* s.s. The method based on the use of follicular dilatations is reliable since Detinova method is usually used for the determination of the physiological age of mosquitoes. The same results have been observed with the method based on the observation of granulations in the basal body of ovarioles.

The reliability of granulations in the basal body of ovarioles for the determination of the physiological age of anopheles has been reported[5]. According to Darskaya *et al.*, the density of granulations could increase after successive egg-laying, facilitating the reading of ovaries[7]. According to Anagonou *et al.*, the observation of granulations in the basal body of ovarioles is possible beyond the stage II[6]. Yet, the three ovaries of stage IV dissected in our samples have been difficult to read. In stage IV of the ovaries' development, the eggs are almost formed and occupy all envelopes of ovarioles so that the basal body of ovarioles can not be observed directly. Despite this advantage, the method of granulations is expensive and requires good microscopy for its application. The observation of granulations is not possible when the installation of liquid is not well prepared (more concentrated or at least concentrated in neutral red) or late after preparation. These reasons explain the illegibility of 7.32% ( $n = 9$ ) of ovaries in our sample.

The reliability of follicular dilatations for the determination of the physiological age of anopheles confirms the results of Anagonou *et al.*[2,6]. The observation of follicular dilatations is possible beyond the stage II, but it is not in stage IV when the eggs are almost formed and occupy the entire ovariole[5,6]. The isolation of ovarioles to allow the observation of dilatations requires more manual dexterity in mosquitoes in stage I-II mean. At the beginning of ovarian development, the ovarioles are joined to each other at the point where their isolation requires more application. This explains the majority of indetermination of age ( $n = 16$ , 84.21%) recorded in stage I-II mean with a total of 19. Thus, in a sample where the number of mosquitoes with the beginning ovarian development is important, the isolation of ovarioles becomes constraining and consequently leads to an enormous loss of mosquitoes of which the physiological age is not determined. A combination of the observation of follicular dilatations with the method of Detinova based on the aspect of the ovarian tracheoles could be ideal for the determination of the physiological age of mosquitoes. In addition, the pedicle of ovarioles lengthens with the successive egg-laying in parous mosquitoes[6]. This phenomenon produces an extreme fragility of pedicle susceptible to break during isolation by using needles[5,6]. Nevertheless, the classical dilaceration of ovaries has allowed us to observe a follicular dilatation in parous females.

Detinova method allows examining 50 to 60 specimens each hour, and so does the observation methods of follicular dilatations and of granulations in the basal body of ovarioles. These two processes allow examining 60 to 80 mosquitoes per hour. Converse to the reading of ovarian tracheoles which was done after drying



the ovaries, the observation methods of dilatations and of the granulations present the advantages that they can be directly applied after extraction of ovaries. Inefficiency of Detinova method from stage II development of ovaries has been reported in several articles[2,17]. About 19.35% ( $n = 12$ ) of ovaries are unreadable in stage I-II, due to plateons compressed between the ovarioles when they arise profile. Indeed, from stage II age, the vitellus reserves become enormous and completely cover the tracheolar network making the ovaries illegible after drying[2]. This is not the case for mosquitoes at stage I- II whose reading of tracheoles is very easy.

In conclusion, the method based on the observation of follicular dilatations and of granulations in the basal body of ovarioles are applicable for the determination of the physiological age in *An. gambiae* s.s. Furthermore, the combination of the Detinova method and follicular dilatations would be very effective. Contrary to the usual method of Detinova based on the aspect of ovarian tracheoles that is not usable from the stage II, the observation of follicular dilatations and granulations in the basal body of the ovarioles is possible beyond stage II. The reading of tracheoles is the best method for determining the physiological age of anopheles from night captures. It is easy, fast, cheap and useful for a debutant technician. However, methods based on the follicular dilatations and granulations of basal body are indicated for mosquitoes captured in the houses. Both methods are relatively expensive and require technical expertise.

### Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Benin for supporting the doctoral training of Rodrigue Anagonou. This research was funded by Bill & Melinda GATES Foundation and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Benin.

### References

- [1] Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg* 2011; **85**(4): 586-93.
- [2] Anagonou R, Agossa F, Gnanguenon V, Azondékon R, Akinro B, Oké-Agbo F, et al. Development of new combined method based on reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations for determining the physiological age in *Anopheles gambiae* s.s. *J Cell Anim Biol* 2015; **9**(1): 9-15.
- [3] Aikpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, Oussou O, Oké-Agbo F, et al. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC Indoor Residual Spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasit Vectors* 2014; **7**: 256.
- [4] Nmatungiro AJ, Mayagaya VS, Rieben S, Moore SJ, Dowell FE, Maia MF. The influence of physiological status on age prediction of *Anopheles arabiensis* using near infra-red spectroscopy. *Parasit Vectors* 2013; **6**: 298.
- [5] Hoc TQ. Morpho-histological changes in the ovarioles and determination of physiological age in haematophagous insects of medical importance. *Zool Pol* 1995; **40**(1-4): 5-65.
- [6] Anagonou R, Agossa F, Azondékon R, Agbogon M, Oké-Agbo F, Gnanguenon V, et al. Application of Polovodova's method for the determination of physiological age and relationship between the level of parity and infectivity of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s, south-eastern Benin. *Parasit Vectors* 2015; **8**: 117.
- [7] Hoc TQ, Wilkes TJ. The ovarioles structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: culicidae) and its use in determining physiological age. *Bull Ent Res* 1995; **85**: 59-69.
- [8] Sovi A, Djègbè I, Soumanou L, Tokponnon F, Gnanguenon V, Azondékon R, et al. Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 103.
- [9] Ministry of Health: Directory of Health Statistics 2011. Cotonou: Department of Programming and Foresight; 2012.
- [10] Ministry of Health: Directory of Health Statistics 2012. Cotonou: Department of Programming and Foresight; 2013.
- [11] Sovi A, Govoétchan R, Tokponnon F, Houunkonnou H, Aikpon R, Agossa F, et al. Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasit Vectors* 2013; **6**: 352.
- [12] Ossè RA, Aikpon R, Gbedjissi GL, Gnanguenon V, Sèzonlin M, Govoétchan R, 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. *Parasit Vectors* 2013; **6**: 73.
- [13] Mala AO, Irungu LW, Mitaki EK, Shililu JI, Mbogo CM, Njagi JK, et al. Gonotrophic cycle duration, fecundity and mating behavior of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a dryland ecosystem in Baringo, Kenya. *Int J Mosq Res* 2014; **1**(2): 31-7.
- [14] Mala AO, Irungu LW, Mitaki EK, Shililu JI, Mbogo CM, Njagi JK, et al. Gonotrophic cycle duration, fecundity and parity of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes during an extended period of dry weather in a semi arid area in Baringo County, Kenya. *Int J Mosq Res* 2014; **1**(2): 28-34.
- [15] The R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: The R Core Team; 2013. [Online] Available from: [http://web.mit.edu/r\\_v3.0.1/fullrefman.pdf](http://web.mit.edu/r_v3.0.1/fullrefman.pdf) [Accessed on 10th April, 2015]
- [16] Sovi A, Azondékon R, Aikpon RY, Govoétchan R, Tokponnon F, Agossa F, et al. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasit Vectors* 2013; **6**(1): 319.
- [17] Hugo LE, Quick-Miles S, Kay BH, Ryan PA. Evaluations of mosquito age grading techniques based on morphological changes. *J Med Entomol* 2008; **45**(3): 353-69.



## International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906  
CODEN: IJMRK2  
IJMR 2015; 2 (2): 75-79  
© 2015 IJMR  
Received: 20-06-2015  
Accepted: 19-07-2015

### Rodrigue Anagonou

a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CREC), 06  
BP 2604 Cotonou, Benin  
b) Faculty of Sciences and  
Techniques, University of Abomey  
Calavi, Calavi, Benin

### Fiacre Agossa

a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CREC), 06  
BP 2604 Cotonou, Benin  
b) Faculty of Sciences and  
Techniques, University of Abomey  
Calavi, Calavi, Benin

### Virgile Gnanguenon

a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CREC), 06  
BP 2604 Cotonou, Benin  
b) Faculty of Sciences and  
Techniques, University of Abomey  
Calavi, Calavi, Benin

### Gil Germain Padonou

a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CREC), 06  
BP 2604 Cotonou, Benin  
b) Faculty of Sciences and  
Techniques, University of Abomey  
Calavi, Calavi, Benin

### Bruno Akinro

Center of Entomological Research  
of Cotonou (CREC), 06 BP 2604  
Cotonou, Benin

### Martin Akogbéto

a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CREC), 06  
BP 2604 Cotonou, Benin  
b) Faculty of Sciences and  
Techniques, University of Abomey  
Calavi, Calavi, Benin

### Correspondence:

#### Rodrigue Anagonou

a) Center of Entomological  
Research of Cotonou (CREC), 06  
BP 2604 Cotonou, Benin  
b) Faculty of Sciences and  
Techniques, University of Abomey  
Calavi, Calavi, Benin

## Using ovarian development stages in the determination of the physiological age in the females of *Anopheles gambiae s.l.*, south-eastern Benin

Rodrigue Anagonou, Fiacre Agossa, Virgile Gnanguenon, Gil Germain  
Padonou, Bruno Akinro, Martin Akogbéto

### Abstract

**Background:** The physiological age of vectors is an indicator often used in the evaluation of the efficacy of malaria vector means. The purpose is to study the ovarian development stage for the determination of the physiological age of mosquitoes.

**Methods:** Mosquitoes were collected using human landing catch at night in the district of Itassoumba and Abomey-takplikpo, south-eastern Benin. Females *An. gambiae s.l.* were identified morphologically using the determination keys. The ovaries were dissected in distilled water. Additionally, one ovary is cut and transferred into Natrichlorid physiological liquid for the reading of ovarian development stage. Mosquitoes, which are between the stages I and II-young are nulliparous and those which are between II-mean and III are parous. After drying, the tracheoles of ovary left in distilled water were examined with the usual Detinova method.

**Results:** Among 271 *An. gambiae s.l.* examined at Itassoumba, 72 were nulliparous with the reading of ovarian tracheoles against 66 with the reading of the ovarian development stages ( $P=0.61$ ). With the 199 remaining identified mosquitoes as parous with the examination of tracheoles, the reading of the ovarian development stages has recognized 173 as parous ( $P=0.18$ ). At Abomey-takplikpo, on 197 specimens examined, 52 and 49 were nulliparous respectively with the reading of tracheoles and the examination of the ovarian development stages ( $P=0.71$ ). Among the 145 remaining mosquitoes identified as parous with the tracheoles method, 119 were parous with the examination of the ovarian development stages ( $P=0.12$ ).

**Conclusion:** The development stages of ovaries are usable for the determination of the physiological age of mosquitoes. Nulliparous mosquitoes are between the stages I and II-young. However, parous are between the stages II-mean and III.

**Keywords:** *Anopheles gambiae s.l.*, ovaries, physiological age, stage, tracheoles

### 1. Introduction

In sub-saharan Africa, *Anopheles gambiae s.l.* is the major malaria vector <sup>[1]</sup>. In 2013, the number of malaria cases was estimated at 198 million in the world with 82% in Africa region and causing 584000 deaths <sup>[2]</sup>. In the same period, the number of deaths due to malaria was estimated at 2288 in Benin <sup>[2, 3]</sup>. Vector control is the main strategy for malaria prevention. The aim of vector control is to reduce the number of infectious vectors. Vectors longevity is one of the most used indicators for assessing the effectiveness of vector control programs <sup>[4]</sup>. Usually, longevity is expressed by the parturity rate of the vectors. Besides, blood meal ensures the maturation of ovaries which follows several stages described by Christophers <sup>[5]</sup>. Others authors <sup>[6-9]</sup> have shown that after egg-laying, the parous females are often beyond stage II-young of the ovarian development contrary to nulliparous females. We can think that it exists a link between the development stage of ovaries and the parturity of mosquitoes. Scientifically, we miss reliable data on this biological aspect of mosquitoes. The purpose of this study is to establish the correlation between the parturity and the ovarian development stage of vectors.

### 2. Methods

#### 2.1. Study area

This study was carried out at Adjarra and Ifangni districts in Benin (Figure 1).



### 2.1.1. Adjarra

In Adjarra district, mosquitoes sampling was carried out in the village of Abomey-takplikpo (Figure 1). Adjarra district is located at 06°27'00" N and 01°56'00" E, in the department of Oueme with a population of 60,112 inhabitants and an area of 112 km<sup>2</sup> [10]. It is bordered in the north by Avrankou district, in the south by Seme-Podji district, in the west by Porto-Novo district and in the east by Nigeria. The climate is sub-equatorial with two dry seasons and two rainy seasons. The average rainfall is 1200 mm per year. The hydrographic network of this district includes the lagoon of Porto-Novo in the south and Aguidi River in the northeast. The vegetation is sparse; it is composed of shrubs, grass and by sacred forests relics.

### 2.1.2. Ifangni

Entomological surveys were conducted at Itassoumba (Figure 1) in the district of Ifangni (Province of Plateau) located at 06°38'56"N and 02°43'14"E with a population of 71,606 inhabitants and an area of 242 km<sup>2</sup> [10]. The climate is Guinean with two dry seasons and two rainy seasons. The annual precipitation is between 800 mm and 1400 mm. The vegetation includes sacred forest relics, plantations of oil palms, shrubs and tall grass. Itassoumba is crossed by swamps. In the dry season, the breeding sites of *An. gambiae* s.l. are scarce. However, breeding sites are particularly permanent in Itassoumba due to the presence of fish ponds and vegetable farming. Once animal feed reserved for small fry and fish are present on the surface of the water, they constitute a source of food favoring the proliferation of malaria vectors.

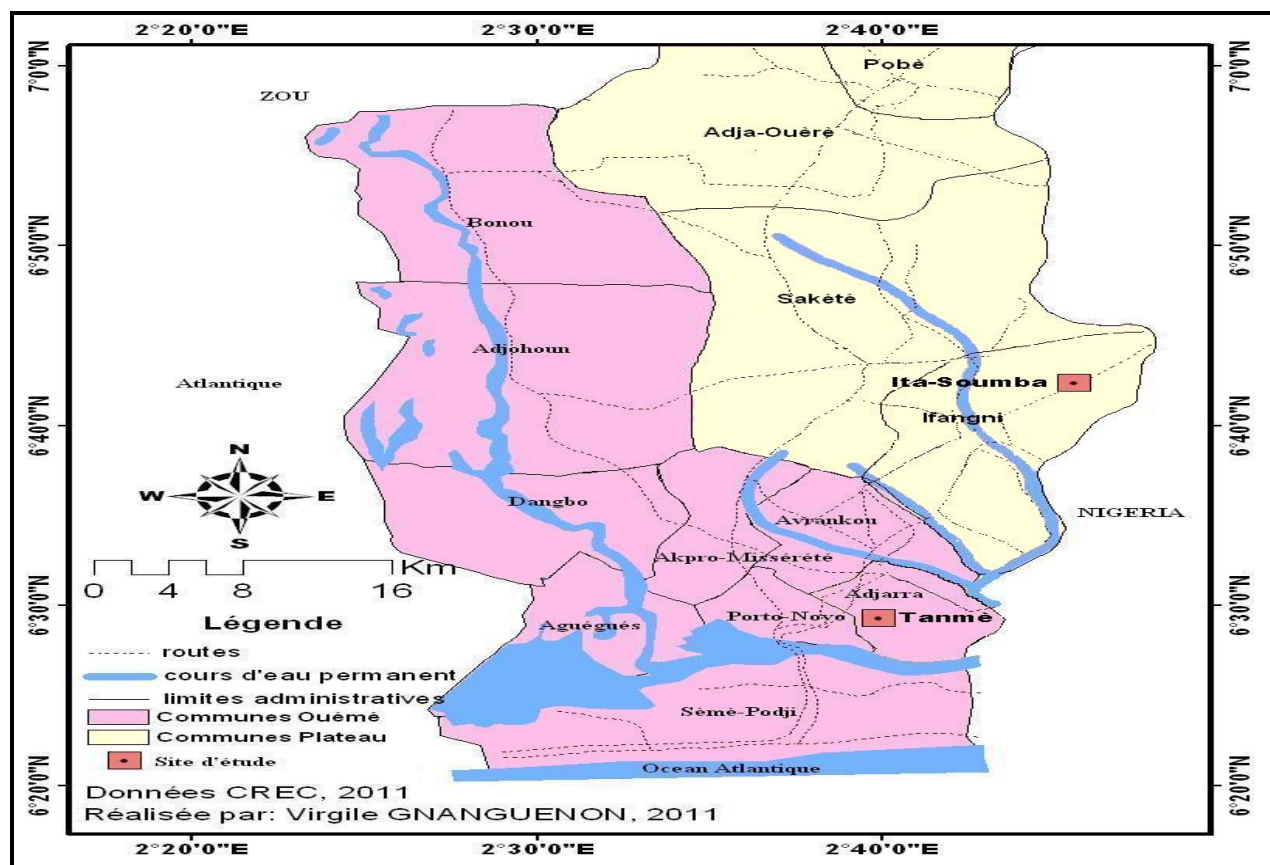


Fig 1: The villages of Itassoumba (district of Ifangni) and Abomey-takplikpo (district of Adjarra) in south-eastern Benin

### 2.2. Sampling of mosquitoes and identification of females *An. gambiae* s.l.

Mosquitoes were caught on man from 9:00 p.m. to 5:00 am. Collections were carried out inside and outside houses using hemolytic tubes and torch. After each collection, *An. gambiae* s.l. females were identified morphologically [11, 12].

### 2.3. Dissection of ovaries and determination of ovarian development stages and physiological age of females of *An. gambiae* s.l.

The ovaries of mosquitoes were dissected in distilled water using binocular microscope. One ovary of each mosquito is put on lamella in distilled water and the second on other lamella in physiological liquid (Natrachlorid 0.9% + Neutral

red 1/5000-1/3000). After drying of ovary transferred in distilled and ovarian tracheoles were examined with a microscope (10X-40X) using Detinova method [4]. The tracheoles are wound (platoons) in nulliparous mosquitoes but are unwound in parous females. Moreover, the ovarian development stage was determined with ovaries transferred in physiological liquid. Mosquitoes found between the stages I and II-young are considered as nulliparous females. However, those found between the stages II-mean and III are parous females.

### 2.4. Statistical analysis

The comparison of nulliparous females' numbers and parous obtained with the reading of ovarian tracheoles and the

observation of the ovarian development stage have been performed using khi 2 test. The analyses were performed with software R-2.15.2 <sup>[13]</sup>.

## 2.5. Ethical consideration

Ethical approval for this study was received from the Ministry of Health [N°007/2010]. Mosquito collectors gave prior informed consent and they were vaccinated against yellow fever. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive malaria treatments.

## 3. Results

### 3.1. Structure of ovaries showing physiological age in *An. gambiae s.l.*

Figures 2 and 3 showed respectively after microscopic observations, the curled aspect of ovarian tracheoles in nulliparous females and the unwound aspect of tracheoles in parous.



**Fig 2:** Nulliparous ovary (tracheoles coiled) according to Detinova (CREC, 2013)



**Fig 3:** Parous ovary (tracheoles unwound) according to Detinova (CREC, 2013)

### 3.2. Ovarian development stages in *An. gambiae s.l.*

During dissection sections of *Anopheles* collected from Itassoumba and Abomey-takpliko, the ovarian follicles have been observed at different development stages in mosquitoes. The ovarian development stages in mosquitoes. The development stages are present as follow:

Stage I: Follicle is rounded, it is no vitellus grain. The oocyte nucleus do not differentiate from the one of nourishing

cellular's (Figure 4).

Stage II: It has been subdivided in three.

Stage II-young: Small vitellus granules appear around the oocyte nucleus (Figure 5).

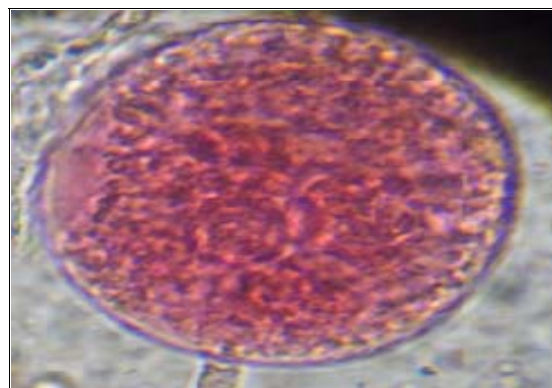
Stage II-mean: The vitellus granules are visible with the objective (Figure 6).

Stage II-end: The vitellus occupies the half of follicle (Figure 7).

Stage III: The follicle is very oval and the vitellus occupies more than the half of follicle (Figure 8).

Stage IV: The follicle is lengthened and completely filled of vitellus (Figure 9).

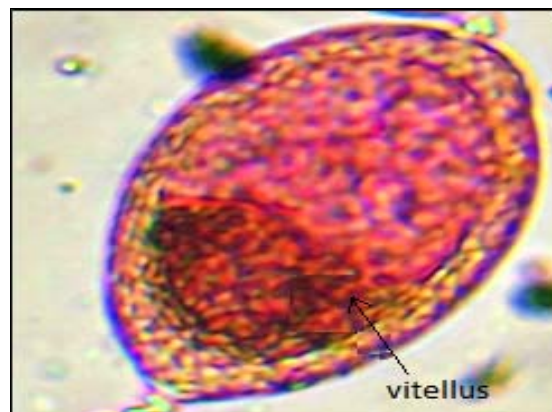
Stage V: The egg is completely constituted with the floats (Figure 10).



**Fig 4:** Follicle at stage I (40X) (CREC, 2013)



**Fig 5:** Follicle at stage II-young (40X) (CREC, 2013)



**Fig 6:** Follicle at stage II-mean (10X) (CREC, 2013)

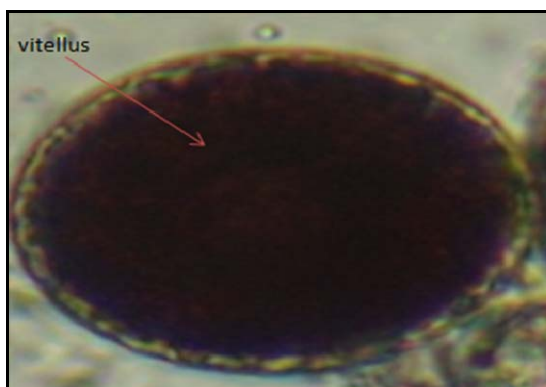




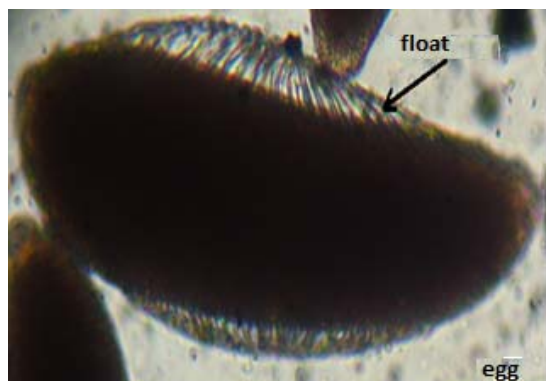
**Fig 7:** Follicle at stage II-end (10X) (CREC, 2013)



**Fig 8:** Follicle at stage III (10X) (CREC, 2013)



**Fig 9:** Follicle at stage IV (10X) (CREC, 2013)



**Fig 10:** Follicle at stage V (10X) (CREC, 2013)

### 3.3. Relationship between the parturity and the development stages of ovaries in *An. gambiae s.l.*

At Itassoumba, among 271 females of *An. gambiae s.l.* examined by the reading of the ovarian tracheoles, 72 and 199 mosquitoes were respectively identified as nulliparous and parous females. Among the 72 nulliparous mosquitoes, 66 were found between the stages I and II-young. No significant difference has been observed between these two rates ( $p=0.61$ ) (Table 1). Concerning the 199 parous mosquitoes, 173 are between the stages II-mean and III. No significant difference has also been observed between these two rates ( $p=0.18$ ) (Table 1).

Besides, among the 197 mosquitoes examined by the reading of the ovarian tracheoles from Abomey-takplikpo, 52 have been identified as nulliparous against 145 parous. Among the 52 nulliparous females, 49 are found between the stages I and II-young. No significant difference has been observed between these two rates ( $p=0.77$ ) (Table 1). The same tendency has been observed with the 145 parous females of which 119 were found between the stages II-mean and III ( $p=0.12$ ) (Table 1).

As results, in Itassoumba and Abomey-takplikpo, the development stage of ovaries explains the parturity of mosquitoes. The nulliparous mosquitoes are between the stages I and II-young. However, the parous are between the stages II-mean and III.

**Table 1:** Comparison between the reading of ovarian tracheoles and the observation of the ovarian development stages in the determination of the physiological age in *An. gambiae s.l.*

	Age	Meth trach	Meth stage	p-value
Site 1	Nulliparous	72	66	0.61
	Parous	199	173	0.18
Site 2	Nulliparous	52	49	0.77
	Parous	145	119	0.12

Site 1: Itassoumba, site 2: Abomey-takplikpo, Meth: method, trach: tracheoles

### 4. Discussion

As we microscopically observed, the maturation of ovaries follows several steps. The similar observations were reported by several authors [4, 7, 8, 14]. Globally, the most of nulliparous females (more than 80%) are found at stage I of Christophers with a rounded follicle and the absence of vitellus grains [15]. However, according to the results obtained from study sites, 20 (16.12%) nulliparous specimens show the ovarian follicles of stage II-young and II-end. The slight ovarian development observed here could be linked to two reasons. First, these mosquitoes can be pre-gravid females. On the other hand, during human landing catch, some females succeed to take some blood meal before be caught. Thus, during the time between mosquito catch and dissection, the digestion of this blood meal has allowed to advance the development of ovarioles in these mosquitoes. Actually, human landing catch at night is uneasy to monitor. Spite of the precautions, some mosquito collectors under the tire effect, have been bitten by mosquitoes before capturing them.

Concerning the parous females obtained in both districts, it meets very few of specimens ( $n=16$ , 4.65%) presenting the ovaries at stage I of Christophers. The high frequencies of parous females are found at the stages II-mean and III. Likely, the residual of first blood meals have released a slight development of ovaries which has translated by the evolution

of some ovarioles from stage I to stages II and III. Even if we do not neglect the blood meal took by some females before catching them, the residual effect of the previous blood meals is a determinant factor. From these observations, it brings out that in nulliparous and parous female, it exists two level of ovarian development. In parous females, the gonotrophic cycle is fast because it starts from more advanced stage (II-mean, III), while in nulliparous, it starts from the stage I, which justifies in pre-gravid females, the need to additional blood meal to complete the cycle. These results confirm the duration of gonotrophic cycle which is about 4 to 5 days in nulliparous mosquitoes and 2.5 days in parous [7, 15].

Conversely to our expectation, some gravid females at stage IV and V were caught on human seeking for blood meal. This phenomenon correspond likely to a reaction of defence against the loss of water by evaporation. The studies conducted by Hamon [16] have shown that this phenomenon is frequent in *An. superpictus* et *Phlebotomes sp* during a year hot and dry period in central Asia.

## 5. Conclusion

After egg-laying, the parous *An. gambiae s.l.* are between the stages II-mean and III of ovarian development. However, the nulliparous are in stages I and II-young. Thus, the ovarian development stages can be used in the determination of the physiological age of *An. gambiae s.l.*, malaria vector.

## 6. Conflict of interests

The authors have not declared any conflict of interests

## 7. Authors' contributions

Rodrigue Anagonou and Martin Akogbéto conceived the study. Rodrigue Anagonou, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto have participated in the design of the study. Rodrigue Anagonou, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto carried out the field activities and the laboratory analyses. Virgile Gnanguenon has contributed to the mapping. Bruno Akinro did statistical analyzes. Rodrigue Anagonou, Fiacre Agossa, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto drafted the manuscript. Rodrigue Anagonou, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

## 8. Acknowledgements

We are grateful to the Bill & Melinda GATES Foundation which supported financially this study. Rodrigue Anagonou obtained financial support for his doctoral study from Ministry of the Higher Education and of Scientific Research. The authors would also like to thank the populations of Adjarra and Ifangni for their collaboration.

## 9. References

1. WHO. World malaria report 2010. World Health Organization, 2011.
2. WHO. World malaria report 2013. World Health Organization, 2014.
3. Ministère de la Santé: Annuaire des statistiques sanitaires 2013. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective, 2014.
4. Anagonou R, Agossa F, Gnanguenon V, Azondékon R, Akinro B, Oké-Agbo F *et al.* Development of new

- combined method based on reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations for determining the physiological age in *Anopheles gambiae s.s.* J Cell Anim Biol 2015; 9(1):9-15.
5. Mondet B. Application de la méthode de Polovodova à la détermination de l'âge physiologique des *Aedes* (Diptera: culicidae) vecteurs de la fièvre jaune. Ann Soc Entomol 1993; 29(1):61-76.
6. Pajot FX. Contribution à l'étude écologique d'*Aedes* (*Stegomyia*) *simpsoni* (Theobald, 1905) (Diptera, Culicidae). Observations concernant les stades préimaginaux. Cahiers ORSTOM Sér Entomol Med Parasit 1976; 14:31-48.
7. Carnevale P, Bosseno MF, Molinier, Lancien J, Le Pont F, Zoulani A. Etude du cycle gonotrophique d'*Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) (Giles, 1902) en zone de forêt dégradée d'Afrique Centrale. Cahiers ORSTOM Sér Ent Méd Parasitol 1979; 17:55-75.
8. Molez JF, Desenfant P, Jacques JR. Bio-écologie en Haïti d'*Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 (Diptera: Culicidae). Bull Soc Pathol Exot 1998; 91(4):334-9.
9. Anagonou R, Agossa F, Azondékon R, Agbogbo M, Oké Agbo F, Gnanguenon V *et al.* Application of Polovodova's method for the determination of physiological age and relationship between the level of parity and infectivity of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae s.s.*, South Eastern Benin. Parasit Vectors 2015; 8:117.
10. Institut National de la Statistique Appliquée et de l'Economie: Recensement général de la population du Bénin Cotonou, Benin, 2002.
11. Gillies MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afro-tropical Region). Sth Afr Inst Med Res 1987; 55:143.
12. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Sth Afr Inst Med Res 1968; 54:343.
13. Development Core Team: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2011. URL <http://www.R-project.org>.
14. Christophers SR. The development of the egg follicle in anophelines. Paludism 1991; 2:73-88.
15. Brengues J, Coz J. Quelques aspects fondamentaux de la biologie de *Anopheles gambiae* et de *An. funestus* en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. Cahiers ORSTOM Ser Ent Med et Parasitol 1973; 11(2):107-126.
16. Hamon J. Etude de l'âge physiologique des femelles d'anophèles dans les zones traitées au DDT, et non traitées, de la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. Bull Org Mond Santé 1963; 28:83-109.

of some ovarioles from stage I to stages II and III. Even if we do not neglect the blood meal took by some females before catching them, the residual effect of the previous blood meals is a determinant factor. From these observations, it brings out that in nulliparous and parous female, it exists two level of ovarian development. In parous females, the gonotrophic cycle is fast because it starts from more advanced stage (II-mean, III), while in nulliparous, it starts from the stage I, which justifies in pre-gravid females, the need to additional blood meal to complete the cycle. These results confirm the duration of gonotrophic cycle which is about 4 to 5 days in nulliparous mosquitoes and 2.5 days in parous<sup>[7, 15]</sup>.

Conversely to our expectation, some gravid females at stage IV and V were caught on human seeking for blood meal. This phenomenon corresponds likely to a reaction of defence against the loss of water by evaporation. The studies conducted by Hamon<sup>[16]</sup> have shown that this phenomenon is frequent in *An. superpictus* et *Phlebotomes sp* during a year hot and dry period in central Asia.

## 5. Conclusion

After egg-laying, the parous *An. gambiae s.l.* are between the stages II-mean and III of ovarian development. However, the nulliparous are in stages I and II-young. Thus, the ovarian development stages can be used in the determination of the physiological age of *An. gambiae s.l.*, malaria vector.

## 6. Conflict of interests

The authors have not declared any conflict of interests

## 7. Authors' contributions

Rodrigue Anagonou and Martin Akogbéto conceived the study. Rodrigue Anagonou, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto have participated in the design of the study. Rodrigue Anagonou, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto carried out the field activities and the laboratory analyses. Virgile Gnanguenon has contributed to the mapping. Bruno Akinro did statistical analyzes. Rodrigue Anagonou, Fiacre Agossa, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto drafted the manuscript. Rodrigue Anagonou, Gil Germain Padonou and Martin Akogbéto critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

## 8. Acknowledgements

We are grateful to the Bill & Melinda GATES Foundation which supported financially this study. Rodrigue Anagonou obtained financial support for his doctoral study from Ministry of the Higher Education and of Scientific Research. The authors would also like to thank the populations of Adjara and Ifangni for their collaboration.

## 9. References

1. WHO. World malaria report 2010. World Health Organization, 2011.
2. WHO. World malaria report 2013. World Health Organization, 2014.
3. Ministère de la Santé: Annuaire des statistiques sanitaires 2013. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective, 2014.
4. Anagonou R, Agossa F, Gnanguenon V, Azondékon R, Akinro B, Oké-Agbo F *et al.* Development of new

combined method based on reading of ovarian tracheoles and the observation of follicular dilatations for determining the physiological age in *Anopheles gambiae s.s.* J Cell Anim Biol 2015, 9(1):9-15.

5. Mondet B. Application de la méthode de Polovodova à la détermination de l'âge physiologique des *Aedes* (Diptera: culicidae) vecteurs de la fièvre jaune. Ann Soc Entomol 1993; 29(1):61-76.
6. Pajot FX. Contribution à l'étude écologique d'*Aedes* (*Stegomyia*) *simpsoni* (Theobald, 1905) (Diptera, Culicidae). Observations concernant les stades préimaginaux. Cahiers ORSTOM Sér Entomol Med Parasit 1976; 14:31-48.
7. Carnevale P, Bosseno MF, Molinier, Lancien J, Le Pont F, Zoulani A. Etude du cycle gonotrophique d'*Anopheles gambiae* (Diptera, Culicidae) (Giles, 1902) en zone de forêt dégradée d'Afrique Centrale. Cahiers ORSTOM Sér Ent Méd Parasitol 1979; 17:55-75.
8. Molez JF, Desenfant P, Jacques JR. Bio-écologie en Haïti d'*Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 (Diptera: Culicidae). Bull Soc Pathol Exot 1998; 91(4):334-9.
9. Anagonou R, Agossa F, Azondékon R, Agbogan M, Oké Agbo F, Gnanguenon V *et al.* Application of Polovodova's method for the determination of physiological age and relationship between the level of parity and infectivity of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae s.s.*, South Eastern Benin. Parasit Vectors 2015; 8:117.
10. Institut National de la Statistique Appliquée et de l'Economie: Recensement général de la population du Bénin Cotonou, Benin, 2002.
11. Gillies MT, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afro-tropical Region). Sth Afr Inst Med Res 1987; 55:143.
12. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Sth Afr Inst Med Res 1968; 54:343.
13. Development Core Team: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2011. URL <http://www.R-project.org>.
14. Christophers SR. The development of the egg follicle in anophelines. Paludism 1991; 2:73-88.
15. Brengues J, Coz J. Quelques aspects fondamentaux de la biologie de *Anopheles gambiae* et de *An. funestus* en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. Cahiers ORSTOM Ser Ent Med et Parasitol 1973; 11(2):107-126.
16. Hamon J. Etude de l'âge physiologique des femelles d'anophèles dans les zones traitées au DDT, et non traitées, de la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. Bull Org Mond Santé 1963; 28:83-109.

## Full Length Research Paper

# Dynamics of insecticide resistance and exploring biochemical mechanisms involved in pyrethroids and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) cross-resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Benin, West Africa

Nazaire Aïzoun<sup>1,2\*</sup>, Roseric Azondekon<sup>1,3</sup>, Rock Aïkpon<sup>1,2</sup>, Rodrigue Anagonou<sup>1,2</sup>,  
Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604, Cotonou, Bénin.

<sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin.

<sup>3</sup>University of Massachusetts Amherst, Amherst, Massachusetts, USA.

Received 21 January, 2014; Accepted 7 February, 2014

As a result of the free-insecticide treated net distribution by National Malaria Control Programme (NMCP) in July 2011 throughout the entire country, it is useful to investigate the dynamics of insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from Benin and the metabolic resistance mechanisms involved in this evolution of resistance. Larvae and pupae of *A. gambiae* s.l. mosquitoes were collected from the breeding sites in Littoral, Ouémé and Zou departments. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), bioassays were performed with permethrin (21.5 µg per bottle) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (100 µg per bottle) whereas World Health Organization (WHO) susceptibility tests were performed with lambda-cyhalothrin (0.05%). CDC biochemical assays using synergists piperonyl butoxide (PBO) and ethacrynic acid (ETAA) were also carried out. *A. gambiae* Akron, Suru-léré and Bamè populations were resistant to permethrin and DDT in 2008 and 2013. *A. gambiae* Akron and Suru-léré were resistant to lambda-cyhalothrin in 2013. *A. gambiae* Akron were susceptible to this product in 2008 whereas lambda-cyhalothrin resistance status in *A. gambiae* Suru-léré populations in 2008 required further investigation. Mono-oxygenases were involved in resistance of *A. gambiae* Suru-léré to pyrethroids whereas glutathione S-transferases (GSTs) may play a role in *A. gambiae* Akron and Suru-léré resistant to DDT. This study shows that metabolic resistance conferred by detoxifying enzymes is an indication of phenotypic resistance to both DDT and pyrethroids in Southern Benin.

**Key words:** Dynamics, piperonyl butoxide, ethacrynic acid, insecticide, vectors, resistance.

## INTRODUCTION

Malaria is a major health problem in Benin where it is the main cause of morbidity and mortality particularly among children under five and pregnant women (Djouaka et al., 2011). In this country and across Africa, malaria control

relies heavily on vector control through the use of insecticide-treated nets (ITN) and indoor residual spraying (IRS) (Djouaka et al., 2011).

The evolution of insecticide-resistant mosquito strains

## Full Length Research Paper

# Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae sensu lato* from the Sudano Guinean area in the central part of Benin, West Africa

Nazaire Aïzoun<sup>1,2\*</sup>, Virgile Gnanguenon<sup>1,2</sup>, Roseric Azondekon<sup>1,3</sup>, Rodrigue Anagonou<sup>1,2</sup>, Rock Aïkpon<sup>1,2</sup> and Martin Akogbéto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604, Cotonou, Bénin.

<sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Calavi, Bénin.

<sup>3</sup>University of Massachusetts Amherst, Amherst, Massachusetts, USA.

Received 23 December, 2013; Accepted 11 March, 2014

*Anopheles gambiae*, which is the main malaria vector in Benin has developed high level of resistance to pyrethroid insecticides. This raises serious concerns to the future use of long- lasting insecticidal nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS). It is therefore important to seek better and effective resistance management strategies which will use organophosphates or carbamates as alternatives against pyrethroid resistant malaria vectors in the field. Larvae and pupae of *A. gambiae s.l.* mosquitoes were collected from the breeding sites in Dassa-Zoume and Zogbodomey districts. WHO susceptibility tests were conducted on unfed female mosquitoes aged 2-5 days old. WHO bioassays were performed with impregnated papers with fenitrothion 1%, pirimiphos-methyl 0.25%, and bendiocarb 0.1%. Polymerase chain reaction (PCR) techniques were used to detect species and *Ace-1* mutations. *A. gambiae* Dassa-Zoume populations were susceptible to bendiocarb 0.1% with mortality rate of 99%. *A. gambiae* Zogbodomey populations were susceptible to pirimiphos-methyl 0.25% and fenitrothion 1% with mortality rates of 98.96 and 99%, respectively. PCR assay revealed that 100% of mosquitoes tested were *A. gambiae s.s.* The frequencies of *Ace-1R* mutation in *A. gambiae* Dassa-Zoume and Zogbodomey were 0%. Carbamates (bendiocarb) and organophosphates (fenitrothion and pirimiphos-methyl) have maintained their efficiency against *A. gambiae* Dassa-Zoume and Zogbodomey populations. Carbamates (bendiocarb) and organophosphates (fenitrothion and pirimiphos-methyl) have proven to be powerful alternatives against pyrethroid resistant malaria vectors such as *A. gambiae* Dassa-Zoume and Zogbodomey populations. The use of any of these three compounds in the centre Benin would be successful in malaria vector control.

**Key words:** *Anopheles gambiae*, *Ace-1*, resistance, fenitrothion, pirimiphos-methyl, bendiocarb, Benin.

## INTRODUCTION

In Africa, vector control is very dependent on a single class of insecticides, the pyrethroids. The dramatic increase in reports of pyrethroid resistance in malaria vectors (Santolamazza et al., 2008; Coleman et al., 2006) over the past decade is therefore a great cause for

concern. Pyrethroid-impregnated nets are now widely used to reduce malaria morbidity and mortality in tropical countries. Unfortunately, in West Africa, resistance to pyrethroids is widespread in *Anopheles gambiae s.s.* populations (Chandre et al., 1999), the major malaria





ISSN: 0975-833X

## RESEARCH ARTICLE

### ABUNDANCE AND DIVERSITY OF CULICIDAE FAUNA AT COTONOU IN SOUTHERN BENIN

<sup>1</sup>Agbanrin, R., <sup>1,3</sup>Padonou, G., <sup>1,2\*</sup>Yadouléton, A., <sup>1</sup>Attolou, R., <sup>1</sup>Badirou, K., <sup>1</sup>Gvoeethan, R.,  
<sup>1</sup>Gnangenon, V., <sup>1</sup>Sovi, A., <sup>1</sup>Anagonou, R. and <sup>1,3</sup>Akoghéto, M.

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou,  
République du Bénin

<sup>2</sup>Ecole Normale Supérieure de Natitingou-Université de Parakou

<sup>3</sup>Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques

#### ARTICLE INFO

##### Article History:

Received 20<sup>th</sup> December, 2014

Received in revised form

09<sup>th</sup> January, 2015

Accepted 05<sup>th</sup> February, 2015

Published online 31<sup>st</sup> March, 2015

##### Key words:

Abundance,  
Diversity,  
Culicidae,  
Mosquito,  
Cotonou,  
Benin.

#### ABSTRACT

**Background:** To evaluate the risk of transmission of vector-borne diseases transmitted by mosquitoes, regular updates of the geographic distribution of these vectors are required. Therefore, a study based on the abundance, richness and diversity of mosquitoes was conducted between December, 2013 and November 2014 at Cotonou, the economic capital of Benin republic.

**Method:** A cross seasonal entomological study on larvae and adults of mosquitoes was carried in fourteen (14) locations randomly at Cotonou Peri-Urban (PU) and urban areas (UA). The study was based on sampling mosquito immature stages (larvae/pupae) from domestic, peri-domestic and natural water sources and reared to adults. Additional adults mosquito were collected by Human Landing Catches (HLC), Indoor Pyrethrum Spray Catches (PSC), Biogents (BG) sentinel traps and Windows traps (WT) in PU and UA in order to assess the richness of mosquito fauna in this city.

**Results:** Adult's mosquitoes from larvae collected in our study sites showed thirteen species of mosquitoes (including 3 *Anopheles* species, 5 *Culex* species, 4 *Aedes* species and 1 *Uranotaenia* species) belonging to 4 genera. However, when the adults came directly from HLC and the different traps cited above, 15 species of mosquitoes including 3 *Anopheles* species, 5 *Culex* species, 2 *Mansonia* species, 4 *Aedes* species and 1 *Uranotaenia* species belonging to 5 genera (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Uranotaenia* and *Mansonia*). The abundance of the mosquito genera recorded at PU and UA varied significantly ( $p < 0.05$ ), with the *Culex* genera recording the highest abundance.

Moreover, the mosquito species recorded at PU regardless the collection methods was higher significant than those obtained at UA ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The presence of *Culex*, *Aedes*, and *Anopheles* species highlighted by this study in the city of Cotonou is posing a serious epidemiological concern to the inhabitants of this city. Therefore, larviciding of breeding sites before the onset of the rainy season and public enlightenment on the **environmental factors** and/or human activities that encourage mosquito breeding are recommended.

Copyright © 2015 Agbanrin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## INTRODUCTION

### Background

Mosquitoes (*Diptera*, *Culicidae*) are considered one of the most relevant group of arthropods in the public health field (Schaffner et al., 2001 and Becker et al., 2010) and, like other organisms, show a direct relation to different factors such as environmental and habitat heterogeneity or host preferences (Zhong et al., 2003). Belonging to *Culicidae* family, mosquitoes are nuisance species as well as potential transmitters of zoonotic and human diseases such as dengue fever, yellow fever and malaria of which 1.4 million deaths are

recorded yearly (ampbell-Lendrum et al., 2005) with 17% of all infectious diseases worldwide (Townson et al., 2005). According to the most recent classification of mosquitoes, the family *Culicidae* (*Diptera*) includes two subfamilies, 11 tribes, 111 genera, and 3,523 species where 150 species of the genera **Anopheles**, **Aedes** and **Culex**, are the indirect cause of morbidity and mortality among humans, more than any other group of organisms (Harbach, 2007) in the world. In context of climate change, environmental changes due to human activities greatly influence the distribution and survival of many mosquito species (Dossou-Yovo et al., 1995; Adeleke et al., 2008; Amusan et al., 2005). Moreover, in many African countries as Benin, deteriorating infrastructure, poor access to health, water and sanitation services, increasing population density, and widespread poverty contribute to conditions that modify the environment in peri urban areas, which directly

\*Corresponding author: A. Yadouléton,  
Ecole Normale Supérieure de Natitingou-Université de Parakou



RESEARCH

Open Access

# Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved

Virgile Gnanguenon<sup>1,2\*</sup>, Fiacre R Agossa<sup>1,2</sup>, Kefilath Badirou<sup>1,2</sup>, Renaud Govoetchan<sup>1,2</sup>, Rodrigue Anagonou<sup>1,2</sup>, Frédéric Oke-Agbo<sup>1</sup>, Roseric Azondekon<sup>1</sup>, Ramziath AgbanrinYoussof<sup>1,2</sup>, Roseline Attolou<sup>1,2</sup>, Filemon T Tokponnon<sup>4</sup>, Rock Aïkpon<sup>1,2</sup>, Razaki Ossè<sup>1,3</sup> and Martin C Akogbeto<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** Insecticides are widely used to control malaria vectors and have significantly contributed to the reduction of malaria-caused mortality. In addition, the same classes of insecticides were widely introduced and used in agriculture in Benin since 1980s. These factors probably contributed to the selection of insecticide resistance in malaria vector populations reported in several localities in Benin. This insecticide resistance represents a threat to vector control tool and should be monitored. The present study reveals observed insecticide resistance trends in Benin to help for a better management of insecticide resistance.

**Methods:** Mosquito larvae were collected in eight sites and reared in laboratory. Bioassays were conducted on the adult mosquitoes upon the four types of insecticide currently used in public health in Benin. Knock-down resistance, insensitive acetylcholinesterase-1 resistance, and metabolic resistance analysis were performed in the mosquito populations based on molecular and biochemical analysis. The data were mapped using Geographical Information Systems (GIS) with Arcgis software.

**Results:** Mortalities observed with Deltamethrin (pyrethroid class) were less than 90% in 5 locations, between 90-97% in 2 locations, and over 98% in one location. Bendiocarb (carbamate class) showed mortalities ranged 90-97% in 2 locations and were over 98% in the others locations. A complete susceptibility to Pirimiphos methyl and Fenitrothion (organophosphate class) was observed in all locations with 98-100% mortalities. Knock-down resistance frequencies were high (0.78-0.96) and similar between *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles melas*. Insensitive acetylcholinesterase-1 was rare (0.002-0.1) and only detected in *Anopheles gambiae* in concomitance with Knock-down resistance mutation. The maps showed a large distribution of Deltamethrin resistance, Knock-down mutation and metabolic resistance throughout the country, a suspected resistance to Bendiocarb and detection of insensitive acetylcholinesterase-1 from northern Benin, and a wide distribution of susceptible vectors to Pirimiphos methyl and Fenitrothion.

**Conclusion:** This study showed a widespread resistance of malaria vectors to pyrethroid previously located in southern Benin, an early emergence of carbamates resistance from northern Benin and a full susceptibility to organophosphates. Several resistance mechanisms were detected in vectors with a potential cross resistance to pyrethroids through Knock-down and metabolic resistance mechanisms.

**Keywords:** Pyrethroids resistance, Bendiocarb resistance, Insensitive acetylcholinesterase-1, Knock-down resistance, Resistance map

\* Correspondence: amerusangel@yahoo.fr

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin

<sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin

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

## **Annexe 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'H<sub>2</sub>O - 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 <sub>2</sub> 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

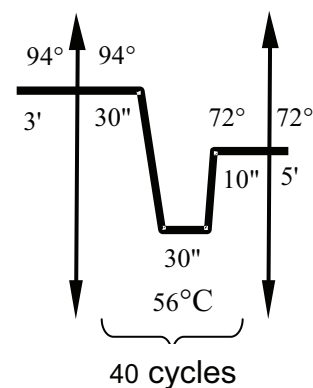
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH <sub>2</sub> O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

### Amplification :

3' [30", 30", 10"]<sub>40c</sub> 5' @ 56°C

### Taille attendue

*An. gambiae* : 390 bp  
*An. arabiensis* : 315 bp  
*An. melas* : 464 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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O		14.75 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

### Amplification :

3' [30", 30", 10"]<sub>35c</sub> 5' @ 55°C

### Taille attendue

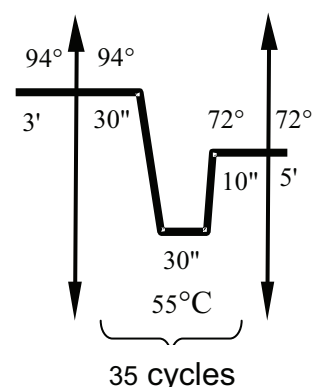
D1/D2 : 293 bp

D1/D3 : 195 bp

D2/D4 : 137 bp

**Résistant**

**Sensible**



**ELISA - CSP**  
(Circumsporozoite protein de Plasmodium)

DF, janv 2003

D'après Wirtz, Burkot et al . technique Fontenille LIN Mpl 2002

- 01 - SI NECESSAIRE PREPARER LES TAMPONS PBS - BB - TWEEN 20 - NP 40 +BB
- 02 - PREPARER LES MOUSTIQUES (Tête - Thorax dans tube numéroté)  
\* Ajouter 20 µl de NP 40/BB Laisser au moins 1 H (ou la nuit au réfrigérateur)
- 03 - PREPARER LE PLAN DE LA PLAQUE SUR LA FEUILLE (N° des moustiques, date, ...)
- 04 - BROYER LES MOUSTIQUES : 2 fois 190 µl de BB (conservation des tubes à - 20°C)
- 05 - SI NECESSAIRE RECONSTITUER LES ACm de capture (cf. fiche), garder à -20°C
- 06 - SENSIBILISER LES PLAQUES ELISA
  - a) Préparer les solution d'ACm de capture aux dilutions voulue : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande
  - b) - vortexer

CAPTURE Pour 1 plaque		Pour 3 plaques	
<i>p. falciparum</i> :	15 µl/5 ml PBS	f :	45 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax</i> 210 :	5 µl/5 ml PBS	v 210:	15 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax</i> 247 :	10 µl/5 ml PBS	v 247 :	30 µl/15 ml PBS
<i>p. malariae</i>	60 µl/5 ml PBS	m :	180 µl/15 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml PBS	o :	45 µl/15 ml PBS

b) Mettre 50 µl/puits (à pipette 8 canaux, pte jaune) de chaque ACm de capture

- \* SCREEN : mélange des plasmodiums a tester (n x 50 µl)
  - \* monospécifique : uniquement du plasmodium étudié (1 x 50 µl)
- Laisser la nuit sur la paillasse (ou le W.E. à 4°C).

- 07 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 08 - METTRE 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique)  
pendant 1 H sur paillasse.  
Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tête Thorax dans BB)
- 09 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER
- 10 - METTRE 50 µl du broyat de moustique par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit.  
Laisser pendant 2 H sur paillasse.
- 11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les ACm CONJUGUES,  
si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)
- 12 - VIDER LA PLAQUE. LAVER 2 FOIS AU PBS/TWEEN 20

13 - METTRE 50 µl/puits de l'**ACm CONJUGUE**, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl) LAISSER 1 H sur paillasse

ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, : il faut faire les essais de dilution à 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O + 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
	<b>Témoin pos</b>			
<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
	<b>Témoin pos</b>			
<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
	<b>Témoin pos</b>			

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

## Résumé

La relation entre l'âge physiologique, le portage du gène de résistance *Kdr* et l'infectivité au *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles gambiae* s.s. a été étudiée au Bénin, précisément dans les communes de Ifangni (village de Itassoumba) et de Adjarra (village de Abomey-Takplikpo), deux communes utilisant les MILD. Puisque les anophèles sensibles sont plus exposés à l'action létale des produits insecticides, les moustiques résistants devraient survivre plus longtemps et seraient plus âgés que les moustiques sensibles dans les zones où la pression de sélection par les matériaux imprégnés est forte. Alors, la fréquence des génotypes résistants (RR) du gène *Kdr* devrait être plus élevée chez les anophèles les plus âgés, ce qui n'a pas été démontré dans la pratique. De même, s'il est évident que le risque d'infectivité des moustiques augmente avec le nombre de repas sanguins et par conséquent avec le nombre de pontes, il manque aussi de démonstrations scientifiques dans ce domaine.

Pour cette étude, l'âge physiologique des anophèles capturés dans les deux localités a été déterminé à partir de la méthode de Polovodova. Le tête-thorax et la carcasse de chaque moustique disséqué ont servi respectivement à la mise en évidence de la protéine circumsporozoïtique du *Plasmodium* et de la mutation *Kdr*. Comme témoin, la longévité des souches de référence sensible (Kis-SS) et résistante (Kis-RR) a été aussi étudiée.

A Abomey-Takplikpo, les proportions de moustiques résistants et sensibles sont comparables suivant l'âge physiologique. 26,32% (n=85) des moustiques résistants sont des nullipares contre 24,68% (n=19) chez les sensibles (P=0,88); 44,89% (n=145) des résistants sont des unipares contre 53,25% (n=41) chez les sensibles (P=0,23). Le même constat a été fait chez les femelles multipares. A Itassoumba, les résultats obtenus sont similaires à ceux de Abomey-Takplikpo. Les anophèles des souches de référence sensible et résistante ont aussi la même longévité au laboratoire. Par ailleurs, dans les deux localités, les moustiques infectés au *P. falciparum* ont pondu au moins deux fois. A Abomey-Takplikpo, le taux d'infectivité de 4,17% (n=6) chez les moustiques bipares a connu une augmentation significative allant à 15,63% (n=5) chez les femelles tripares (p=0,03) et 37,50% (n=3) chez les quadripares (p=0,007). La même remarque a été faite à Itassoumba où le taux d'infectivité de 5,39% (n=9) chez les moustiques bipares a connu une augmentation significative allant à 17,24% (n=5) chez les tripares (p=0,04) et 30,77% (n=4) chez les quadripares (p=0,008).

Il ressort de cette étude que les anophèles sensibles et résistants ont la même espérance de vie dans les habitations humaines utilisant les MILD. Enfin, le taux d'infectivité au *P. falciparum* augmente significativement avec l'âge physiologique des anophèles.

**Mots clés :** *Anopheles gambiae* s.s, âge physiologique, gène *Kdr*, infectivité.

## Abstract

The relationship between the physiological age, the carriage of *Kdr* resistance gene and the infectivity to *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* s.s. was studied in Benin, precisely in the districts of Ifangni (village of Itassoumba) and of Adjarra (village of Abomey-takplikpo), two districts using LLINs. Indeed, susceptible *Anopheles* were exposed to the lethal action of insecticide products. Under these conditions, resistant mosquitoes should survive longer and would be older than susceptible mosquitoes in the areas where the selection pressure of impregnated materials is high. So the frequency of resistant genotypes (RR) of *Kdr* gene would be higher in older *Anopheles* compared to susceptible specimens (SS). Unfortunately, to date there are little scientific studies that examined these cases of selection of certain genotypes following the use of insecticides. Similarly, if it is obvious that the infectivity risk of mosquitoes increases with the number of blood meal and consequently the number of egg-laying, it lacks scientific demonstrations in this field.

At Abomey-takplikpo, the proportions of resistant and susceptible mosquitoes are comparable according to the physiological age. 26.32% (n=85) of resistant mosquitoes are nulliparous against 24.68% (n=19) in the susceptible (p=0.88), 44.89% (n=145) of resistant are uniparous against 53.25% (n=41) in the susceptible (p =0.23). The same observation was made in the multiparous females. Globally, at Itassoumba, the results obtained are similar to those of Abomey-takplikpo. Moreover, in the two localities, the mosquitoes infected to *P. falciparum* laid at least two times. At Abomey-takplikpo, the infectivity rate of 4.17% (n=6) in the biparous mosquitoes increased significantly to 15.63% (n=5) in the triparous females (p=0.03) and 37.50% (n=3) in the quadriparous (p=0.007). The same remark was made at Itassoumba where the infectivity rate of 5.39% (n=9) obtained in the biparous mosquitoes increased significantly to 17.24% (n=5) in the triparous (p=0.04) and 30.77% (n=4) in the quadriparous (p=0.008).

This study shows that the resistant and susceptible anopheles have the same life expectancy in the human dwellings where LLINs are used. However, the rate of infectivity of mosquitoes increases significantly with their physiological age.

**Key words :** *Anopheles gambiae* s.s, physiological age, *Kdr* gene, infectivity.