



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 : 79/EDSV

Année académique : 2014-2015

Présentée par : **Virgile Armel B. GNANGUENON**

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI

OPTION : ENTOMOLOGIE MEDICALE ET VETERINAIRE

Variabilité de la transmission du paludisme, de la durabilité et de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide en fonction des faciès éco-géographiques en zone de savane et de forêt dégradée au Bénin, Afrique de l'Ouest

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Président : Sahidou SALIFOU, 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

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

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

Date de soutenance : 25 Novembre 2015

Mention : Très honorable avec félicitation du jury



A l'Humanité, qu'elle trouve ici l'une de nos humbles contributions à l'amélioration de sa condition.

.

REMERCIEMENTS

Cette thèse vient couronner de longues années d'efforts conjugués de plusieurs personnes qui par leurs actions, soutiens et conseils l'ont rendue possible. En ce moment qui me grandit, j'aimerais remercier :

- **Professeur Martin AKOGBETO**, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et rendu possible cette thèse. C'est grâce à votre volonté et votre détermination que ce travail a vu le jour. Je suis arrivé pour mon Diplôme d'Ingénieur des Travaux au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou où vous m'avez offert l'opportunité de faire un stage et je ne le regrette pas. Vous m'avez formé, soutenu et inculqué les notions qui m'ont permis d'évoluer et d'avancer. C'est ici, le lieu de vous témoigner l'amour inconditionnel que j'ai pour vous. Contribuer au bonheur d'autrui est une tâche que seules les grandes âmes comme vous comprennent car vous nous donnez beaucoup de votre temps, de votre amour et de votre confiance. Merci de les recevoir en retour;

- **Le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, le President Malaria Initiative (PMI) à travers l'Agence des États-Unis pour le développement international (USAID), le Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies (CDC) et le Programme National de Lutte contre le Paludisme**, dont la collaboration et le partenariat dynamiques ont rendu possible cette thèse à travers différents appuis techniques et financiers. Daignez trouver ici, le témoignage de ma profonde gratitude.

Je tiens également à faire part de ma sincère gratitude aux **membres du Jury**, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. C'est un honneur pour moi d'être devant vous aujourd'hui. J'aimerais remercier spécialement:

- **Professeur Sahidou SALIFOU**, pour avoir accepté avec promptitude d'être rapporteur de cette thèse. Malgré vos nombreuses occupations, vous avez accepté avec convivialité de présider cette évaluation. Veuillez recevoir mes sincères remerciements ;

- **Professeur Ousmane FAYE**, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, malgré vos multiples occupations. Sincère merci à vous ;

- **Professeur Sékou F. TRAORE**, pour la promptitude avec laquelle vous avez accepté d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements ;

- **Professeur Kabirou MOUTAÏROU**, pour la convivialité et la promptitude avec lesquelles vous avez accepté d'examiner cette thèse. Sincère merci à vous ;

- **les comités de thèse** pour leurs conseils et recommandations ;

- **Professeurs Ambaliou SANNI, Kabirou MOUTAÏROU, Akpovi AKOUEGNINOU, Frédéric LOKO et Clément AGBANGLA**, vous avez été les dirigeants de mon école doctorale. Sincère merci pour avoir toujours répondu à nos sollicitations administratives.

Mes profondes gratitude vont spécialement à :

- Mesdames et Messieurs, Raymond Beach, Michael Green, Mariam Okè, Filémon Tokponnon, Harriette Ahohokpossi et Peter Thomas. Vous avez été d'une importance capitale dans la rédaction de cette thèse. Les nombreuses idées que vous avez apportées lors des différentes réunions des projets visant l'évaluation du profil entomologique du paludisme et la durabilité des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action ont été pour moi de précieuses contributions. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour notre fructueuse et franche collaboration.

- Messieurs Alain Nahum, Michel Sezonlin, Gil Germain Padonou, Armel Djènonnin, Anges Yadouléon et Innocent Djègbè, vos conseils et recommandations ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Recevez à travers ce document, mes sincères remerciements.

- Madame Emeline Oti-Tossou et Messieurs Ossè Razaki, Renaud Govoétchan, Roseric Azondekon, Frédéric Oké-Agbo, Constantin Adoha et Idelphonse Ahogni pour votre soutien et appui technique qui ont rendu possible cette thèse. Je vous dis sincèrement un grand merci.

- Messieurs Rodrigue Agossa et Rock Aïkpon, je voudrais vous dire merci pour votre noble soutien, votre sincère et franche collaboration.

- Mes chers amis Nazaire Aizoun, Ramziath AgbanrinYoussof, Hermione Adjé, Roseline Attolou, Badirou kèfilath, Abilou Olorounto, Alban Etchiha, Inès Bossou, Eric Tossou, Esaie Gnonlonfin, Espéranos de-Souza, Firmin Hounkanrinkpè, Gilbert Houéssou, Marina Ole Sangba Zelo, Charif Boukari, Toffodji Ulrick, Zul-Kifoul Djivoédo, N'djolossè Kouami, Klotoé Armand et Gabriel Sèna Ganhoutodé de la troisième promotion du Master en Entomologie Appliquée de la FAST, je voudrais vous dire un chaleureux merci pour rappeler l'ambiance fraternelle et chaleureuse de nos relations qui sont demeurées très solidaires.

- Je tiens aussi à remercier mesdames et messieurs Médard Yamadjako, Clémence Durand, Balbine Kindji, Herbert Noukpo, Arouna Salé, Lazare Houkanrin, Saka Alabi, Issiaka Adélodjou, Abibatou Odjo, Alia Roland, Estelle Vigninou, Eugène Zinzalo, Bio-Bangana Sahabi, Josias Fagbohoun, Damien Todjinou, Achille Oumbouké, Barnabas Zogo, Augustin Fongnikin, Rodrigue Anagonou, Martial Gbègbo, Richard Houssou, Faizil Kifouly, Guy Agbangla et tous les étudiants en Master d'Entomologie Appliquée, qui sont mes amis et collaborateurs du CREC pour leur esprit de collaboration et de fraternité.

- Messieurs Sébastien Koudénoukpo, Géraldo Houndéton et Aboubakar Sidick, je voudrais vous faire part de ma profonde gratitude pour votre entière disponibilité pour la réalisation des travaux de biologie moléculaire.

- Nous ne saurions omettre les autorités politico-administratives et sanitaires des localités prospectées, les captureurs et les populations locales pour la confiance et l'amitié dont ils ont fait preuve à notre égard. Cela a facilité notre étude sur le terrain.

La réalisation de la présente œuvre ne saurait être effective sans un soutien et une bonne ambiance familiale. C'est pourquoi, je tiens à remercier :

- Ma mère Agnès Kanontin et mon feu père Roger Gnanguenon, les mots me manquent pour vous exprimer ma profonde reconnaissance pour toutes les peines que vous vous êtes données pour mon éducation. Puisse Dieu vous récompenser. Veuillez trouver dans la présente thèse le fruit de tous les sacrifices que vous avez consentis;

- Mes frères et sœurs, Achilles, Florent, Laure et Yvonne, je ne pourrai jamais exprimer avec exactitude tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes précieux pour moi et je vous souhaite réussite et bon courage dans la vie. Je voudrais que le présent travail soit un bon exemple pour vous, en ce qui concerne la ténacité, le courage et la persévérance dans la poursuite de vos objectifs dans la vie;

- Nawal ma chère épouse et Neil mon adorable fils, votre présence à mes côtés a été un grand soutien. En dépit de mes nombreuses absences, conséquence de mes études, vous avez été compréhensifs. Merci pour votre confiance et votre amour;

- Mes oncles Gratien et Nicaise, merci pour l'affection et le soutien que vous m'aviez gracieusement offerts tout au long de ma formation;

- Tous les membres de ma famille, sincère merci pour vos contributions diverses.

Enfin, je remercie mon guide spirituel, le MAHANTA, pour m'avoir réellement montré à travers cette thèse que « DIEU viendra à celui qui a besoin de lui quelque soit sa réputation ou sa croyance ».

TABLE DES MATIERES

Liste des Figures	ix
Liste des Photos	xi
Liste des Tableaux.....	xii
Liste des Abréviations	xiv
Liste des Annexes	xi
Chapitre 1 : Introduction et Généralités.....	1
1.Introduction	2
2. Synthèse bibliographique	7
2.1. Epidémiologie du paludisme.....	7
2.1.1. Faciès épidémiologique du paludisme	9
2.1.2. Facteurs influençant la transmission du paludisme	11
2.1.3. Vecteurs du paludisme	12
2.1.3.1. Biologie des anophèles.....	14
2.1.3.2. Le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	17
2.1.3.3. Gîtes d'anophèles.....	18
2.1.3.4. Comportement trophique	19
2.2. La lutte contre les vecteurs du paludisme	19
2.2.1. La Pulvérisation Intradomiciliaire (PID) d'insecticide à effet rémanent.....	20
2.2.2. Les Moustiquaires imprégnées d'insecticide	20
2.2.3. La lutte contre les larves	23
2.3. Résistance des vecteurs aux insecticides	24
2.3.1. Résistance comportementale.....	24
2.3.2. Résistance cuticulaire.....	25
2.3.3. Résistance par modification des cibles	25
2.3.4. Résistance métabolique.....	27
2.3.5. Impact de la résistance sur le paludisme.....	27
2.3.6 Gestion de la résistance.....	28
Chapitre 2 :Matériels et Méthodes	29
1. Cadre d'étude.....	32
1.1. Végétation et climat du Bénin.....	32

1.1.1. Zones de forêts dégradées à climat subéquatorial.....	32
1.1.2. Zone de savanes à climat soudano-guinéen ou zone de transition.....	33
1.1.3. Zone de savanes à climat soudanien ou zone de savane soudanienne	33
2. Sites d'étude	34
2.1. Critères d'inclusion	34
2.3. Méthodes d'échantillonnage des populations de moustiques	41
2.3.1 Etude de la dynamique de population des vecteurs et de la transmission du paludisme	41
2.3.1.1 Capture directe de moustiques sur homme	41
2.3.1.2. Capture par piège-fenêtre et par spray matinal	42
2.3.1.3. Identification morphologique des espèces et traitement des moustiques	43
2.3.1.4. Dissection des ovaires.....	44
2.3.1.5. Réalisation du test ELISA-CSP pour déterminer le taux d'infectivité	44
2.3.1.6. Caractérisation moléculaire des populations de <i>An. gambiae s.l</i>	45
2.3.1.7. Estimation des indicateurs de la transmission vectorielle du paludisme	48
2.3.1.8. Analyse des données sur les vecteurs et la transmission du paludisme	49
2.3.2. Etude de la résistance des vecteurs aux insecticides et des mécanismes de résistance.....	50
2.3.2.1. Collecte des larves	51
2.3.2.2. Elevage des moustiques	51
2.3.2.3. Test de sensibilité et cartographie de la résistance aux insecticides	51
2.3.2.4. Caractérisation moléculaire de la résistance aux insecticides.....	52
2.3.2.5. Fréquence des mécanismes de résistance	53
2.3.2.6. Caractérisation biochimique des mécanismes de résistance	53
2.3.2.7. Cartographie de la résistance	53
2.3.2.8. Analyse des données	53
2.3.3. Survie des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action	53
2. 3.3.1. Type de moustiquaire impliqué dans l'étude.....	54
2. 3.3.2. Recensement des ménages et distribution des MILD.....	54
2. 3.3.3. Sélection des ménages et marquage des MILD.....	54
2. 3.3.4. Procédure de collecte de données	58
2. 3.3.5. Enquête prospective et questionnaire.....	58
2. 3.3.5.1. Suivi de la présence /absence des moustiquaires marquées dans les ménages	58
2. 3.3.5.2. Suivi de l'intégrité physique	59

2. 3.3.5.3. Questionnaire d'interview	59
2. 3.3.5.4. Evaluation de la bio-efficacité par la Chromatographie gazeuse (GC)	60
2. 3.3.6. Analyse de données.....	63
Chapitre 3 :Distribution des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae s.l</i> et dynamique de la transmission de <i>Plasmodium falciparum</i> au Bénin.....	66
1. Résultats.....	68
1.1. Diversité des moustiques	68
1.2. Répartition spatio-temporelle des espèces du complexe <i>An. gambiae</i>	70
1.3. Agressivité de <i>Anopheles gambiae s.l</i>	71
1.4. Agressivité d'autres Culicidae.....	75
1.5. Longévité de <i>An. gambiae s.l</i>	76
1.7. Taux de gorgement des moustiques	78
1.8. Infectivité de <i>An. gambiae s.l</i>	78
1.9. Taux d'inoculation entomologique de <i>An. gambiae sensu lato</i>	80
2. Discussion.....	86
Conclusion.....	90
Chapitre 4 :Résistance des vecteurs aux insecticides et mécanismes de résistances impliqués	91
1. Résultats.....	93
1.1. Effet de la deltaméthrine sur les moustiques (effet knock-down et effet létal)	93
1.2. Effet du bendiocarb sur les moustiques	95
1.3. Effet du pirimiphos methyl sur les moustiques.....	96
1.4. Effet du Fenitrothion sur les moustiques	97
1.5 Cartographie de la résistance aux insecticides.....	99
1.6. Mécanismes de résistance moléculaire aux insecticides détectés chez <i>Anopheles gambiae s.l</i>	100
1.7. Mécanismes de résistance biochimique	102
1.8 Cartographie des mécanismes de résistance	104
2. Discussion.....	106
Conclusion.....	108
Chapitre 5 :Etude de la survie des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action dans les conditions de terrain et des facteurs associés à leur dégradation physique	110
1. Résultats.....	112

1.1. Taux de survie/perte.....	112
1.2. Raisons de la perte des moustiquaires.....	115
1.3. L'intégrité du tissu des MIILD	117
1.4. Causes directes de la perte de l'intégrité physique	120
1.5. Facteurs associés aux déchirures des moustiquaires.....	122
1.6. Bio-efficacité.....	124
1.6.1. Calibrage du test GC	124
1.6.2. Suivi de la bio-efficacité	126
2. Discussion.....	129
Conclusion	131
Chapitre 6 :Discussion Générale, Conclusion et Perspectives.....	133
1. Dynamique des vecteurs et variabilité de la transmission du paludisme	134
2. Sensibilité des vecteurs aux insecticides	135
3. Durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD)	137
Conclusion et Perspectives	139
Références Bibliographiques.....	141

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle du paludisme.	9
Figure 2: Répartition du paludisme dans le monde.....	11
Figure 3: Répartition géographique des espèces du complexe <i>An. gambiae</i>	13
Figure 4: Œuf d'anophèle.....	14
Figure 5: Larves d'anophèle.....	15
Figure 6: Nymphes d'anophèles à la surface de l'eau.....	16
Figure 7: Distribution géographique des sites d'étude.....	30
Figure 8: Carte montrant les quatre sites d'évaluation des MIILD.....	36
Figure 9: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Kessounou	55
Figure 10: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Allada.....	56
Figure 11: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Kandi	56
Figure 12: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Malanville	57
Figure 13: Identification de la position d'échantillonnage.....	60
Figure 14: Profil de diversité observée sur les différents sites d'étude.....	69
Figure 15: Distribution spatio-temporelle des espèces du complexe <i>An. gambiae</i>	70
Figure 16: Variation de la densité agressive de <i>An. gambiae s.l</i> en fonction de la pluviométrie à Allada	72
Figure 17: Variation de la densité agressive de <i>An. gambiae s.l</i> en fonction de la pluviométrie à Dassa.....	72
Figure 18: Variation de la densité agressive de <i>An. gambiae s.l</i> en fonction de la pluviométrie à Parakou	73
Figure 19: Variation de la densité agressive de <i>An. gambiae s.l</i> en fonction de la pluviométrie à Kandi et Malanville	73
Figure 20: Variation de la densité agressive de <i>An. gambiae s.l</i> en fonction de la pluviométrie à Adjohoun, Pobè et Ouidah	74
Figure 21: Représentation des transmissions des localités sur les axes 1 et 2	83
Figure 22: Représentation des transmissions des localités sur les axes 1 et 3	83
Figure 23: Représentation des transmissions des localités sur les axes 2 et 3	84
Figure 24: Taux d'inoculations entomologiques prédits dans chaque localité	85
Figure 25: Pourcentage de <i>An. gambiae s.l</i> tombés sur le dos "knocked-down" en fonction du temps au cours de leur exposition à la deltaméthrine.....	93

Figure 26: Pourcentage de mortalité de <i>An. gambiae s.l</i> après 60 minutes d'exposition aux papiers imprégnés de deltaméthrine et après 24 heures de mise en observation	93
Figure 27: Mortalités immédiates observées au cours des 60 minutes d'exposition des moustiques au bendiocarb	94
Figure 28: Mortalités observées 24h après exposition des moustiques au bendiocarb	95
Figure 29: Mortalités immédiates observées au cours des 60 minutes l'exposition des moustiques au pirimiphos méthyl	96
Figure 30: Mortalités observées 24h après exposition des moustiques au pirimiphos méthyl	96
Figure 31: Mortalités immédiates observées au cours des 60 minutes l'exposition des moustiques au fénitrothion	97
Figure 32: Mortalités observées 24h après exposition des moustiques au fénitrothion.....	98
Figure 33: Distribution de la résistance des vecteurs aux insecticides	99
Figure 34: Activités des mono-oxygénase chez les <i>An. gambiae s.l</i> collectés	102
Figure 35: Activités des α -estérases chez les <i>An. gambiae s.l</i> collectés	102
Figure 36: Activités des β -estérases chez les <i>An. gambiae s.l</i> collectés	103
Figure 37: Activités des Glutathion-S-transférase chez les <i>An. gambiae s.l</i> collectés.....	103
Figure 38: Distribution des mécanismes de résistance aux insecticides sur les sites d'étude	104
Figure 39: Modèles de perte en moustiquaires estimés pour les différents sites	113
Figure 40: Comparaison des taux de survie observés à ceux prédits par Netcal	114
Figure 41: Mortalités observées avec les tests en cône de l'OMS et utilisées pour déterminer le seuil de GC	123
Figure 42: courbes ROC montrant la prédiction des résultats des tests en cône de l'OMS par la méthode GC.....	123
Figure 43: Diagramme de dispersion des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T6.....	125
Figure 44: Variabilité des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T6	125
Figure 45: Diagramme de dispersion des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T12.....	126
Figure 46: Diagramme de dispersion des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T18 et T24	126
Figure 47: Résultats des tests en cône - taux de mortalité observé après 3 mn d'exposition des femelles de <i>An. gambiae</i> Kisumu à des moustiquaires Olyset après 12 mois d'utilisation	127

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Lavage des habits au bord du fleuve Sota à Malanville.....	35
Photo 2: Transport de l'eau de fontaine vers les habitations à Kandi	35
Photo 3: Illustration d'une capture nocturne sur homme	41
Photo 4: Capture de moustiques par piège-fenêtre.....	472
Photo 5: Capture par spray matinal	42
Photo 6: Plaque ELISA après action du substrat de la peroxydase	44
Photo 7: Plaque ELISA après blocage de la réaction avec H ₂ O	44
Photo 8: Broyage du moustique au CTAB	45
Photo 9: Digestion du broyat au bain-marie.....	45
Photo 10 : Dispositif de centrifugation à 1000 tours/minutes	45
Photo 11: Tubes eppendorf contenant l'ADN	45
Photo 12: Dispositif de migration du produit PCR	47
Photo 13: Etiquetage de la moustiquaire	45
Photo 14: Double marquage à l'encre	55
Photo 15: Enregistrement des coordonnées GPS	55
Photo 16: Différentes catégories de trou sur les moustiquaires	58
Photo 17: Différentes étapes de la technique de collecte d'insecticide.....	61
Photo 18: Dosage de l'insecticide par chromatographie gazeuse	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques des sites d'études	33
Tableau II: Résumé des caractéristiques des sites de suivi des MIILD	36
Tableau III: Répartition des ménages sélectionnés par site	54
Tableau IV: Diversité culicidienne observée sur les sites d'étude	68
Tableau V: Variations du taux de piqûre observées chez <i>An. gambiae s.l</i>	71
Tableau VI: Variations du taux de piqûre observées chez les autres moustiques nuisants	75
Tableau VII: Taux de parturité de <i>An. gambiae s.l</i> par commune	75
Tableau VIII: Exophilie et Endophilie observées chez les moustiques collectés par piège-fenêtres et après aspersion d'une bombe aérosol (sprays)	76

Tableau IX: Taux de gorgement des moustiques collectés dans les habitations	77
Tableau X: Variation des taux d'infectivité de <i>An. gambiae s.l</i> à Allada, Dassa, Parakou, Kandi Malanville et les périodes d'étude	78
Tableau XI: Variation des taux d'infectivité entre Adjohoun, Pobè, Ouidah et les périodes d'étude	79
Tableau XII: Variation des taux de piqûres infectantes dans les communes Adjohoun, Pobè, Ouidah	80
Tableau XIII: Variation des taux de piqûres infectantes dans les communes Allada, Dassa, Parakou, Kandi et Ouidah	81
Tableau XIV: Localités déterminantes dans la composition des facteurs retenus.....	82
Tableau XV: Fréquences Kdr observées chez les différentes espèces du complexe <i>An. gambiae</i>	100
Tableau XVI: Fréquences Ace-1R observés chez les différentes espèces du complexe <i>An. gambiae</i>	101
Tableau XVII: Taux de survie des MIILD par site d'étude	113
Tableau XVIII: Raisons de la perte des moustiquaires	115
Tableau XIX: Conditions physiques des MIILD après chaque visite d'évaluation	117
Tableau XX: Distribution des types de dommages physiques observés sur les moustiquaires après 12, 18 et 24 mois.....	119
Tableau XXI: Distribution des caractéristiques des ménages visités à T12, T18 et T24	121
Tableau XXII: Facteurs associés à la perte de l'intégrité physique des MIILD.....	122

LISTE DES ABREVIATIONS

Ace-1: Acétylcholinestérase 1

An: Anopheles

CDC: Center for Diseases Control

COE : Carboxyl estérase

CREC : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

CS : Circumsporozoïtique

CSP: Circum Sporozoitic Protein

DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

ELISA: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay

FAST: Faculté des Sciences et Techniques

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GPS: Global Positionning System

GST: Glutathion-S-Transférase

IC: Intervalle de confiance

INSAE: Institut National de la Statistique et d'Analyse Economique

Is: Indice sporozotique

Kdr: Knock-down resistant

MIILD : Moustiquaire Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action

OR : Odd Ratio

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PHI : Proportionate Holes Index

PHN : Piquêre par homme par nuit

PID: Pulvérisation Intra Domiciliaire

PMI: President's Malaria Initiative

PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme

PNUD: Programme des Nations Unies pour le Développement

PVC: Polychlorure de vinyle

Rdl : Resistance dieldrin

TIE: Taux d'inoculation Entomologique

TPI : Traitement Préventif Intermittent

TPP: Triphénylphosphate

WHO: World Health Organisation

LISTE DES ANNEXES

Annexes 1 : Articles publiés

Annexes 2 : Protocoles

Chapitre 1 :

Introduction et Généralités

1. Introduction

Le paludisme, aussi appelé malaria, est la maladie parasitaire la plus répandue en Afrique. Les efforts de lutte déployés au niveau mondial contre cette maladie ont entraîné une diminution du nombre de décès dus au paludisme. Ce nombre est passé de près de 1 million en 2000, à 584000 en 2013 (WHO 2013a). Plusieurs pays africains ont enregistré une diminution du nombre de cas confirmés de paludisme et du nombre d'hospitalisations et de décès notifiés (WHO 2013a). Ces importants progrès enregistrés dans la réduction du paludisme sont principalement dus à la mise en œuvre de l'initiative "Roll Back Malaria" (RBM) qui s'est fixé, en 2005, l'objectif de réduire d'au moins 50% le nombre de décès imputables au paludisme en 2010 et de 75% à l'horizon 2015 (WHO 2010). Pour atteindre ces objectifs, il est prévu que les pays membres doivent accroître la couverture universelle des personnes exposées au risque de paludisme en leur facilitant l'accès aux moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) et à la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide (PID).

Le Bénin, depuis avril 2000, s'est engagé à soutenir l'initiative "Roll Back Malaria" (RBM) lors de sa participation au sommet des Chefs d'Etat et de Gouvernement à Abuja (Nigeria) (PNLP 2006). C'est dans ce cadre qu'en 2008, la PID a été mise en place, et la distribution en accès universel des MIILD est devenue effective en 2011. Compte tenu des gros moyens déployés dans l'acquisition des MIILD et dans les programmes de PID, une bonne gestion de ces moyens de lutte passe indubitablement par leur utilisation rationnelle. Dès lors, l'évaluation permanente de ces interventions de lutte devient indispensable à la réussite des programmes nationaux de lutte antivectorielle.

Bien que l'utilisation des MIILD ait montré son efficacité à grande échelle (Shargie *et al.*, 2008; Terlouw *et al.*, 2010), l'approche de couverture universelle largement partagée par les politiques de santé est confrontée à deux facteurs : l'utilisation correcte des moustiquaires et le défi du maintien d'un niveau élevé de la couverture (Trape 2001; Damien *et al.*, 2010). Selon les critères de l'OMS, les MIILD doivent avoir suffisamment d'activité insecticide après 20 lavages et un temps minimum de 3 ans d'utilisation sur le terrain. Sur la base de ces critères, le système OMS d'évaluation des pesticides (WHOPES) a donné son approbation à six catégories de MIILD. Cependant, les données récentes sur l'évaluation des MIILD révèlent un certain nombre de problèmes partout où les MIILD sont utilisées. En effet, il est prouvé que les pratiques de lavage, qui varient d'une région à une autre ont un impact significatif sur la survie des MIILD et sur l'efficacité de l'insecticide d'imprégnation. Des résultats d'études multi-pays (WHO 2011) indiquent que deux types de moustiquaires

imprégnées avec la recommandation WHOPEs (le PermaNet® et le Olyset®) ont démontré une efficacité limitée après 3 ans d'utilisation. De plus, plusieurs travaux ont montré que les MIILD ne durent pas aussi longtemps que prévu (Kilian *et al.*, 2008; Kilian *et al.*, 2011). Avant terme, certaines sont données, déchirées et jetées, ou inefficaces. Enfin, les performances d'un même type de MIILD semblent meilleures dans certains pays que dans d'autres (WHO 2011). Toutes ces observations indiquent que la durée de vie des MIILD et leur bio-efficacité peuvent varier considérablement d'un endroit à l'autre, probablement en raison de facteurs qui ne sont pas intrinsèques aux MIILD.

Pour atteindre et conserver un niveau élevé de couverture (seuil de 80% fixé par l'initiative RBM), il est alors important de prédire la durée de vie et le temps de remplacement des MIILD au sein de la population. Le maintien de ce taux de couverture élevé implique que le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) sache quand ces MIILD seront considérées comme usées, inefficaces et doivent être remplacées. Cela aiderait à programmer les campagnes successives de remplacement des moustiquaires pour maintenir, en permanence, leur effet protecteur. Par conséquent, un outil de surveillance est nécessaire pour informer sur le calendrier de remplacement. C'est l'esprit de cette thèse qui nous a permis de mettre en place et de tester un outil de suivi des MIILD après une campagne nationale de distribution.

Pour répondre à la question du remplacement des MIILD usagées, trois indicateurs ont été suivis: la survie des MIILD pour estimer le taux de perte des moustiquaires par les ménages, leur intégrité pour estimer le degré de détérioration physique et leur bio-efficacité pour estimer le taux de chute de l'insecticide d'imprégnation. Les données générées ont été utilisées pour générer une fonction de survie sous différents modèles. La courbe de survie pourrait alors être exploitée pour la prise de décisions sur les programmes de remplacement des MIILD. De plus, les données de suivi peuvent être utilisées pour mieux orienter la campagne de distribution nationale des MIILD sur la base des particularités qui pourraient exister entre les régions. Sur le plan théorique, les fonctions de survie et la bio-efficacité des MIILD varieront d'une zone écologique à l'autre. Par conséquent, en tant que pays accédant à l'échelle de couverture universelle des MIILD, il est important d'avoir des informations utiles sur la survie des MIILD dans une variété de conditions.

Cette étude qui évalue le comportement de la population relatif à l'utilisation et à la dégradation des MIILD dans la communauté a été couplée avec une étude sur la dynamique de la transmission du paludisme. Le but de cette étude est d'établir le profil entomologique du *Plasmodium falciparum* dans les principaux sites géographiques du Bénin de manière à

disposer de données de base solides sur la transmission entomologique du paludisme. Au cas où le comportement d'une communauté ne serait pas compatible avec une utilisation efficiente des MIILD, ces données de base pourraient servir à la mise en œuvre d'une intervention de lutte plus adaptée. Cette étude se justifie également par les conséquences d'une leçon que nous tirons de la mise en œuvre de la Pulvérisation Intradomiciliaire d'Insecticide (PID) au Bénin.

En effet, entre 2008 et 2010, quatre tours de PID ont été mis en œuvre dans le département de l'Ouémé au Bénin. Cette intervention a entraîné une réduction significative de la transmission du paludisme dans ce département (Akogbeto *et al.*, 2011; Ossè *et al.*, 2012). Mais, en raison de la faible durée d'action de l'insecticide utilisé pour le traitement des murs (Bendiocarb), l'intervention a été transférée dans le département de l'Atacora. Dans ce département, la période de transmission a été estimée plus courte et on pensait qu'un tour de PID par an devrait être suffisant (Aïkpon *et al.*, 2013a; Ossè *et al.*, 2013). Mais en réalité, la transmission du paludisme dans l'Atacora n'est pas de courte durée et on aurait pu éviter ce transfert si le choix de ces zones était basé sur des données de base fiables. Malheureusement, l'urgence de mise œuvre de certaines interventions de lutte antivectorielle ne permet pas aux programmes de lutte de rassembler des informations de base sur les périodes de transmission et la résistance des vecteurs pouvant éclairer la mise en place de ces interventions dans les zones ciblées. Dans l'exemple de l'Atacora, à la veille de la mise en œuvre de la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide, aucune donnée de base n'existait en entomologie. Il a fallu organiser une étude de base rapide, mais insuffisante pour avoir des informations sur la durée de la transmission. C'est pourquoi nous avons initié une étude sur le profil entomologique du paludisme dans les principales zones géographiques du Bénin dont les résultats seront utilisés comme guide à la mise en place des prochaines stratégies de lutte antivectorielle, dont la PID. Les données portent sur la dynamique de la population des vecteurs au Bénin, les différentes espèces d'anophèles qui assurent la transmission du paludisme dans les différentes zones, leur niveau de sensibilité aux insecticides, leur degré d'endophilie et d'endophagie et leur degré d'infectivité au *Plasmodium falciparum*. De plus, cette surveillance entomologique est un élément clé pour renseigner sur les insecticides candidats potentiels pour la PID. Les deux aspects évoqués, à savoir, les problèmes liés à l'intégrité physique des MIILD dans les communautés et à l'hétérogénéité de la transmission du paludisme nous a conduit à initier les travaux de cette thèse intitulé « **Variabilité de la transmission du paludisme, de la durabilité et de l'efficacité des moustiquaires**

imprégnées d'insecticide en fonction des faciès éco-géographiques en zone de savane et de forêt dégradée au Bénin, Afrique de l'Ouest ».

Ce travail repose sur quatre principales hypothèses :

- i) La population des anophèles vecteurs et la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* varient dans le temps et d'une région à une autre au Bénin ;
- ii) La résistance des vecteurs aux différentes classes d'insecticides varie selon les classes d'insecticides et selon les mécanismes de résistance en cause;
- iii) Les conditions géographiques (localisation) influencent la durée de vie protectrice des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action ;
- iv) Plusieurs facteurs extrinsèques (habitudes de la communauté) influencent la détérioration physique des moustiquaires.

L'objectif principal est d'étudier la dynamique des indicateurs entomologiques de la transmission de *Plasmodium falciparum* et de la résistance des vecteurs aux insecticides dans différentes zones éco-géographiques le long du transect Sud-Nord Bénin et la variabilité de la survie des moustiquaires imprégnées dans les conditions d'utilisation par les communautés.

De façon spécifique, il s'agira de :

- i) Etudier la dynamique des populations du complexe *An. gambiae s.l* et du taux d'inoculation entomologique dans différentes zones épidémiologiques du Bénin ;
- ii) Evaluer la sensibilité de *An. gambiae s.l* aux différentes classes d'insecticides et les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides;
- iii) Déterminer la durée de vie utile des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action dans différentes conditions d'utilisation domestique ;
- iv) Identifier les facteurs impliqués dans la détérioration physique des moustiquaires.

Cette thèse est subdivisée en six chapitres articulés autour des articles publiés et soumis pour publication dans le cadre de cette recherche.

Le premier chapitre présente le contexte dans lequel s'inscrit le travail ainsi que les hypothèses qui ont permis de fixer les objectifs à atteindre. Il fait également le point des connaissances actuelles sur le paludisme et les vecteurs impliqués ainsi que les méthodes utilisées pour lutter contre la maladie.

Le deuxième chapitre expose l'ensemble du matériel et des méthodes. Il définit les critères de sélection des sites, des types d'échantillonnages et des méthodes d'analyse des données.

Le troisième chapitre est dévolu à la caractérisation de la transmission du paludisme et de la distribution spatio-temporelle des vecteurs impliqués dans différentes zones géographiques du

Bénin. Cette caractérisation s'appuie sur des recherches entomologiques qui ont permis le calcul de certains indicateurs entomologiques et d'évaluer la distribution des vecteurs identifiés. Nous avons analysé dans ce chapitre les implications entre les niveaux de transmission du paludisme et les stratégies de lutte antivectorielle au Bénin.

Le quatrième chapitre évalue et cartographie le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle. Il étudie également les différents mécanismes impliqués dans cette résistance et examine ensuite leur implication pour les stratégies de lutte basées sur l'utilisation d'insecticide au Bénin.

Dans le cinquième chapitre, nous avons étudié la durée de vie des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action dans différentes conditions d'utilisation et de lavage sur le terrain dès leur distribution par le PNLP en 2011. Ces moustiquaires ont été suivies afin d'identifier les facteurs qui pourraient contribuer à la perte de leur durabilité ainsi qu'à la chute de l'insecticide dans les fibres. Ce chapitre fait donc le point sur leur survie, l'intégrité physique, la bio-efficacité de ces moustiquaires et les facteurs associés à la chute de chacun de ses paramètres.

Enfin, le sixième chapitre présente une discussion générale sur les différents résultats obtenus, suivis d'une conclusion et des perspectives de recherche sur la lutte contre le paludisme au Bénin.

Les résultats de cette thèse devront faciliter la constitution d'outils d'aide à la prise de décision pour une meilleure gestion des stratégies de lutte antivectorielle au Bénin.

2. Synthèse bibliographique

2.1. Epidémiologie du paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire potentiellement mortelle transmise par des moustiques. On pensait à l'origine que cette maladie provenait des zones marécageuses, d'où le nom de malaria dérivé du mot ancien 'palud', marais. En 1880, Ronald Ross (Anon 2012) a découvert la véritable cause du paludisme, un parasite unicellulaire appelé Plasmodium. Ils ont ensuite découvert que le parasite était transmis d'une personne à une autre par les piqûres d'un moustique anophèle femelle, qui a besoin de sang pour nourrir ses œufs. En effet, la femelle, en prenant son repas de sang, ingère un hématozoaire du genre Plasmodium qui est responsable de la maladie.

La transmission du paludisme se fait aussi par transfusion sanguine d'une personne infectée vers une personne saine. Le paludisme peut être également congénital par la transmission verticale ou transmission mère – enfant (Larivière *et al.*, 1987; Lindsay & Gibson 1988).

Les agents responsables du paludisme sont des hématozoaires appartenant aux sous-ordres des Haemosporidae, à la famille des Plasmodiae et au genre Plasmodium. Cinq agents de Plasmodium sont responsables de paludisme chez l'homme (Oddoux *et al.*, 2011):

- *Plasmodium falciparum* est le plus répandu en régions tropicales et intertropicales et le plus redoutable puisque responsable de l'accès pernicieux ;
- *Plasmodium vivax* est responsable de la fièvre tierce bénigne ; sa répartition est plus large et intéresse aussi les zones tempérées. Il est par contre rare en Afrique de l'Ouest et centrale où sa transmission est limitée par une résistance génétiquement déterminée chez les individus du groupe Duffy ;
- *Plasmodium ovale* est très proche de *Plasmodium vivax* et est répandu dans les régions d'Afrique où *Plasmodium vivax* n'existe pas ou est peu répandu ;
- *Plasmodium malariae* est l'agent responsable de la fièvre quarte. Sa distribution est clairsemée et localisée en foyer. Il est présent aussi bien en zone tempérée qu'en zone tropicale. Il est rare au Bénin mais présent en Afrique du Nord et du Sud ;
- *Plasmodium knowlesi* est responsable de la fièvre, des frissons, des douleurs abdominales, de la toux, d'une tachypnée et d'une tachycardie. Il est répandu en Asie du Sud et en Asie du Sud-est.

Ces parasites évoluent successivement chez l'homme, hôte intermédiaire hébergeant la multiplication asexuée ou schizogonie et chez le moustique du genre *Anopheles*, hôte définitif où s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonie (Bonneville *et al.*, 2006).

- Le cycle du parasite chez l'homme (la schizogonie) comprend plusieurs étapes:

La piqûre infectante : c'est à ce moment que le parasite est inoculé à l'homme par le moustique et qu'il commence son cycle ;

Le développement dans les cellules du foie : les parasites vont dans le foie, s'y multiplient et donnent naissance à des milliers de nouveaux parasites. Les cellules du foie éclatent et libèrent ces parasites qui pénètrent dans des globules rouges ;

La multiplication et l'éclatement dans le sang : les parasites se multiplient dans les globules rouges et les font éclater, libérant de nombreux parasites qui vont infecter de nouveaux globules rouges. A cet éclatement des globules rouges, correspond le paroxysme de l'accès palustre ;

La différenciation des parasites en gamétocytes (cellules reproductrices) : à l'intérieur des globules rouges, certains parasites se transforment en gamétocytes mâles et femelles. A ce stade, les parasites ne peuvent poursuivre leur cycle que s'ils sont absorbés par le moustique (Bonneville *et al.*, 2006).

- Le cycle du parasite chez le moustique (la sporogonie) comprend :

La piqûre infectante pour le moustique : lors de la piqûre d'un sujet humain porteur de gamétocytes, le moustique ingère ces gamétocytes qui se transformeront ensuite en gamètes.

La reproduction du Plasmodium : dans l'estomac du moustique, la fécondation des gamètes femelles par les mâles donne des œufs mobiles ou ookinètes qui traversent la paroi de l'estomac. Au niveau de la face interne de l'épithélium mésentérique, les ookinètes donnent des oocystes dans lesquels se différencient des sporozoites qui après éclatement des oocystes sont libérés et gagnent les glandes salivaires de l'anophèle. Le cycle peut alors se poursuivre chez l'homme dès la prochaine piqûre (Figure 1) (Larivière *et al.*, 1987; Lindsay and Gibson 1988; Bonneville *et al.*, 2006).

La durée du cycle chez le moustique est très variable dépendant notamment de la température et de l'espèce plasmodiale. A titre d'exemple, pour *P. falciparum*, un cycle dure 13 jours à 25°C et 30 jours à 20°C. Il faut environ 10 jours après les premiers symptômes du paludisme pour que l'homme soit infestant pour le moustique. Le parasite qui infeste l'homme ne peut pas continuer son cycle chez les animaux, ni donc les infester, excepté dans les cas de certains grands singes avec *P. malariae* et *P. vivax* (Larivière *et al.*, 1987; Lindsay and Gibson 1988).

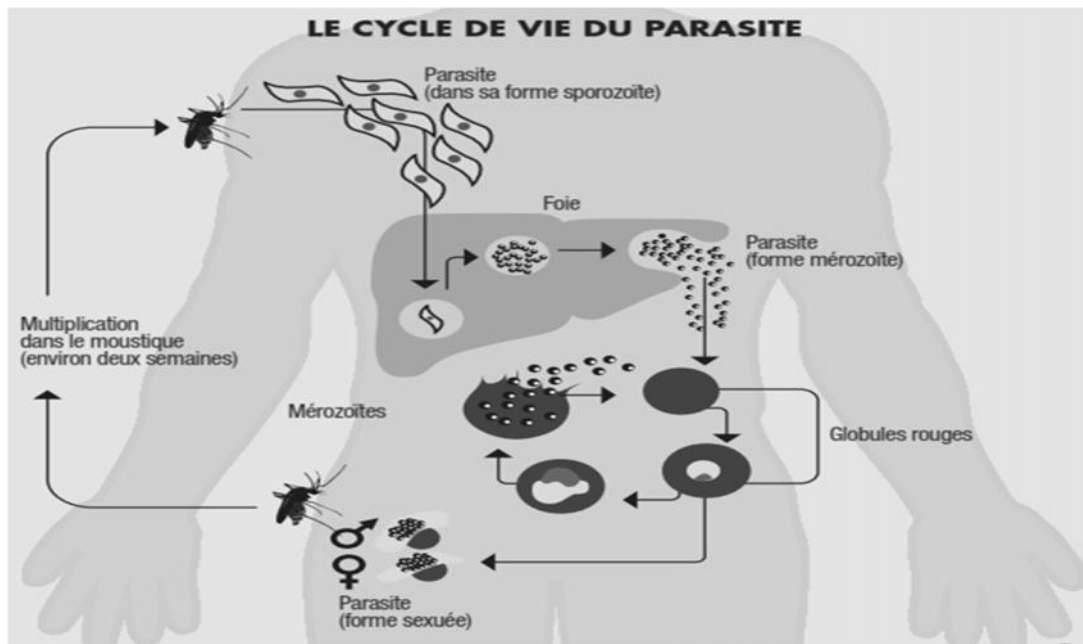


Figure 1: Cycle du paludisme (Braly 2012)

2.1.1. Faciès épidémiologique du paludisme

La répartition du paludisme dans le monde (Figure 2) dépend en partie des caractéristiques intrinsèques du vecteur (compétence vectorielle) et de sa capacité vectorielle. La compétence vectorielle se définit par l'aptitude intrinsèque d'une espèce d'anophèle à assurer le développement complet du parasite (du stade oocinète dans l'estomac moyen au stade oocyste dans l'épithélium et éventuellement jusqu'au stade de sporozoïte infectant dans les glandes salivaires). L'incapacité du *Plasmodium* à se développer chez certaines espèces de moustiques peut être causée par l'absence chez ces moustiques de facteurs métaboliques indispensables au développement parasitaire, mais elle peut également résulter de la présence de toxines qui inhibent activement la croissance du parasite (Mouchet *et al.*, 1993).

La présence de vecteurs dépend de conditions locales qui expliquent une part importante de l'hétérogénéité de la distribution du paludisme. Dans le monde, on distingue des zones non impaludées sans anophèles (continent antarctique, Groenland, Islande, Polynésie centrale et orientale), des zones non impaludées avec anophèles (Anophélisme sans paludisme) et des zones d'endémie palustre (Mouchet *et al.*, 1993).

L'anophélisme sans paludisme (Europe et Amérique du Nord) regroupe des zones avec des anophèles non-vecteurs et des zones avec des anophèles anciennement vecteurs de souches plasmodiales qui ont disparu au cours des siècles ou qui ont été éradiquées au cours du programme mondial d'éradication du paludisme (1960–1970) (Santé 1964). Dans ces zones, subsistent des anophèles qui ont assuré au cours des siècles la transmission des différentes

espèces de *Plasmodium* et dont la capacité à transmettre des souches de même espèce, originaires d'autres continents, ne doit pas être négligée. Dans les zones d'endémie palustre (zones intertropicales), différentes tentatives de classification ont été proposées. Basées sur des indices cliniques ou parasitologiques, elles ne prenaient pas en compte la composante vectorielle ni l'apparition d'une immunité de prémunition et les variations de ces indices n'avaient pas les mêmes significations suivant les régions où sévissent les plasmodies. En 1984, Carnevale et collaborateurs ont proposé le concept de faciès épidémiologique pour l'Afrique de l'Ouest, concept étendu ensuite à toute l'Afrique et généralisé en 1992 (Mouchet *et al.*, 1993). La classification épidémiologique est dorénavant locorégionale.

Un faciès épidémiologique est un ensemble de lieux et régions où le paludisme présente dans ses manifestations pathologiques des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite. En conséquence, dans ces lieux, la stabilité de la maladie, la prévalence parasitaire, l'incidence clinique et les paramètres entomologiques définis par l'indice de stabilité du paludisme (St) y sont similaires. St est une estimation du nombre de piqûres sur homme effectuées par un moustique pendant toute sa vie. Il repose sur le nombre de sujets humains piqués par la même femelle en une nuit (a) et sur l'espérance de vie des anophèles ($1/\ln p$), d'où $S = \frac{a}{-\ln p}$ (Mouchet *et al.*, 2004).

On distingue ainsi des « faciès primaires » stables, intermédiaires et instables. Dans les zones de transmission élevée et régulière (de l'ordre d'une centaine à quelques centaines de piqûres infectantes par personne et par an), la morbidité et la mortalité sont concentrées chez les jeunes enfants. C'est la situation de « paludisme stable », où l'indice de stabilité est supérieur à 2,5 et la transmission et l'éradication du parasite est difficile (Macdonald 1955). Dans cette zone, la prémunition est acquise tôt dans l'enfance.

Dans les zones où la transmission est habituellement moins importante (de l'ordre d'une à quelques dizaines de piqûres infectantes par personne et par an) avec un indice de stabilité compris entre 0,5 et 2,5, on parle de stabilité moyenne ou intermédiaire. Il peut exister de brefs pics de transmission intense et de grandes variations saisonnières dans l'aspect épidémiologique du paludisme. La morbidité et la mortalité touchent alors des enfants jeunes mais aussi plus âgés; les adultes sont plus souvent malades. La prémunition est lente à s'établir.

Dans les conditions où la transmission est très basse (moins une piqûre infectante par personne et par an) ou interrompue pendant plusieurs années, la prémunition ne peut s'établir durablement et le paludisme peut se manifester sur le mode épidémique. La morbidité et la

mortalité concernant alors indistinctement toutes les classes d'âge de la population. C'est le « paludisme instable » avec un indice de stabilité inférieur à 0,5.

Appliqués à un continent, ces faciès permettent de découper celui-ci en strates épidémiologiques. C'est ainsi qu'il est convenu de diviser l'Afrique au Sud du Sahara en six strates majeures : équatoriale, tropicale, sahélienne, subdésertique, australe et montagnarde. Il faut tenir compte de modulateurs naturels de la transmission (cours d'eau, retenues et salinité, nature des sols) et des modulations induites par l'homme (déforestation, barrages, irrigation, stabulation des bétails, urbanisation et lutte antivectorielle) qui peuvent changer radicalement les conditions de transmission (jusqu'à l'éradication dans certaines îles tropicales ou la réintroduction sur le mode épidémique après arrêt du contrôle) (Bonneville *et al.*, 2006).

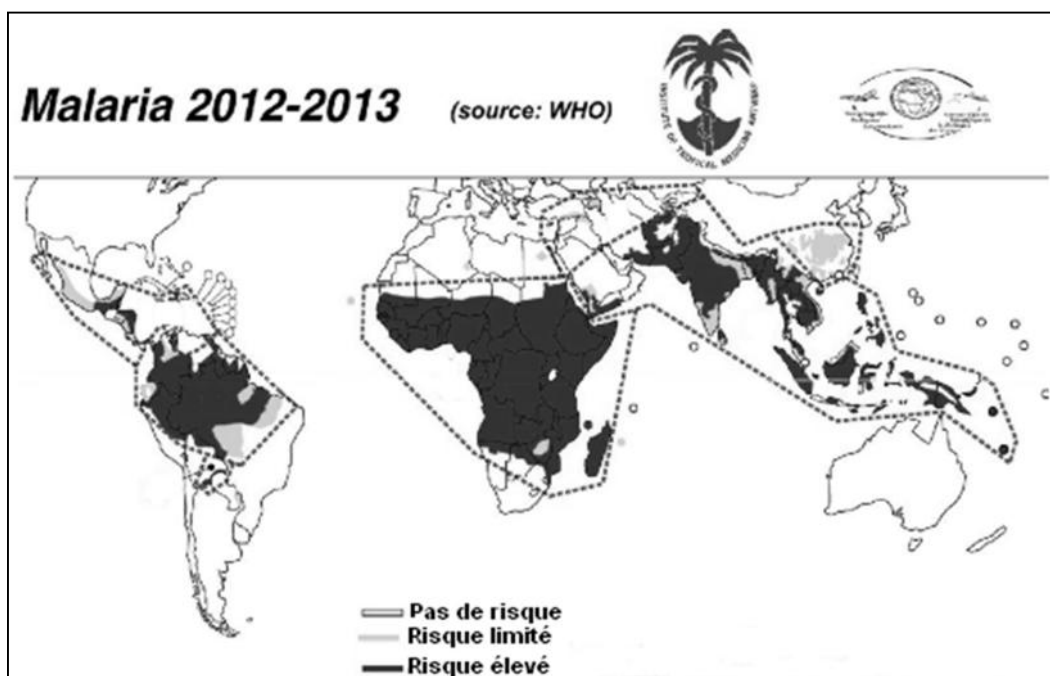


Figure 2: Répartition du paludisme dans le monde (WHO 2014)

2.1.2. Facteurs influençant la transmission du paludisme

L'intensité de la transmission du paludisme est modulée par les interactions entre les humains, les moustiques et le parasite. L'une des possibilités pour évaluer l'importance de la transmission est donc d'essayer de prédire l'abondance vectorielle (Lindsay *et al.*, 1998). L'importance des paramètres climatiques sur le développement des vecteurs est avérée. Swaroop (1949) a montré le lien qui existait entre la température, l'humidité, les précipitations et la durée du cycle de développement des vecteurs. Mouchet *et al.* (2004) ont notamment montré l'importance des gîtes anthropiques (surfaces irriguées, fosses d'emprunt

de terre...) à proximité des lieux de vie des populations. On sait également qu'il existe une température moyenne (20-25°C) et une humidité moyenne de 60 % qui assurent un temps de développement idéal compris entre 9 et 12 jours pour passer de la larve à l'anophèle adulte (Martens *et al.*, 1995). Toutes les variations dans la disponibilité en eau du sol et la température jouent sur la durée des cycles de développement et donc au final sur la densité vectorielle sur une période de temps donné. Le TIE (taux d'inoculation entomologique : nombre de piqûres infectantes par homme par an) serait corrélé avec le taux d'humidité du sol et avec la densité de la végétation. Sogoba *et al.* (2007) ont montré que la variation de la transmission dans le temps et dans l'espace résulte de la variation du contact homme-vecteur à très fine échelle par exemple à l'échelle d'une parcelle agricole.

2.1.3. Vecteurs du paludisme

Les vecteurs du paludisme appartiennent à la grande famille des *Culicidae*. Cette famille compte plusieurs espèces et sous espèces regroupées en trois sous familles: la sous famille des *Toxorhynchitinae*, la sous famille des *Anophelinae* et la sous famille des *Culicinae* (Bruce-Chwatt 1987). Parmi ces sous familles, celle des *Anophelinae* est constituée de 3 genres (*Bironella*, *Chagasia*, *Anopheles*). Le genre *Anopheles* est le plus important sur le plan médical. Dans la famille des *Culicidae*, il existe actuellement 35 genres dont le genre *Anopheles* qui comprend environ 400 espèces classées en 6 sous-genres. Parmi ces espèces, seule une cinquantaine dont *Anopheles gambiae* peut transmettre le paludisme.

En Afrique sub-saharienne, les anophèles du complexe *Anopheles gambiae* sont probablement les plus répandus et sont ceux qui assurent la plus grande partie de la transmission du paludisme en Afrique. La taxonomie divise ce complexe d'espèces en sept espèces morphologiquement identiques, cinq inféodées aux eaux douces et deux aux eaux saumâtres (Figure 3). On distingue d'une part *An. gambiae sensu stricto* (Giles 1902), *An. arabiensis* (Patton 1904), *An. quadriannulatus A* (Theobald 1911), *An. quadriannulatus B* (Hunt 1998) et *An. bwambae* (White 1985) qui sont des espèces d'eau douce et d'autre part *An. melas* (Theobald 1903) et *An. merus* (Doenitz 1902) qui sont les espèces d'eau saumâtre.

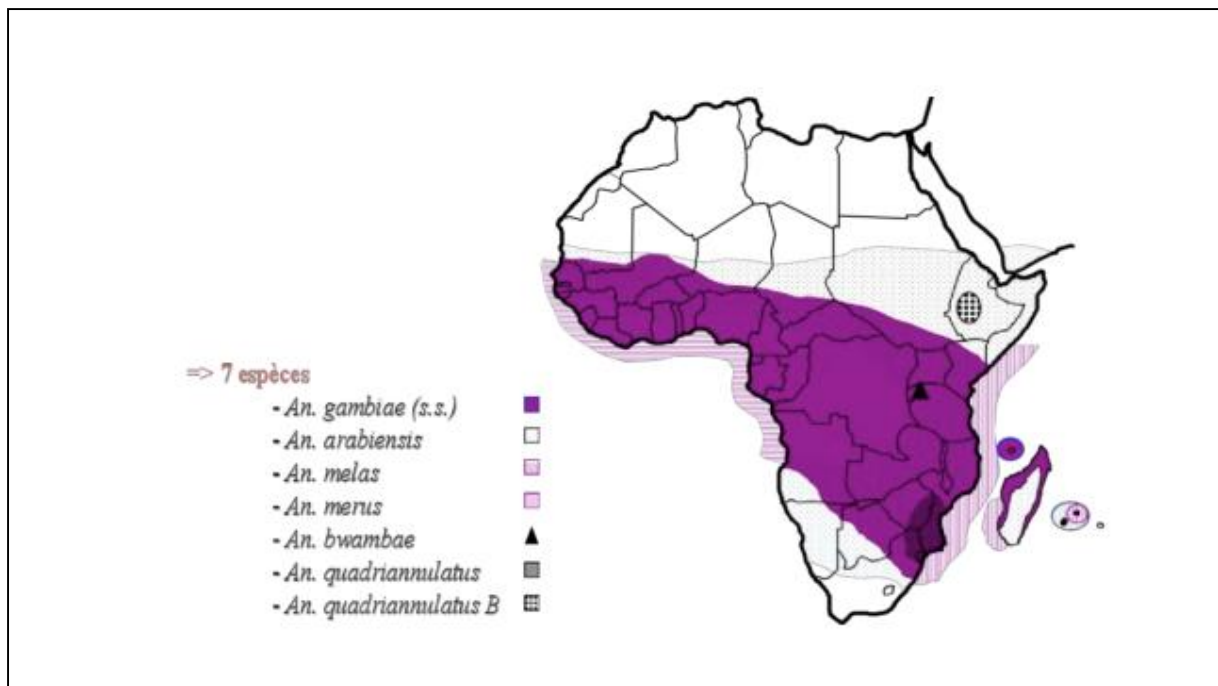


Figure 3: Répartition géographique des espèces du complexe *An. gambiae* (Coluzzi *et al.*, 2002)

Au Bénin, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* appartenant au groupe de *An. gambiae sensu lato* (s.l) sont les principaux vecteurs du paludisme (Akogbeto & Di Deco 1995). *An. gambiae* s.l présente deux formes moléculaires: la forme moléculaire S et la forme moléculaire M (della Torre *et al.*, 2005) qui correspondent respectivement à *Anopheles gambiae* et *Anopheles coluzzii* selon la nouvelle taxonomie (Coetzee *et al.*, 2013). *An. coluzzii* et *An. gambiae* présentent des préférences écologiques différentes (della Torre *et al.*, 2001). Au Bénin, ces deux espèces existent toutes deux du Sud au Nord, mais affichent des fréquences très différentes selon les sites écologiques (Djogbénou *et al.*, 2010). *An. gambiae* s.s vit en sympatrie avec *An. melas* en zone côtière au Sud du Bénin de même qu’avec *An. arabiensis*, qui se retrouve au centre du Bénin à 92% dans Glazoué et Bohicon, puis au Nord du Bénin respectivement à 87%, 47% et 13% dans Parakou, Kandi et Tanguiéta (Djogbénou *et al.*, 2010). Par contre, les captures effectuées dans les quartiers périphériques de Cotonou, en bordure du lac Nokoué et à Abomey-Calavi, un centre périurbain de Cotonou, sont constitués exclusivement de *An. gambiae* s.s (Akogbeto *et al.*, 1992). Les villages de type traditionnel, notamment les villages de pêcheurs dans les zones de cours d’eau saumâtre à Ganvié, sont plus favorables à la multiplication de *An. melas*. Le développement des villes telles que

Cotonou et Porto-Novo vers les périphéries crée de nouveaux gîtes, favorables à *An. gambiae* s.s dont les larves trouvent des conditions de reproduction au détriment de *An. melas*.

2.1.3.1. Biologie des anophèles

- Œufs

Un moustique femelle ne copule qu'une fois dans sa vie. Habituellement, après la copulation, la femelle a besoin d'un repas de sang pour faire mûrir le premier lot d'œufs. Un repas sanguin est généralement pris tous les deux jours, conduisant à la maturation du lot d'œufs suivant.

Une ponte d'anophèle est composée habituellement de 50 à 300 œufs, de forme allongée, chacun ayant 1/2 millimètre de longueur. Les œufs pondus sont de couleur blanche, puis brunissent (Figure 4). Les œufs d'anophèles sont pondus isolément, en vol, à la surface de l'eau (Figure 4), et possèdent généralement deux flotteurs latéraux. L'œuf comprend 3 membranes : la première (interne) entoure le vitellus et l'embryon, la deuxième est l'endochorion qui va durcir peu après la ponte et être colorée (brun foncé), la troisième (externe) est l'exochorion qui présente différentes ornements (Carnevale & Robert 2009).

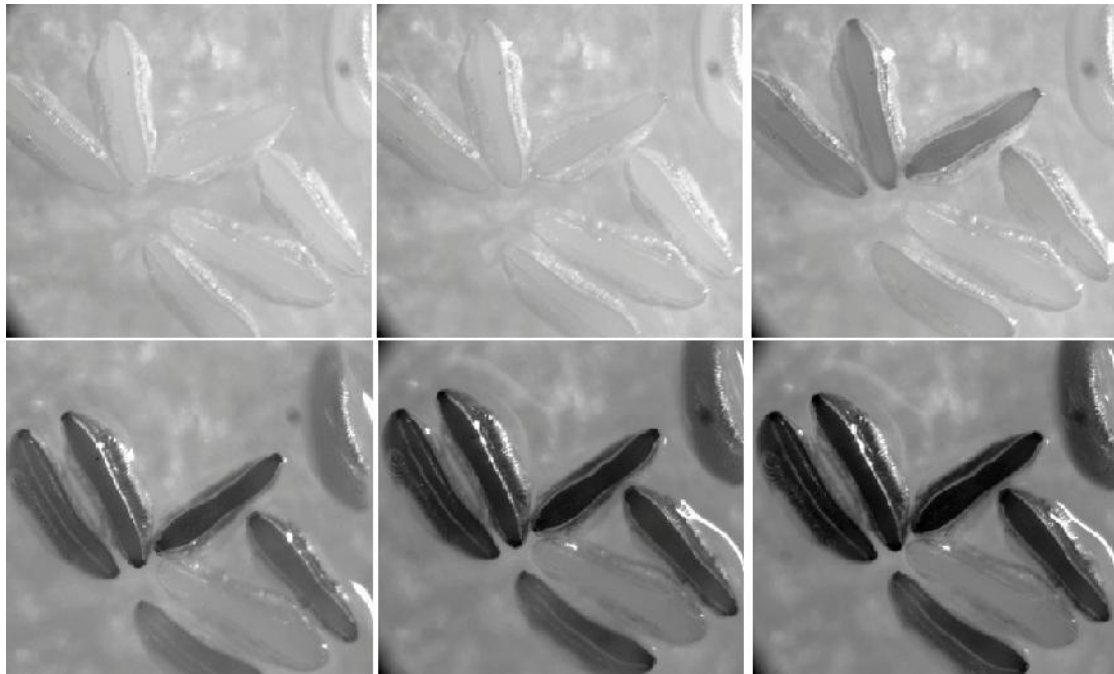


Figure 4: Œuf d'anophèle (MR4 2014)

- Les larves

Les larves d'anophèles se reconnaissent des autres larves d'insectes aquatiques par, entre autres, l'absence de pattes et un thorax relativement gros. La larve se déplace grâce aux mouvements ondulants de son corps. Elle respire par des stigmates dorsaux situés à l'extrémité de l'abdomen; c'est ce qui explique sa position de repos parallèle à la surface de l'eau. Le développement de la larve n'est pas continu.

Au cours de son développement, la larve subit 3 mues et passe ainsi par 4 stades larvaires morphologiquement comparables ; la mue qui survient entre chaque stade permet l'accroissement de la taille de la larve pendant que la nouvelle cuticule durcit. Au stade IV la larve d'anophèle mesure environ 12 à 15 mm (Figure 5).

Les larves d'anophèles sont détritivores; elles se nourrissent des microorganismes présents dans les gîtes larvaires: levures, bactéries. La durée de vie larvaire varie de huit (8) à douze (12) jours dans les conditions favorables (Rodhain & Pérez-Eid 1985).

Morphologiquement, la larve se compose de trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 5).

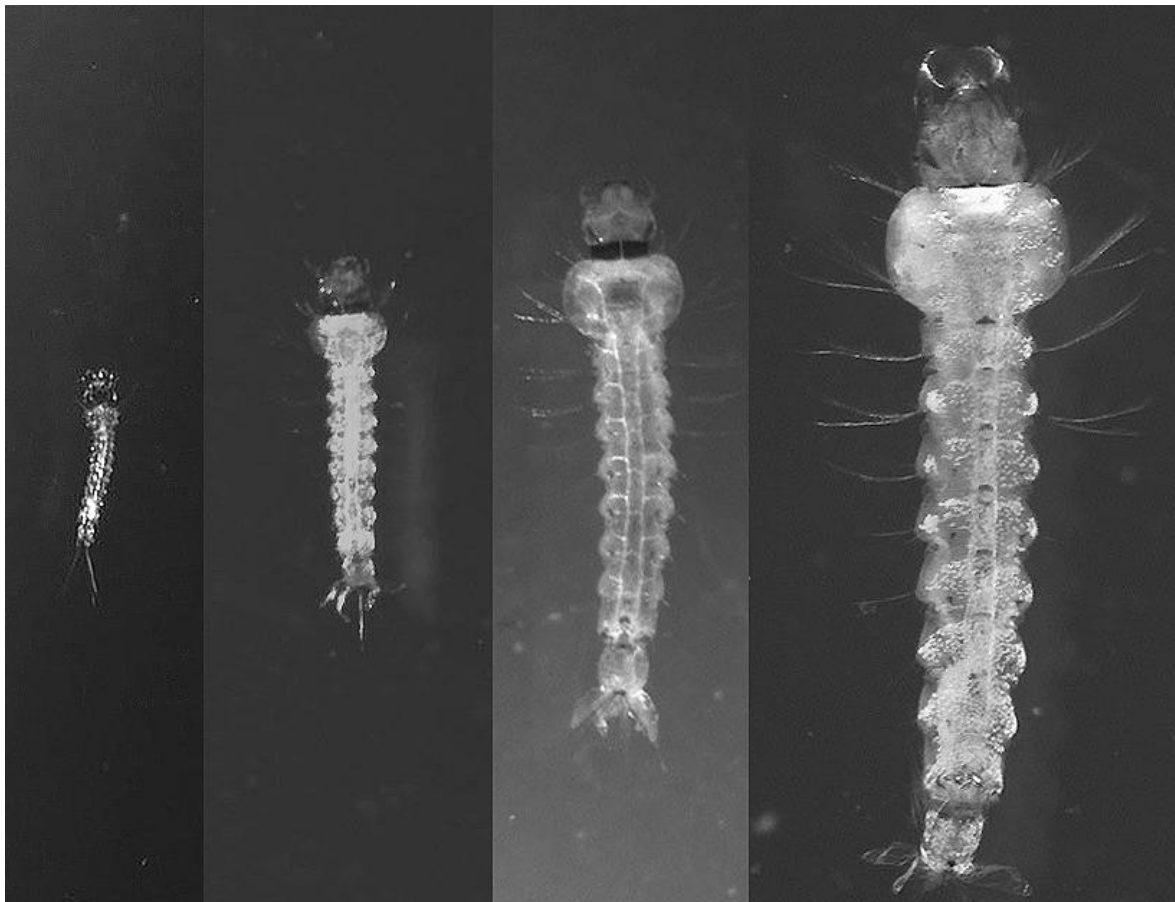


Figure 5: Larves d'anophèle (MR4 2014)

- La nymphe

A la fin de la vie larvaire, survient une métamorphose complète. La cuticule se fend longitudinalement et libère la nymphe qui est formée de deux parties: le céphalothorax et l'abdomen (Figure 6). La nymphe a la forme d'une virgule. La durée de vie de la nymphe est courte, un à deux jours généralement, rarement plus (3 à 5 jours maximum selon la température). La nymphe respire en utilisant l'oxygène de l'air atmosphérique mais ne s'alimente pas (Carnevale & Robert 2009).

La nymphe représente le dernier stade de la vie pré-imaginale, et de la phase aquatique. La nymphe est l'objet de remaniements internes très importants au cours de la métamorphose qui permet la transformation en adulte ailé.



Figure 6: Nymphes d'anophèles à la surface de l'eau (MR4 2014)

- L'adulte ou l'imago

La copulation a lieu aussitôt après que le moustique adulte soit sorti de la pupa. La femelle ne copule généralement qu'une seule fois, parce qu'elle reçoit à cette occasion assez de sperme pour féconder tous les lots d'œufs successifs. Normalement, elle ne prend son premier repas sanguin qu'après la copulation, mais parfois le premier repas sanguin peut être pris par une femelle encore vierge. Le premier lot d'œufs se développe après un ou deux repas sanguins (suivant les espèces), tandis que les lots suivants ne demandent qu'un seul repas de sang.

Les habitudes de nourriture et de repos des moustiques sont d'une grande importance dans les programmes de contrôle et pour cette raison, elles doivent être bien comprises. La plupart des espèces d'anophèles piquent la nuit. Certaines piquent juste après le coucher du soleil, d'autres piquent plus tard aux environs de minuit ou même aux petites heures matinales. Certaines espèces entrent dans les maisons pour piquer (endophages), d'autres préfèrent piquer à l'extérieur (exophages).

Après que le moustique ait pris son repas de sang, il se repose pendant une courte période. Les moustiques qui sont entrés pour piquer se reposent habituellement sur un mur, sous le mobilier ou sur des vêtements pendus dans la maison. Ils sont dits endophiles.

Ceux qui piquent à l'extérieur se reposent habituellement sur des plantes, dans des trous, sur des arbres, sur le sol ou d'autres endroits frais et sombres et sont dits exophiles.

Les préférences trophiques varient suivant les différentes espèces de moustiques. Certaines espèces préfèrent prendre du sang chez l'homme plutôt que chez les animaux, elles sont appelées anthropophiles, tandis que d'autres, qui préfèrent le sang des animaux sont appelées zoophiles. Plus une espèce ou une population a une tendance à la zoophilie, plus son potentiel à transmettre des plasmodies humaines est réduit. L'étude des préférences trophiques (anthropophilie ou zoophilie) est capitale pour évaluer le pouvoir vecteur des populations d'anophèles (Carnevale & Robert 2009). Par exemple *An. funestus* est une espèce généralement connue comme ayant un comportement trophique très spécifique pour l'homme (Gillies & de Meillon 1968).

La vie du moustique est d'une vingtaine de jours en moyenne et elle ne dépasse pas un mois dans les conditions naturelles (Robert 1989).

2.1.3.2. Le complexe *Anopheles gambiae*

Les anophèles sont les seuls moustiques capables d'assurer le cycle sporogonique des Plasmodia humains. Sur les 400 espèces d'anophèles répandues dans le monde, une soixantaine sont des vecteurs du paludisme (Danis *et al.*, 1991). La femelle de la plupart des anophèles prend son repas sanguin sur des animaux à sang chaud, surtout des mammifères, mais certaines espèces piquent exclusivement soit les humains soit les animaux. Le degré d'anthropophilie ou de zoophilie varie en fonction de l'espèce. L'une des raisons pour lesquelles *An. gambiae s.l.* est un excellent vecteur du paludisme est son degré d'anthropophilie élevé (Coluzzi 1993). Plusieurs critères ont été utilisés pour démembrer *An. gambiae s.l.*

Critères biologiques

- capacité vectorielle variable ;
- sensibilité variable aux insecticides ;
- descendance plus ou moins féconde.

Critères cytogénétiques

- inversions visibles sur les chromosomes polythènes.

Critères moléculaires

- essentiellement sur des séquences d'ADNr ;
- et, plus récemment, sur les éléments transposables ;
- 2 espèces d'eau saumâtre, vecteurs côtiers, *An. merus* sur les côtes de l'Afrique de l'Est et *An. melas* sur les côtes de l'Afrique de l'Ouest, du Sénégal à l'Angola ;
- 1'espèce d'eau minérale: *An. bwambae* présent dans la forêt de Semliki, Ouganda, est un bon vecteur mais d'importance très locale ;
- 4 espèces d'eau douce : *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus* A et *An. quadriannulatus* B.

Chez *An. gambiae* s.s., actuellement, on reconnaît 5 formes chromosomiques partiellement panmixtiques (Coluzzi *et al.*, 1979; Coluzzi *et al.*, 2002). En République du Bénin, cinq espèces interviennent dans la transmission du paludisme dont quatre vecteurs majeurs et un vecteur d'importance locale. Il s'agit de :

- *Anopheles gambiae* s.s : il est le plus abondant sur tout le territoire et est constitué de trois cytotypes chromosomiques qui sont *Anopheles gambiae* cytotype forêt (dans la zone méridionale), *Anopheles gambiae* cytotype savane (dans le Zou, le Borgou et l'Atacora) et *Anopheles gambiae* mopti (dans les zones d'inondation et de riziculture du fleuve Niger) ;
- *Anopheles arabiensis* : il vit en sympatrie avec *Anopheles gambiae* s.s dans les quatre départements du Nord.
- *Anopheles melas* : il prédomine dans les zones lagunaires et le long du littoral de l'Océan Atlantique ;
- *Anopheles funestus* : il est présent sur tout le territoire ;
- *Anopheles nili* : il est présent dans certaines régions du Nord et joue un rôle plus modeste dans la transmission (Hamon & Mouchet 1961; Larivière *et al.*, 1987).

2.1.3.3. Gîtes d'anophèles

Un gîte est une collection d'eau naturelle ou artificielle. Il existe plusieurs types de gîtes:

- les gîtes temporaires : ce sont des gîtes pouvant tarir juste après quelques jours de saison sèche ;
- les gîtes semi-permanents : ils peuvent aussi demeurer sans tarir pendant une bonne période de la saison sèche ;
- les gîtes permanents : ce sont des gîtes qui peuvent demeurer pendant toute la saison sèche tels que les puits et les cours d'eau.

Les gîtes larvaires de *Anopheles gambiae* et de *Anopheles arabiensis* sont habituellement des collections d'eau peu profondes, ensoleillées sans ou à faible végétation souvent temporaires. Les trous de terre contenant de l'eau constituent les gîtes larvaires potentiels. Les rizières peu après l'irrigation, constituent d'excellents gîtes larvaires surtout pendant les trois ou quatre semaines qui précèdent et suivent le repiquage du riz.

Lorsque le gîte vieillit, les larves de ces deux espèces disparaissent progressivement. Les gîtes à *Anopheles funestus* sont des collections d'eau claire plus ou moins permanentes caractérisées par la présence d'une végétation dressée. Les gîtes à *Anopheles nili* et *Anopheles moucheti* sont des cours d'eau permanents ou semi-permanents (Bruce-Chwatt 1987).

2.1.3.4. Comportement trophique

L'étude du comportement trophique des anophèles est essentielle pour déterminer leur rôle dans la transmission du Plasmodium et développer ou appliquer des méthodes de lutte adaptées (Oshaghi *et al.*, 2006).

La préférence trophique (anthropophilie versus zoophilie) d'une espèce d'anophèle capable de transmettre le Plasmodium définira son statut de vecteur, une espèce exclusivement zoophile ne présentant aucun risque pour l'homme en termes de transmission.

La préférence trophique n'est cependant pas l'unique facteur dirigeant le choix d'une femelle à la recherche d'un hôte, son comportement préférentiel pourra en effet être contraint par des facteurs exogènes tels que la disponibilité des hôtes, les conditions climatiques ou le biotope.

La majorité des vecteurs de paludisme piquent la nuit. La distribution de l'agressivité varie selon les espèces, l'âge physiologique, le lieu et la saison. Par ailleurs, certains vecteurs piquent préférentiellement à l'intérieur des maisons (endophagie) tandis que d'autres piquent préférentiellement à l'extérieur (exophagie) (Oshaghi *et al.*, 2006; Adja *et al.*, 2015).

Après le repas sanguin, certains vecteurs restent dans la maison durant toute la phase de repos du cycle gonotrophique ; on parle alors de vecteurs "endophiles". A l'inverse, d'autres vecteurs quittent la maison où ils ont pris le repas sanguin pour trouver un lieu de repos à l'extérieur, ceux-ci sont dits "exophiles" (Oshaghi *et al.*, 2006; Adja *et al.*, 2015).

2.2. La lutte contre les vecteurs du paludisme

La lutte antivectorielle est une composante clé dans les stratégies de prévention des maladies à transmission vectorielle notamment le paludisme. Elle vise à rompre la chaîne de transmission du parasite entre le moustique et l'homme tout en respectant l'environnement.

En matière de politique de lutte antivectorielle, le choix du Bénin repose sur la lutte contre les moustiques adultes et la lutte contre les larves. Ce choix vise la réduction de la transmission du paludisme par : la protection individuelle (utilisation des Moustiquaires imprégnées) ; la protection collective par la Pulvérisation Intradomiciliaire (PID) d'insecticide à effet rémanent, le traitement aux biolarvicides des gîtes de moustiques et la réduction des gîtes larvaires par l'assainissement du milieu (PNLP 2006).

2.2.1. La Pulvérisation Intradomiciliaire (PID) d'insecticide à effet rémanent

La Pulvérisation Intradomiciliaire (PID) d'insecticide à effet rémanent est l'un des principaux outils de lutte antivectorielle actuellement utilisés contre le paludisme. Elle est recommandée par l'OMS dans des zones de transmission faible et modérée (Pluess *et al.*, 1996). Cette stratégie de lutte vise la réduction des densités de moustiques agressifs et de la longévité des femelles. Les pulvérisations ne sont efficaces que pour lutter contre les vecteurs qui préfèrent se poser à l'intérieur des habitations (moustiques endophiles). Les pulvérisations d'insecticide à effet rémanent dans les habitations sont essentiellement protectrices par l'effet insecticide de masse et l'effet dissuasif. L'insecticide et sa formulation sont choisis en fonction de la sensibilité des vecteurs locaux, du support (nature des surfaces traitées) et de la rémanence souhaitée du produit, et ce, par rapport à la durée de la période de transmission (Pluess *et al.*, 1996).

2.2.2. Les Moustiquaires imprégnées d'insecticide

Les moustiquaires interviennent dans le cadre de la réduction du contact homme-vecteur. Si les moustiquaires sont utilisées depuis des temps immémoriaux, ce n'est que depuis un quart de siècle seulement que cette mesure de protection est reconnue comme un véritable moyen de lutte contre les moustiques (Lengeler 2004).

La moustiquaire non imprégnée en bon état représente en elle-même une barrière physique normalement infranchissable. Mais cette protection mécanique est altérée dès qu'elle est mal bordée, trouée ou plus fréquemment, lorsqu'une partie du corps touche le voilage permettant ainsi aux moustiques de piquer à travers les mailles (Darriet 2007).

Les méthodes modernes de lutte antivectorielle préconisent l'usage de la moustiquaire imprégnée d'insecticide. Les moustiquaires imprégnées avec un insecticide rémanent protègent l'utilisateur d'une barrière chimique qui renforce la barrière physique (Darriet 2007). Les différents pyréthrinoïdes utilisés pour les imprégnations de moustiquaires

induisent une dynamique nouvelle des populations de moustiques au pourtour et à l'intérieur des maisons (Darriet *et al.*, 1998). Les pyréthrinoïdes ont plusieurs effets simultanés (Darriet 1991). Par leur effet excito-répulsif, ils repoussent les moustiques au contact de la moustiquaire en les éloignant ainsi du dormeur. Les microparticules d'insecticide en suspension dans l'air les repoussent à distance (effet dissuasif). L'insecticide par son effet irritatif empêche les moustiques de rester posés sur la moustiquaire à la recherche d'un orifice pour y pénétrer ou d'une partie du corps en contact avec le voilage. L'insecticide a une action de choc (Knock down) qui les tue ou les neutralise immédiatement avant même qu'ils n'aient pu piquer le dormeur. Lorsque les moustiques sont restés suffisamment à son contact, l'insecticide peut enfin les tuer dans un délai plus ou moins long (effet insecticide). Quel que soit l'endroit choisi pour dormir (à l'intérieur ou l'extérieur d'une habitation), l'utilisation d'une Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide (MII) protège son utilisateur. Le double effet, insecticide et excito-répulsif des MII, entraîne une diminution du nombre de moustiques dans les chambres où elles sont installées, et confère donc une protection partielle à l'utilisateur lorsqu'il sort de sa moustiquaire ou aux personnes dormant sans moustiquaire dans la même pièce (Darriet 2007). Lorsqu'une proportion importante d'une population humaine dort sous des moustiquaires imprégnées d'insecticide, les anophèles cherchant à les piquer sont fortement exposés à l'insecticide et ont une durée de vie diminuée. La transmission des plasmodies peut alors être diminuée pour l'ensemble de la communauté humaine; il s'agit de l'effet de masse (Darriet 2007). La mise au point de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action a permis de s'affranchir des contraintes de réimprégnation pour les programmes de lutte. Ces moustiquaires sont recommandées par l'OMS (WHO 2006).

-Moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action

Les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MIILD) sont des moustiquaires dont l'insecticide d'imprégnation est incorporé dans les fibres soit par fusion dans des fibres polyéthylènes lors du tissage (cas des OlysetNet®) ou par enrobage à température relativement basse pendant la confection des fibres polyester (cas des PermaNet®) (WHO 2008). Ces moustiquaires ont des fibres qui contiennent des molécules d'insecticide qui remontent progressivement à la surface des fibres et qui seront graduellement disponibles afin de lutter contre les moustiques adultes (Rouy 2010). Les moustiquaires imprégnées ont montré leur efficacité en Afrique Sub-saharienne (Carnevale *et al.*, 1988). Comparées aux moustiquaires imprégnées localement, les MIILD offrent une durée d'efficacité plus grande de 3 à 4 ans. L'efficacité de la moustiquaire imprégnée se limite à une protection individuelle lorsque son effet se fait sentir au niveau de la personne ou de la cellule

familiale. Lorsque les moustiquaires traitées sont distribuées dans un ou plusieurs villages avec un taux de couverture supérieur à 80 %, les effets de l'insecticide agissent à l'intérieur de toutes les habitations.

- La moustiquaire Olyset

Olyset Net® est une moustiquaire en polyéthylène très robuste développée par Sumitomo Chemical Co Ltd (Japon), dans laquelle l'insecticide (perméthrine utilisée à la concentration de 2 %, soit environ 900mg/m²) est incorporé par fusion dans une fibre composée de résine polyéthylène (Sumitomo chemical 2012). Par rapport à une imprégnation par trempage où le produit est simplement déposé sur les fibres, le processus de fabrication des Olyset Net® intègre l'insecticide dans le support au moment de sa polymérisation. Comme l'incorporation de l'insecticide dans le substrat est réalisée à de fortes températures, seule la perméthrine, parmi tous les composés pyréthrinoïdes actuels, supporte un tel procédé sans que sa molécule en soit altérée. Selon le fabricant, ces moustiquaires auraient une durée d'efficacité de trois ans. La taille des mailles d'Olyset est plus grande que la moyenne ce qui améliore la ventilation ; la pénétration par les moustiques est très rare (Sumitomo chemical 2012).

- L'insecticide utilisé par Olyset: la Perméthrine

Les moustiquaires Olyset utilisent l'insecticide perméthrine, qui est un pyréthrinoïde de la seconde génération. La perméthrine est un pesticide non cumulatif à large spectre et une neurotoxine à action rapide par bon contact, à action limitée par ingestion et sans action fumigante. Elle est modérément stable dans l'environnement et possède une bonne action résiduelle sur les surfaces inertes. La perméthrine n'est pas systémique chez les plantes ; de faible toxicité mammalienne et facilement métabolisée avec perte immédiate de toxicité (Sumitomo chemical 2012).

Le choix de la perméthrine a eu lieu car elle possède une forte marge d'innocuité, exhibant une faible toxicité pour les mammifères, avec une forte activité sur les insectes. La perméthrine possède des décennies d'utilisation réussie dans des applications de santé publique, y compris des applications cutanées humaines approuvées sur le plan médical, du type lotions et shampooings contre les poux. Olyset diffère des autres MIILD sur le marché, pour lesquelles l'insecticide est « collé » à la surface extérieure de leurs fibres ; à la suite de quoi la quantité d'insecticide disponible diminue au fur et à mesure des manipulations, de l'usage et des lavages jusqu'à ce qu'il n'en reste plus du tout. Les chercheurs scientifiques de Sumitomo Chemical ont pris une approche totalement différente pour le traitement de la moustiquaire, en décidant d'incorporer l'insecticide à l'intérieur même des fibres et de développer une technologie permettant sa migration à la surface des fibres au cours d'une

période prolongée. De la perméthrine sous forme liquide, ainsi que des agents spéciaux de contrôle de sa libération, sont incorporés à l'intérieur de la matrice brute de polyéthylène. Ceci est alors extrudé en fibres monofilamentaires à partir desquelles les moustiquaires sont fabriquées par la suite. L'ingrédient actif est libéré progressivement à la surface de la fibre au cours du temps et la concentration en surface atteint le point d'équilibre, de telle sorte que lors de l'élimination de l'insecticide de la fibre en cours de lavage, la concentration à la surface est remplacée directement par le réservoir interne de la fibre. La concentration en surface est conservée à un niveau suffisant pour une activité biologique anti-moustiques (Sumitomo chemical 2012).

- Technique de dosage de la perméthrine par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est, comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules (Futura-Sciences 2013).

2.2.3. La lutte contre les larves

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

Parmi les méthodes physiques, on peut citer l'ensemble des aménagements de l'environnement tels que le drainage ou le remplissage des gîtes.

La seule méthode biologique de lutte anti-larvaire impliquant des prédateurs ayant réellement prouvé son efficacité est l'utilisation de poissons larvivores. Ces poissons (*Oreochromus spilurus*; *Poecilia reticulata*; *Gambusia affinis*) qui se nourrissent des larves de culicidés, sont introduits dans les gîtes larvaires en concentrations variables. L'utilisation de ces poissons a localement permis la réduction des densités de nombreuses espèces d'anophèles (Dixit *et al.*,

1981; Koldenkova *et al.*, 1988; Das & Prasad 1991; Prasad *et al.*, 1993; Ghosh *et al.*, 2005; Tilak *et al.*, 2007; Van Dam & Walton 2007). Cette méthode est cependant soumise à une bonne connaissance des gîtes (nombre, localisation) et à l'adaptation des poissons à ceux-ci. L'utilisation de ces poissons larvivores est très limitée dans les gîtes temporaires qui nécessitent des réensemencements réguliers (Carnevale & Robert 2009).

Des larvicides chimiques sont depuis longtemps utilisés en lutte antivectorielle. Ils doivent être épandus dans les gîtes larvaires. Les produits actuellement recommandés sont des insecticides organophosphorés (Chlorpyrifos, Fenthion, Temephos...), des régulateurs de croissance (Pyriproxifen, Diflubenzuron, Novaluron) ou d'autres insecticides tels que le Spinosad (toxines bactériennes) (WHO 2006). Etant donné la forte pression de sélection exercée par ces insecticides sur les stades larvaires des vecteurs, il n'est pas recommandé de les utiliser simultanément pour lutter contre les adultes.

Les biolarvicides sont des bactéries produisant une endotoxine mortelle par ingestion pour les larves de culicidae, simuliidae et chironomidae. Deux espèces de bactéries, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*, sont ainsi utilisées de la même manière que des larvicides chimiques (WHO 2006).

2.3. Résistance des vecteurs aux insecticides

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec leur cible biologique présente chez l'insecte. La molécule d'insecticide doit entrer en contact avec l'insecte, pénétrer son organisme et dans certains cas être transformée en métabolite actif qui sera transporté jusqu'à sa cible. Tout mécanisme biochimique capable de modifier l'une de ces différentes étapes peut donc conduire à une résistance (Bloomquist & Soderlund 1988). Cette résistance peut impliquer une modification du comportement de l'insecte qui évite ainsi le contact avec l'insecticide, une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, une modification des voies métaboliques permettant sa dégradation ou enfin une modification de sa cible. Les résistances aux deux principales familles d'insecticides (organophosphorés et pyréthrinaïdes) utilisées dans la lutte contre le paludisme sont de deux types : résistance métabolique et résistance par modification de cible (Bloomquist & Soderlund 1988).

2.3.1. Résistance comportementale

Une modification du comportement en réponse à l'exposition aux insecticides peut conduire à une meilleure survie des insectes. L'insecte irrité par l'insecticide, s'envole plus ou moins rapidement des surfaces traitées. Même si l'hyper-irritabilité peut ralentir l'apparition de

populations résistantes, elle diminue néanmoins l'efficacité des traitements insecticides (Hamon 1963). Une étude a montré que certaines mouches domestiques évitaient le contact avec le matériel contaminé par des insecticides (Hayes & Wolf 1990). Des pulvérisations répétées d'insecticides à l'intérieur des habitats (Indoor Residual Spraying ou IRS) en Thaïlande pourraient avoir transformé le régime endophile et anthropophile des femelles du moustique *Anopheles minimus* vers un régime plus exophile et zoophile (Green *et al.*, 1990). Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste relativement difficile à étudier et peu d'études sont disponibles.

2.3.2. Résistance cuticulaire

Elle désigne toute modification chimique de la cuticule de l'insecte entraînant une réduction de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme aboutissant à une meilleure survie des individus. La cuticule est un milieu biologique complexe ayant des propriétés physico-chimiques particulières, notamment une très forte lipophilie. Ces caractéristiques en font un acteur potentiellement important de la résistance aux insecticides chimiques, car les molécules utilisées sont souvent très hydrophobes et agissent par contact. Des cas de résistance cuticulaire ont été rapportés dans des souches de *Musca domestica* et de moustiques du genre *Culex* (Apperson & Georgiou 1975). Plus récemment, la surtranscription des gènes cuticulaires dans une souche de *An. gambiae s.l* suggère leur rôle potentiel dans la résistance de cette souche aux pyréthrinoides (Awolola *et al.*, 2009). Dans une autre étude, des mesures par microscopie à balayage électronique ont montré une plus grande épaisseur de cuticule chez une souche de *An. funestus* résistante aux pyréthrinoides comparée à une souche sensible (Wood *et al.*, 2010). Seul, ce mécanisme offre des niveaux de résistance faible comparé aux autres mécanismes physiologiques mais combiné à des mécanismes de détoxication, il est susceptible de générer des niveaux de résistance beaucoup plus importants (résistance multiplicative). Ainsi, il a été suggéré que ce phénomène pouvait être impliqué et agir de concert avec une augmentation de la résistance métabolique chez des moustiques du genre *Anopheles* résistants aux pyréthrinoides (Djouaka *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2008; Ingham *et al.*, 2014)

2.3.3. Résistance par modification des cibles

Une modification de la conformation de la protéine cible de l'insecticide peut diminuer la capacité de fixation de ce dernier et donc son effet. Elle s'explique par la substitution d'un ou de plusieurs acide(s) aminé(s) dans la séquence protéique de la protéine cible suite à une mutation non synonyme (Ffrench-Constant *et al.*, 2004). Trois cibles principales, au niveau du

système nerveux, sont décrites dans la littérature : les mutations de l'acétylcholinestérase (AChE), du récepteur GABA et du canal sodium voltage dépendant. Dans la plupart des cas, le site conférant la résistance à une ou plusieurs familles d'insecticides est conservé chez un grand nombre d'espèces non apparentées (Ffrench-Constant *et al.*, 1998; Ffrench-Constant *et al.*, 2004).

- Modification de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase, codée par le gène Ace-1, est la cible des insecticides de type organophosphorés (OP) et carbamates. Ces insecticides se fixent sur l'enzyme qui n'est alors plus capable de dégrader l'acétylcholine inter-synaptique. Le signal transmis par le neurotransmetteur sur son récepteur n'est plus interrompu, ce qui conduit à une hyperexcitation post-synaptique et à la mort de l'insecte. Plusieurs mutations (mutations Ace-1) sur ce gène telles que G119S ont été retrouvées chez de nombreux moustiques tels que *Culex pipiens* (Raymond *et al.*, 1985 1986; Bonning & Hemingway 1991), *Culex quinquefasciatus* (Bisset *et al.*, 1990), *Culex tritaeniorhynchus* (Takahashi & Yasutomi 1987), *An. albimanus* (Ayad & Georgiou 1975) et *An. gambiae s.l* (Weill *et al.*, 2003) leur conférant une résistance accrue aux OPs et aux carbamates.

- Modification du récepteur GABA

Le récepteur à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) codé par le gène rdl est la cible des cyclodiènes, de certains organochlorés (lindane) et des phénylpyrazoles (Fipronil). La fixation du GABA sur son récepteur régule le passage des ions chlorures à travers la membrane synaptique. Les cyclodiènes en se fixant sur le récepteur au GABA, bloquent le passage des ions chlorures, entraînant une hyperexcitation suivie de la mort de l'insecte. Une mutation sur le gène rdl entraînant la substitution de l'alanine en serine en position 302 (Ffrench-Constant *et al.*, 1993) ou glycine (Hosie *et al.*, 1997) conduit à une meilleure résistance aux cyclodiènes (Bass *et al.* 2004). Cette mutation (mutation rdl) a été retrouvée entre autre chez les moustiques *Ae. aegypti* (Thompson *et al.*, 1993), *An. gambiae s.l* (Brooke *et al.*, 2006) et la mouche domestique *M. domestica* (Anthony *et al.*, 1991).

- Modification du canal à sodium voltage dépendant

Le canal à sodium voltage dépendant est la cible des pyréthrinoïdes et de l'organochloré DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT). La fixation de l'insecticide sur le canal entraîne son ouverture et une hyperexcitation neuronale se traduisant par un phénomène de paralysie de l'insecte (effet knock down) qui peut conduire à sa mort. Chez les moustiques, plusieurs mutations de ce gène (mutations Kdr pour Knock down resistance) telles que L1014P et L1014S dans le segment S6 du domaine II de la protéine confèrent une résistance accrue aux

pyréthrinoïdes. En Afrique de l'ouest, la mutation L1014P est fréquemment retrouvée dans les populations de *An. gambiae s.l* (Martinez-Torres *et al.*, 1998) alors que l'autre mutation sera plus fréquente chez les populations d'Afrique de l'est et de *Cx. pipiens* en Chine (Martinez-Torres *et al.*, 1999; Hemingway & Ranson 2000). En Ouganda de l'est, la mutation L1014S a été retrouvée chez une souche de *An. gambiae s.l* résistante au DDT et aux pyrethrinoïdes (Ramphul *et al.*, 2009). D'autres mutations Kdr ont été identifiées chez les moustiques ainsi que chez d'autres insectes (Jamroz *et al.*, 1998; Schuler *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000).

2.3.4. Résistance métabolique

La résistance métabolique se traduit par une augmentation du métabolisme des insecticides, généralement par des familles d'enzymes à large spectre de substrats. Ces enzymes dites de détoxification sont présentes dans l'ensemble du règne animal et végétal (Hemingway *et al.*, 2004).

L'augmentation du métabolisme des insecticides peut être due soit à une augmentation de la production d'une ou de plusieurs enzymes de détoxification existante soit à un meilleur métabolisme de l'insecticide suite à une mutation d'une ou de plusieurs enzymes. Ce phénomène se traduit par une diminution de la quantité d'insecticide atteignant la cible et donc à une augmentation de la tolérance de l'insecte. Chez les moustiques, trois grandes familles d'enzymes de détoxification ont été fréquemment impliquées dans la résistance aux insecticides: Les monooxygénases à cytochrome P450 (CYPs), les glutathion S-transférases (GSTs) et les carboxylestérases (COEs) (Hemingway *et al.*, 2004).

2.3.5. Impact de la résistance sur le paludisme

La résistance des moustiques aux insecticides a de grandes conséquences sur les stratégies de lutte antivectorielle. Si la résistance aux insecticides aboutit à un échec généralisé des insecticides, les conséquences pour la santé publique seraient catastrophiques et une grande partie des progrès enregistrés pour diminuer le fardeau du paludisme pourrait être réduite à néant (WHO 2012).

On estime par exemple qu'avec leur couverture actuelle, les MIILD et les PID ont permis d'éviter chaque année 220 000 décès d'enfants de moins de 5 ans dans la Région OMS de l'Afrique. Si les insecticides venaient à perdre l'essentiel de leur efficacité, plus de 55% des résultats de la lutte antivectorielle disparaîtraient, ce qui aboutirait à environ 120 000 décès par an (WHO 2012).

Si l'on parvenait à une couverture universelle de la lutte antivectorielle, un tel niveau de résistance aux insecticides serait encore plus dommageable en cas d'échec des insecticides: on

recenserait alors chaque année environ 260 000 décès d'enfants de moins de 5 ans (WHO 2012).

A ce jour, la communauté du paludisme a encore la possibilité d'agir et de veiller à ce que les interventions antivectorielles continuent d'être une composante essentielle de la lutte antipaludique ; et ce, en amenant les pays endémiques vers la couverture universelle par le biais d'actions intensifiées et pérennes visant à l'élimination du paludisme (WHO 2012).

2.3.6 Gestion de la résistance

Des stratégies pour préserver l'efficacité des insecticides ont déjà été utilisées dans le secteur de la santé publique et de l'agriculture ; il n'y a pas de formule magique pour diminuer la résistance mais il existe plusieurs approches, dont l'intérêt a été prouvé, qui peuvent retarder sa propagation, au moins jusqu'à ce que de nouvelles classes d'insecticides et de nouveaux outils soient disponibles (WHO 2012).

En gardant à l'esprit l'impact potentiel sur le fardeau du paludisme, des mesures peuvent et doivent être prises immédiatement. La gestion de la résistance, avec l'objectif de préserver ou de prolonger la sensibilité des vecteurs du paludisme aux insecticides afin de maintenir l'efficacité des interventions antivectorielles, n'est pas une idée nouvelle ; elle a été appliquée avec succès au cours du vingtième siècle dans le secteur de l'agriculture et celui de la santé publique (par exemple dans le cadre du Programme de lutte contre l'onchocercose dans les années 1980). L'exposition prolongée à un insecticide donné finissant par aboutir à une résistance à ce produit, il est nécessaire que des stratégies de gestion de la résistance aux insecticides associées à une utilisation judicieuse des insecticides soient mises en place pour tout programme utilisant ces produits (WHO 2012).

Il existe plusieurs méthodes de gestion de la résistance aux insecticides pour la lutte antivectorielle, reposant sur l'utilisation des PID et des MIILD : la rotation d'insecticides, les combinaisons de plusieurs interventions et les pulvérisations en mosaïques. Mais les approches futures pourraient associer plusieurs composants de différents insecticides.

Dans certaines situations, l'organisation des interventions peut être réalisée dans le cadre plus large de la gestion intégrée des vecteurs. Ces méthodes peuvent avoir plusieurs effets sur les populations vectorielles résistantes, notamment retarder l'apparition de la résistance en enlevant la pression sélective (alternance par exemple) ou tuer les vecteurs résistants en les exposant à de multiples insecticides (mélanges par exemple) (WHO 2012).

Chapitre 2 :

Matériels et Méthodes

Les études ont été entièrement réalisées au Bénin où plusieurs sites représentant différentes zones géographiques ont été sélectionnés (Figure 7). C'est ce qui justifie la description sommaire du Bénin dans les paragraphes ci-dessous avant la description détaillée des zones d'évaluation de la transmission du paludisme et de la durabilité des moustiquaires.

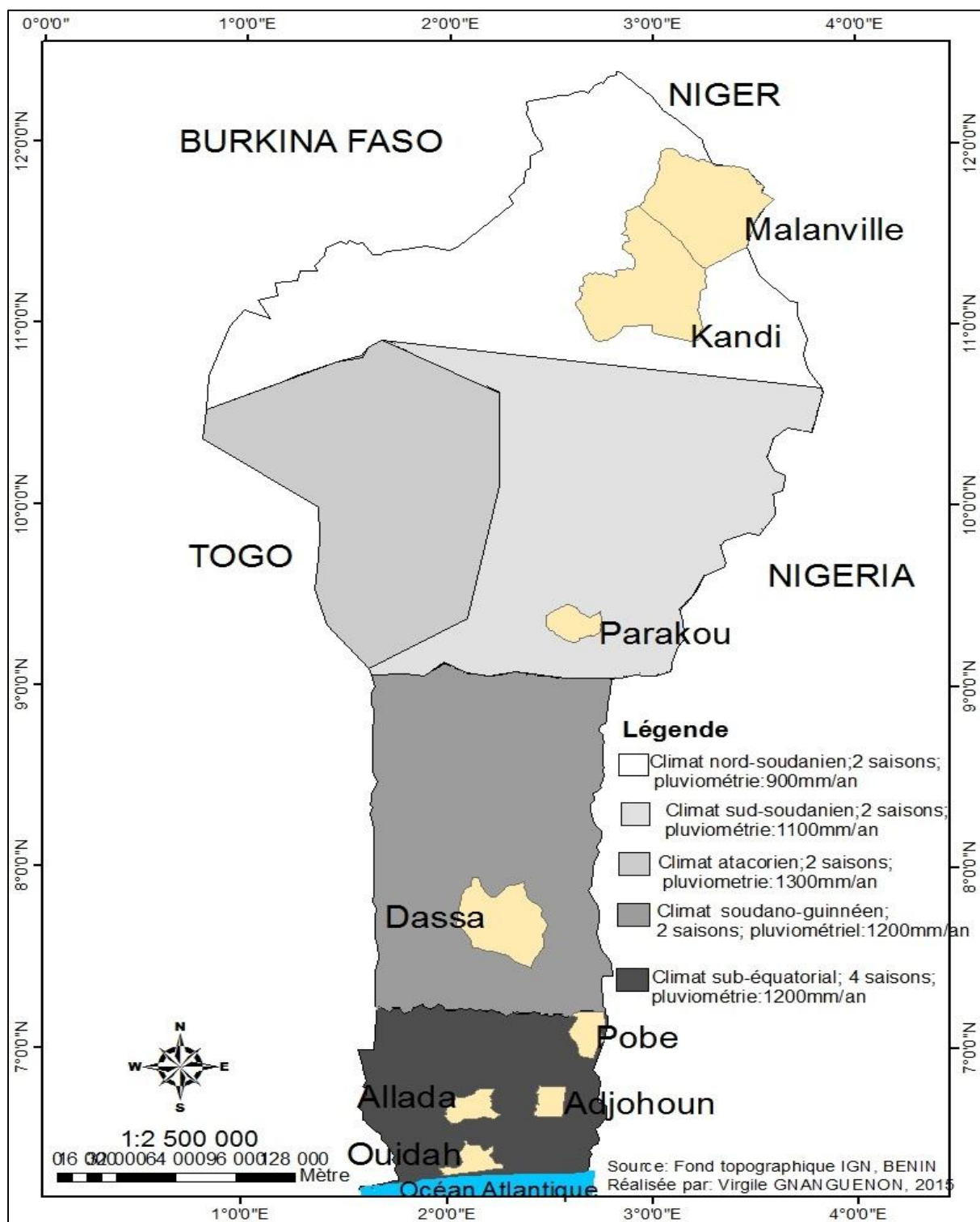


Figure 1: Distribution géographique des sites d'étude

1. Cadre d'étude

Etat d'Afrique de l'Ouest ayant une superficie de 114763 km², le Bénin est situé en bordure du Golfe de Guinée, face à l'Océan Atlantique. Compris entre le Togo à l'Ouest, et le Nigeria à l'Est, le Bénin est bordé par le Burkina-Faso et le Niger au Nord. De forme allongée, il s'étend du Sud au Nord dans la zone intertropicale (entre l'équateur et le tropique du Cancer) sur une longueur de 700 km; la largeur varie de 125 Km (le long de la côte) à 325 Km (à la latitude Tanguiéta-Ségbana).

Le relief du Bénin ne présente pas de grandes dénivellations : on dit qu'il est peu accidenté. La seule région accidentée qui est située au Nord-Ouest, est la chaîne de l'Atacora dépassant 400m. L'ensemble est constitué par quatre formes principales de relief à savoir : la plaine côtière, les plateaux, la pénéplaine cristalline et la chaîne de l'Atacora.

Le Bénin possède plusieurs fleuves dont les plus importants sont la Pendjari au Nord-Ouest (380 km), le Couffo au Sud-Est (170 km), l'Ouémé au Centre et au Sud (150 km), le Niger au Nord et au Nord-Est et enfin, le Mono à l'Ouest (100 km). Certains de ces fleuves ont d'importants affluents. Il s'agit du Niger avec le Mékrou (410 km), l'Alibori (338) et la Sota (250 km), et l'Ouémé avec le Zou (150 km). La population béninoise est estimée en 2013 à 9983884 habitants, contre 6769914 habitants en 2002, soit un taux annuel d'accroissement intercensitaire de 3,5% (INSAE 2013).

1.1. Végétation et climat du Bénin

1.1.1. Zones de forêts dégradées à climat subéquatorial

Sous le climat subéquatorial constitué de deux saisons de pluies et deux saisons sèches intercalées, on observe trois groupes d'écosystèmes à savoir : les écosystèmes de la plaine littorale, les écosystèmes des plateaux de terre de barre et les écosystèmes de la dépression argileuse de la Lama.

Dans la plaine côtière, on distingue les formations des sols bien drainés constituées soit de stades avancés de colonisation des cordons, soit de stades de dégradation d'une ancienne forêt littorale et des formations des zones humides représentées par la forêt mangrove et la forêt marécageuse. Il faut souligner que ces formations forestières sont, après dégradation, remplacées par des prairies marécageuses. Cette zone est représentée dans notre étude par les communes de Ouidah, d'Adjohoun et de Dangbo (Akomagni & Guidibi 2006; Capo-Chichi & Guidibi 2006b; Tchegnon & Guidibi 2006).

La formation que l'on retrouve au niveau des plateaux de barre est la forêt dense humide semi-décidue dont on trouve les vestiges sous forme de lambeaux : forêt de réserve botanique

de Pobè, les forêts sacrées ou forêts reliques de toutes tailles et de toutes les formes disséminées dans la région. Cette forêt a été détruite sous la pression humaine et remplacée par des cultures pérennes (agrumes, palmiers à huile, tecks) ou par des cultures vivrières. Le site sélectionné dans cette zone est la commune de Pobè (Gassi & Guidibi 2006).

La dépression argileuse de la Lama est un vertisol abritant une végétation particulière. Les plantes sont adaptées à la contrainte édaphique de la Lama. La dépression est prise d'assaut par les cultures vivrières sous la poussée démographique. Il reste environ 16000 ha de la forêt classée de la Lama, conservée plus ou moins intacte jusqu'en 1996 où elle a été inventoriée. La commune d'Allada représente le site sélectionné dans cette zone (Nangbe & Guidibi 2006).

1.1.2. Zone de savanes à climat soudano-guinéen ou zone de transition

Elle couvre la région au Nord du domaine subéquatorial jusqu'à la latitude de Bembèrèkè. Les passages du soleil au zénith sont déjà plus rapprochés et la petite saison sèche est à peine sensible. Les températures sont plus élevées avec une amplitude thermique journalière pouvant atteindre 10°C. Il y a deux saisons. On y rencontre des savanes arborées. La strate herbacée est dominée par les grandes andropogonées qui servent de combustibles aux feux de brousse de saison sèche. Aux endroits rocheux dominés par les affleurements granitiques, on note une végétation saxicole très localisée à la seule gymnosperme du Bénin. Dans cette zone, on rencontre des sols bien drainés, des sols hydromorphes et des sols sur cuirasses ou roches peu profondes. On y rencontre également des cultures vivrières, la culture du coton et de l'arachide. Le site représentant cette zone dans notre étude est la commune de Dassa (Capo-Chichi & Guidibi 2006a).

1.1.3. Zone de savanes à climat soudanien ou zone de savane soudanienne

Cette zone s'étend du 9^e parallèle Nord à 12°30N à la frontière avec le fleuve Niger. Les amplitudes thermiques journalières sont plus fortes, surtout pendant l'harmattan. L'année se partage en deux saisons bien tranchées : une saison sèche de Novembre à début mai et une saison pluvieuse de mai à Octobre.

Dans la partie Sud (Climat Sud-soudanien), la végétation est composée de savane analogue à celle de la zone de transition. La végétation herbacée est dense dans les parties arbustives. Cette partie est représentée dans notre étude par la commune de Parakou (Kora & Guidibi 2006).

Dans la partie Nord (Climat Nord-soudanien), on constate la diminution de la taille des espèces ligneuses. La composition floristique a connu un changement. Cette zone subit l'influence de l'harmattan.

C'est aussi la zone des acacias qui constituent des arbres en peuplement clairsemé au bord des dépressions. Les communes de Kandi et de Malanville représentent les sites sélectionnés dans cette région du Bénin (Ahoyo & Guidibi 2006b).

2. Sites d'étude

2.1. Critères d'inclusion

➤ Etude entomologique

Les études sur la distribution des vecteurs, la dynamique de la transmission de *Plasmodium falciparum* et de la résistance des vecteurs aux insecticides ont été menées dans huit communes sélectionnées sur le transect Nord-Sud du Bénin de façon à prendre en compte tous les différents facies géo-climatiques, écologiques et épidémiologiques (Tableau I). Il s'agit de : Adjohoun, Allada, Ouidah, Pobè, Dassa, Parakou, Kandi et Malanville. La sélection de ces sites a pris en compte l'écosystème, le climat, l'environnement géographique et la prévalence du paludisme rencontrés dans différentes zones du Bénin. Le tableau I résume les caractéristiques de chaque site.

Tableau I: Caractéristiques des sites d'études

Sites	Ecosystèmes	Climat	Environnement géographique	Prévalence du paludisme (%)
Adjohoun	Zones de forêts dégradées	Subéquatorial	Sud : zone de dépression argileuse à culture céréalière	12,20-14,70
Allada	Zones de forêts dégradées	Subéquatorial	Sud : zone de dépression argileuse à culture céréalière	14,70-26,10
Pobè	Zones de forêts dégradées	Subéquatorial	Sud-Est : zone de plateau de barre à culture céréalière	
Ouidah	Zones de forêts dégradées	Subéquatorial	Sud : zone côtière marécageuse à culture maraichère	
Dassa	Zone de savanes	Soudano-guinéen	Centre : zone rocheuse, à culture rizicole	
Parakou	Zone de savanes	Sud-soudanien	Nord: zone marécageuse à culture maraichère	26.10-31.10
Kandi	Zone de savanes	Nord-soudanien	Nord: zone de plateau à culture cotonnière	43.60-51.10
Malanville	Zone de savanes	Nord-soudanien	Nord: zone marécageuse à culture rizicole	

Pour la collecte des moustiques, deux zones ont été sélectionnées au hasard sur chaque site d'étude : une zone centrale et une zone périphérique soit 16 zones qui sont des villages ou quartiers de ville. Les localités sélectionnées sont :

Commune d'Adjohoun :

- **Houèkpakpota:** une zone urbaine située à 6 ° 42 '25 .09 " latitude Nord et 2 °29'54.8" longitude Est;

- **Allanzoumè:** un village rural situé à 6°43'12.76 " latitude Nord et 2°29'19.68" longitude Est.

Commune d'Allada :

- **Allomey :** un quartier urbain situé à 6°40'14.71" latitude Nord et 2°9'2.99" longitude Est ;
- **Niaouli :** un village rural situé à 6°44'37.01" latitude Nord et 2°8'13.32" longitude Est.

Commune de Pobè :

- **Okoofi:** une zone urbaine située à 7°46'31.74 " latitude Nord et 2°11'43.11" longitude Est;
- **Ossomou:** un village rural situé à 7°49'58.83 " latitude Nord et 2°13'37.60" longitude Est.

Commune de Ouidah :

- **Gomè:** une zone urbaine située à 6°24'47.68 " latitude Nord et 2°6'57.13" longitude Est;
- **Djègbadji:** un village rural situé à 6°19'14.48 " latitude Nord et 2°4'0.25" longitude Est.

Commune de Dassa:

- **Amangassa:** un quartier urbain situé à 7°46'31.74" latitude Nord et 2°11'43.11" longitude Est ;
- **Lema :** un village rural situé à 7°49'58.83" latitude Nord et 2°13'37.60" longitude Est.

Commune de Parakou :

- **Zongo-zénon :** un quartier urbain situé 7°49'58.83" latitude Nord et 2°13'37.60" longitude Est ;
- **Kpassa :** un village rural situé à 7°49'58.83" latitude Nord et 2°13'37.60" longitude Est.

Commune de Kandi :

- **Kossarou :** un quartier urbain situé 11° 7'29.32" latitude Nord et 2°56'9.57" longitude Est ;
- **Sonsoro :** un village rural situé à 11°4'58.91" latitude Nord et 2°13'37.60" longitude Est.

Commune de Malanville :

- **Arobanda :** un quartier urbain situé 11°51'5.12" latitude Nord et 3°23'45.06" longitude Est ;

- **Bodjekali** : un village rural situé à 11°48'49.06" latitude Nord et 3°22'58.08" longitude Est.

➤ Etude sur la durabilité des MIILD

Pour l'étude sur la durabilité des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action, quatre communes ont servi de sites d'investigation à savoir : Allada, Dangbo, Kandi et Malanville. Dans chaque commune, un arrondissement a été sélectionné: Késsounou (commune de Dangbo) et Allada (commune d'Allada) au Sud, Kandi I (commune de Kandi) et Malanville (commune de Malanville) au Nord (Figure 8). Le choix de ces communes a tenu compte des habitudes de la communauté vis-à-vis de l'utilisation des MIILD. Nous sommes partis de l'hypothèse que l'usure des MIILD dépend de la pression qu'on y exerce.

Les habitants de Késsounou, situé au bord du fleuve Ouémé, ont un accès facile à l'eau pour laver les moustiquaires (Photo 1). En revanche, les habitants d'Allada doivent aller chercher l'eau loin de leurs habitations pour laver les moustiquaires dans leurs foyers (Photo 2). Les mêmes critères (accès facile à l'eau versus accès difficile) ont été utilisés pour la sélection des sites au Nord. Malanville est situé près des fleuves Niger et Sota alors que Kandi I à l'image de Allada dispose d'une source d'eau plus éloignée.



Photo 1: Lavage des habits au bord du fleuve Sota à Malanville



Photo 2: Transport de l'eau de fontaine vers les habitations à Kandi

Pour tester l'hypothèse que les conditions de terrain affectent la durée de vie utile (protectrice) des MIILD, les sites de suivi ont été choisis en raison des différences qui pourraient influencer leur survie:

- la proximité de l'eau devrait faciliter le lavage fréquent des MIILD, accélérer leur usure et la perte de leur bio-efficacité ;
- la nuisance culicidienne devrait entraîner l'utilisation systématique des MIILD, et en conséquence leur usure rapide.

Le tableau I résume ces différences.

Tableau II: Résumé des caractéristiques des sites de suivi des MIILD

- Cours d'eau non disponible; fréquence de lavage des moustiquaires estimée < 5 fois dans l'intervalle de 6 mois	Allada Position géographique: Sud Bénin Climat: subéquatorial 'Altitude' éloigné du fleuve Ouémé
	Kandi 1 Position géographique: Nord Bénin Climat: Soudanien 'Altitude' éloigné du fleuve Niger
- Cours d'eau disponible; fréquence de lavage des moustiquaires estimée > 5 fois dans l'intervalle de 6 mois	Kessounou Position géographique: Sud Bénin Climat: subéquatorial 'Altitude' communauté résidant au bord du fleuve Ouémé
	Malanville Position géographique: Nord Bénin Climat: Soudanien 'Altitude' communauté résidant au bord du fleuve Niger

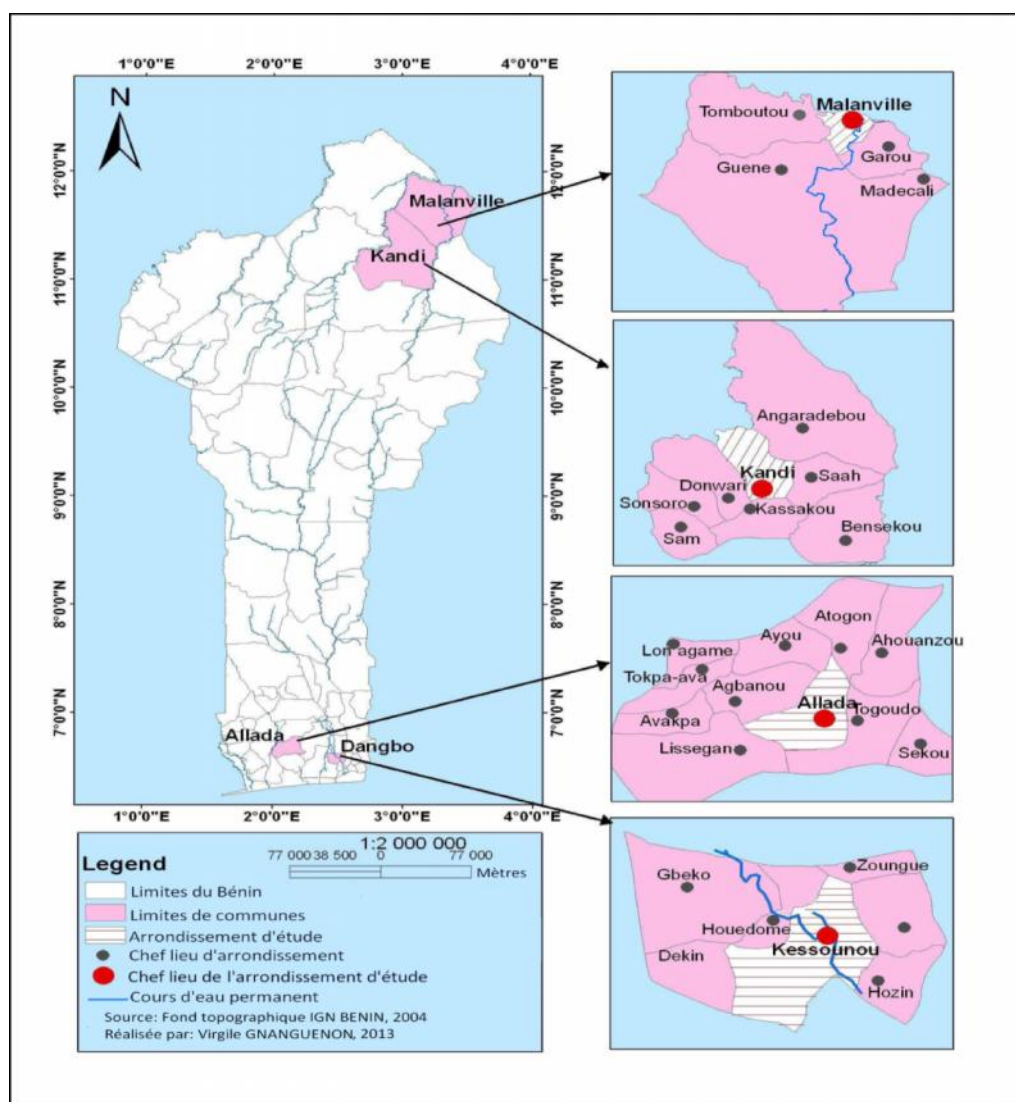


Figure 8: Carte montrant les quatre sites d'évaluation des MIILD

2.2 Description des sites

➤ Adjohoun

La commune d'Adjohoun est située au centre du Département de l'Ouémé dans la vallée et à 32 Km au Nord de Porto-Novo, capitale du Bénin. Sa superficie totale est d'environ 308 Km² avec une population de 210487 habitants (INSAE 2013).

Le climat d'Adjohoun est de type subéquatorial avec deux saisons pluvieuses : une grande d'Avril en Juillet, une petite de Septembre à Novembre et deux saisons sèches, une petite d'Août à Septembre et la grande de Décembre à Mars. Les précipitations sont irrégulièrement réparties tout au long des saisons pluvieuses, ce qui constitue un handicap pour l'agriculture pluviale. La pluviométrie moyenne annuelle est de 1122,19 mm en 50 jours de précipitation. Le couvert végétal d'Adjohoun a subi une forte dégradation sous l'influence des actions anthropiques à travers l'exploitation agricole et les feux de brousse. En dépit de la pluviométrie relativement bonne dans la région, la végétation primaire a disparu et est remplacée par des palmeraies (Tchegnon & Guidibi 2006).

➤ Allada

La commune d'Allada est située dans le département de l'Atlantique. La population de la commune d'Allada est estimée à 127493 habitants (INSAE 2013). Cette zone est caractérisée par un climat subéquatorial avec deux (02) saisons de pluie (une grande saison de Mars à Juin et une petite saison de Septembre à Novembre) et deux (02) saisons sèches (de Juillet à Septembre puis de Novembre à Mars). La pluviométrie annuelle moyenne est entre 800 et 1000 mm. Le réseau hydrographique est composé du lac Ahémé et une rivière du fleuve Couffo. La commune disposait d'une forêt dense qui a disparu sous l'effet de la pression démographique et des défrichements abusifs, laissant place à une savane arborée (Nangbe & Guidibi 2006).

➤ Dangbo

La commune de Dangbo est située dans le département de l'Ouémé. Elle s'étend sur une superficie de 149 Km² avec une population de 95908 habitants (INSAE 2013).

Elle est caractérisée par un climat subéquatorial avec deux saisons pluvieuses (Avril- Juillet et Octobre - Novembre) et deux saisons sèches (Août - Septembre et Décembre - Mars). La température, relativement élevée, subit de faibles variations entre 24°C et 32°C. La commune de Dangbo dispose d'un réseau hydrographique non négligeable propice à l'exploitation des ressources halieutiques. La végétation de la commune de Dangbo est de type savane arborée où prédominent les palmiers à huile naturels. On rencontre par ailleurs, une dizaine de formations forestières (forêts, forêts fétiches et autres) estimée à environ 15 hectares. Ce

couvert végétal est soumis régulièrement à des assauts dévastateurs de l'homme pour des fins de recherche de bois de chauffe, d'acajas et de bois d'œuvre, ce qui conduit à la déforestation poussée dans la commune (Akomagni & Guidibi 2006).

➤ **Ouidah**

La commune de Ouidah (département de l'Atlantique) s'étend sur une superficie de 364 Km² avec une population de 161544 habitants (INSAE 2013). Elle jouit d'un climat subéquatorial caractérisé par deux saisons de pluie alternées de deux saisons sèches à durées inégales. La hauteur d'eau recueillie au cours de l'année varie entre 950 et 1150 mm. La température moyenne est de 27°C, variant de 24° à 30°C en saison des pluies et de 23°C à 33°C en saison sèche. Le réseau hydrographique est essentiellement caractérisé par un système lacustre et lagunaire dont les principaux plans d'eau sont : les lagunes de Djessin, Donmè et le lac Toho. Ils sont alimentés par les fleuves du bassin du Sud-Ouest, notamment le Couffo et le Mono. La commune se situe dans un écosystème particulier constitué d'une diversité floristique et faunique. Du point de vue formation végétale, la flore est d'une manière générale dégradée, entièrement défrichée et laisse apparaître par endroits, l'existence de quelques îlots de forêts sacrées comme celles de Kpassè-Zoumè et d'Avlékété (Capo-Chichi & Guidibi 2006a).

➤ **Pobè**

La commune de Pobè est située au Sud-Est du Bénin et au Centre-Est du département du Plateau, à la limite frontalière avec le Nigeria. Elle a une superficie de 400 Km² représentant 11% de la superficie du département et 0,46% de celle du Bénin. Elle compte 123740 habitants en 2013 (INSAE 2013). La Commune de Pobè jouit d'un climat de type subéquatorial avec deux (02) saisons pluvieuses et deux (02) saisons sèches qui s'alternent. Les précipitations atteignent 1100 à 1200 mm par an. Le réseau hydrographique est presque nul.

Les anciennes photos aériennes montrent un couvert forestier très dense qui a presque disparu de nos jours du fait de l'agriculture et de la plantation du palmier à huile. De ce couvert, il reste environ 125 hectares à cheval sur les arrondissements de Pobè et Ahoyéyé appelé réserve botanique et quelques îlots de forêts classées dans la dépression (Gassi & Guidibi 2006).

➤ **Dassa**

La Commune de Dassa-Zoumè est l'une des six communes du département des Collines avec une superficie de 1711 Km² et une population 112118 habitants (INSAE 2013). Le climat est de type Soudano-guinéen. Il est caractérisé par deux saisons dans l'année : une saison sèche

(de Novembre à Mars) et une saison pluvieuse (d'Avril à Octobre). La saison des pluies dure 8 mois environ. La pluviométrie moyenne annuelle oscille autour de 1100 mm. Les variations de température sont relativement élevées. Les températures extrêmes montent parfois jusqu'à 38°C. Les faibles températures sont souvent observées pendant la nuit en période d'harmattan (Décembre-Janvier). La commune de Dassa-Zoumè présente un relief très accidenté caractérisé par une série de collines dénudées dont la dénivellation moyenne est de 200 m. La pénéplaine est couverte par une savane arborée et arbustive coupée de forêts classées décidues et semi-décidues (forêt de Logozohè) et quelques galeries forestières le long des cours d'eaux (Capo-Chichi & Guidibi 2006b).

➤ **Parakou**

La commune de Parakou se trouve à une altitude moyenne de 350 m et présente un relief assez modeste. Elle couvre une superficie de 441 Km² avec une population de 254 254 habitants (INSAE 2013). A Parakou, le climat est de type tropical humide (climat Sud-soudanien). Il se caractérise par l'alternance d'une saison de pluies (Mai à Octobre) et d'une saison sèche (Novembre à Avril). C'est en Décembre-Janvier que l'on enregistre les températures les plus basses à Parakou. La précipitation moyenne annuelle est de 1200 mm. Le maximum survient entre Juillet, Août et Septembre. Parakou est parcouru de ruisseaux ou affluents de la rive droite de l'Okpara. Le couvert végétal observé à Parakou est dominé par la savane arborée. Cette savane se caractérise par la présence du néré, du faux acajou, de bois d'ébène et le karité. Les bas-fonds sont des prairies marécageuses de savanes et des buissons de bambous. Les jachères sont envahies par des graminées et des arbustes assez divers (Kora & Guidibi 2006).

➤ **Kandi**

La commune de Kandi est située au centre du département de l'Alibori dans la zone agro-écologique du bassin cotonnier. Elle s'étend sur une superficie de 3421 Km², soit environ 13% de l'ensemble du département avec une population de 177683 habitants (INSAE 2013). Le relief est constitué de plateaux de grès entaillés par les vallées de la Sota et de l'Alibori qui sont les deux principaux cours d'eau de la commune. Par endroit, on note quelques collines faites de roches dures telles que le granite et le quartzite. Le climat est de type Nord-soudanais avec une saison sèche de Novembre à Avril et une saison pluvieuse de mai à Octobre. La pluviométrie moyenne se situe entre 800 et 1300 mm de pluie par an. L'harmattan en saison sèche et la mousson d'Avril à Octobre sont les vents dominants. L'humidité relative atteint 80% pendant les pluies mais descend jusqu'à 35% pendant la saison sèche. D'une altitude de

200 à 300 m, Kandi est découpé par des vallées encaissées, à l'Est la vallée de la Sota et à l'Ouest celle de l'Alibori. La commune de Kandi est donc arrosée par les affluents de l'Alibori et de la Sota (Ahoyo & Guidibi 2006a).

➤ **Malanville**

La commune de Malanville est située à l'extrême Nord de la République du Bénin. Elle couvre une superficie de 3016 Km² dont 8000 ha de terres cultivables. Sa population est de 168006 habitants (INSAE 2013). Son altitude moyenne est de 200 m au-dessus du niveau de la mer dont elle est à plus de 700 Km à vol d'oiseau. Le climat de la commune de Malanville est de type Nord-soudanais marqué par une saison sèche de Novembre à Avril. La moyenne des pluies enregistrées les cinq (05) dernières années est de 750 mm. Le vent dominant est l'harmattan soufflant de Novembre à Janvier tous les ans avec des écarts de température variant entre 16°C et 25°C. La commune de Malanville est traversée dans sa longueur (est-ouest) par le fleuve Niger avec ses affluents. Il s'agit de l'Alibori, du Mékrou et de la Sota qui sont en crue durant les mois d'Août et de Septembre. La commune connaît des inondations cycliques du fait des pluies diluviennes. La végétation de la commune de Malanville est constituée par la savane arborée avec une prédominance de formations herbacées (Ahoyo & Guidibi 2006b).

2.3. Méthodes d'échantillonnage des populations de moustiques

2.3.1 Etude de la dynamique de population des vecteurs et de la transmission du paludisme

Le but de cette étude est d'évaluer la variabilité de la transmission du paludisme et de la distribution spatio-temporelle des vecteurs en faisant des collectes directes de moustiques sur homme et dans les ménages par piège-fenêtres et sprays.

2.3.1.1 Capture directe de moustiques sur homme

Cette méthode permet d'évaluer les interactions entre le vecteur et l'hôte humain. Le nombre de vecteurs qui piquent l'homme par unité de temps est un important paramètre dans l'estimation du niveau de la transmission du paludisme. Il permet de savoir quels anophèles piquent les humains, quelles espèces sont vectrices du paludisme, combien de fois une personne est piquée par un vecteur par unité de temps et si les vecteurs piquent à l'intérieur ou à l'extérieur des habitations.

Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué les collectes de moustiques sur homme d'Avril 2012 à Février 2014. Deux maisons ont été choisies au hasard par zone (rurale ou

urbaine) pour les captures de moustiques. Deux séances de capture sur homme ont été effectuées tous les deux mois, soit 10 captures de nuit par site. Un captureur est placé à l'intérieur et un autre à l'extérieur de chaque point de capture. Les captureurs sont munis d'une lampe torche et d'un aspirateur à bouche qui leur permet d'aspirer les moustiques (Photo 3).



Photo 3: Illustration d'une capture nocturne sur homme (CREC 2010)

2.3.1.2. Capture par piège-fenêtre et par spray matinal

Pour évaluer le comportement des moustiques, en particulier leur endophilie, des captures de moustiques adultes ont été réalisées à partir des pièges-fenêtres et par aspersion intradomiciliaire de bombes insecticides non rémanentes.

Quatre (04) pièges-fenêtres sont placés dans chaque commune (2 en zone rurale et deux en zone urbaine). Ces pièges ont été placés sur les fenêtres de deux cases vers l'extérieur pendant 2 nuits à chaque séance de capture de 18h à 6h (Photo 4). Les habitations où sont installés les pièges ont été sélectionnées en fonction du nombre de personnes qui y dorment (une personne par case). Elles sont construites avec des murs de terre sèche ou en ciment et un toit en tôle. De plus, il n'y a pas d'ouverture entre le haut des murs et le toit de ces habitations. Les pièges-fenêtres utilisés sont constitués d'un tulle de térylène monté sur un cadre en fer de forme cubique, de 30 cm d'arrête. L'entrée est dessinée dans un cône tronqué de 2,5 cm de diamètre de trou avec un sommet situé à 2,5 cm de la face opposée du piège. Un contre plaqué de 1 m de côté, qui porte en son centre une ouverture de 30 cm de côté, est placé sur chaque fenêtre. Les moustiques récoltés dans les pièges sont transférés dans des gobelets couverts de voile. Ensuite, l'aspersion d'une bombe aérosol dans les mêmes habitations permet de récolter les autres moustiques qui se reposent à l'intérieur (Photo 5).

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



Photo 4: Capture de moustiques par piège-fenêtre **Photo 5:** Capture par spray matinal

2.3.1.3. Identification morphologique des espèces et traitement des moustiques

Après chaque collecte, les moustiques récoltés sont comptés et séparés en *Culicinae* et *Anophelinae* à l'aide de la loupe binoculaire. Outre la distinction entre anophèles et culicinsés, les structures morphologiques permettent également de distinguer les complexes d'espèces d'anophèles par rapport aux espèces de culicidés. Cela se fait par observation des caractéristiques propres aux différentes espèces en se basant sur l'utilisation des clés taxonomiques de Gillies et de Meillon (1968) et de Gillies et Coetzee (1987). Les espèces du complexe *An. gambiae* sont séparés des autres espèces identifiées pour un traitement approfondi.

Lors du traitement des espèces du complexe *An. gambiae* en vue d'analyses de laboratoire, les parties du corps d'un seul moustique ont été utilisées pour différentes analyses. Par exemple, pour une femelle, la tête et le thorax sont utilisés pour une analyse ELISA–CSP, l'abdomen est disséqué pour récupérer les ovaires en vue d'une estimation du taux de parturité. Les pattes, les ailes et la carcasse de l'abdomen ont été utilisées pour l'extraction d'ADN. Les moustiques découpés ainsi, sont conservés séparément selon le lieu de capture dans des tubes

ependorf étiquetés contenant du silicagel à -20°C pour les tests d'ELISA-CSP et la caractérisation moléculaire (PCR).

2.3.1.4. Dissection des ovaires

Les ovaires des femelles de *An. gambiae s.l* capturés sur appât humain sont disséqués pour évaluer l'âge physiologique de la femelle en observant le degré d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). La dissection de l'abdomen et l'observation au microscope de la morphologie des ovaires a permis de déterminer si :

- la femelle de *Anopheles gambiae s.l* a pondu des œufs au moins une fois dans sa vie, dans ce cas il est pare ;
- la femelle de *Anopheles gambiae s.l* n'a jamais pondu d'œufs, alors il est nullipare.

Ceci permet d'estimer les taux de parturité de la population de *Anopheles gambiae s.l*, c'est-à-dire la proportion de femelles pares. Ce paramètre reflète l'âge de la population des moustiques. Les populations de *Anopheles gambiae s.l* plus âgées présentent des taux de parité plus élevés. Les populations plus âgées sont davantage susceptibles de transmettre le paludisme parce qu'elles ont vécu suffisamment longtemps pour permettre au parasite de se développer.

2.3.1.5. Réalisation du test ELISA-CSP pour déterminer le taux d'infectivité

La présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique indique qu'il est capable de transmettre les parasites du paludisme à l'homme. Ceci a été déterminé par le test ELISA. Cette méthode permet de détecter la protéine circumsporozoïtique (CS) qui recouvre la surface externe du sporozoïte du paludisme et constitue donc un indicateur de l'état infectieux du parasite du paludisme. La protéine CS commence à être exprimée quand le sporozoïte est encore dans l'oocyste mature, dans l'intestin du moustique. On n'analyse donc que les têtes et les thorax des moustiques femelles pour s'assurer que, si la protéine CS est détectée, elle provient très probablement de sporozoïtes qui ont atteint les glandes salivaires et la femelle est donc prête à transmettre les parasites du paludisme.

Pour la recherche de cette protéine CS de *Plasmodium falciparum* nous avons utilisé la méthode ELISA décrite par Wirtz *et al.* (1987). Les têtes et thorax des moustiques à tester ont été broyés après avoir passé 1 heure dans 20 µl NP40/BB (Blocking Buffer). Cette solution a été obtenue en mélangeant 2 ml de BB avec 25 µl d'Igepal630. Au cours du broyage, le broyat a été deux fois complété avec 190 µl de BB. Les 96 puits de chaque plaque ont été d'abord sensibilisés avec des anticorps de capture anti CSP. La solution pour la sensibilisation a été obtenue en mélangeant 15 µl d'anticorps monoclonal avec 5 ml de PBS (Phosphate

Buffered Saline). 50 µl de cette solution ont été déposés dans chaque puits de la plaque et y ont été laissés pendant toute la nuit sur la paillasse ou pendant tout le week-end au réfrigérateur. Le jour suivant, les puits ont été vidés sans être lavés et ont reçu 200 µl de BB et laissés pendant 1 heure. Ces puits ont été ensuite vidés sans être lavés et ont reçu chacun 50 µl de broyat de moustique. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, les puits ont été vidés et lavés 2 fois avec du PBS/Tween 20 obtenu en mélangeant 500 µl de tween 20 avec 1 L de PBS. Chaque puits a reçu ensuite 50 µl d'anticorps conjugués à la peroxydase pendant 1 heure.

L'anticorps conjugué à la peroxydase a été reconstitué à partir d'anticorps monoclonaux dans un mélange d'eau distillée et de glycérol à volume égal. 7,5 µl de l'anticorps reconstitué ont été mélangés à 5 ml de BB. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les puits ont été vidés et lavés 4 fois avec le PBS/Tween 20, 100 µl du substrat de la peroxydase ont été ensuite déposés dans chaque tube. Ce substrat est un mélange de 5 mg d'ortho-tolidine dans 0,25 ml de N, N-diméthylformamide, de 30 ml de tampon citrate et de 12 µl d'eau oxygénée à 10%. La réaction se déroule à l'obscurité pendant 30 minutes. Au bout de ces 30 minutes, les puits positifs prennent une coloration bleue (Photo 6). Cette réaction a été bloquée avec l'acide sulfurique 4N. Les puits positifs prennent alors une coloration jaune (Photo 7). Les yeux ne pouvant pas détecter avec précision la coloration ou non des puits, les plaques ont été lues à l'aide d'un lecteur automatique de plaque ELISA à 405 nm. Des moustiques en élevage au laboratoire ont été broyés pour servir de témoins négatifs. L'antigène du *plasmodium falciparum* à 2pg/µl de BB a été utilisé comme témoin positif. Après la lecture avec un lecteur de plaque, nous avons considéré comme positifs, des puits dont la densité optique a été supérieure au triple de la moyenne des densités optiques des témoins négatifs. Les puits ayant une densité comprise entre 2 et 3 fois la moyenne de la densité des témoins négatifs ont été considérés comme douteux et repassés.



Photo 6: Plaque ELISA après action du substrat de la peroxydase (CREC 2012)



Photo 7: Plaque ELISA après blocage de la réaction avec H₂O (CREC 2012)

2.3.1.6. Caractérisation moléculaire des populations de *An. gambiae* s.l

La caractérisation moléculaire passe par trois étapes:

➤ Etape 1: extraction d'ADN

L'ADN a été extrait au CTAB à 2%. Les moustiques entiers ont été broyés dans 200 µl de CTAB à 2% (Photo 8). Après 5 mn au bain-marie à 65°C (Photo 9), le broyat a été mélangé avec 200 µl de chloroforme puis centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5 mn (Photo 10). Le surnageant a été délicatement récupéré dans un autre tube avec 200 µl d'isopropanol puis centrifugé à 12000 tours par minute pendant 15 minutes. Le culot a été conservé avec 200 µl d'éthanol à 70%. L'ensemble a été centrifugé à 14000 tours par minute pendant 5 mn. Le contenu du tube a été délicatement renversé afin de conserver le culot qui était ensuite séché pendant au moins 3 heures sur la paillasse (Photo 11). Enfin, 20 µl d'eau bi-distillée ont été ajoutée au culot, laissé en suspension sur la paillasse pendant toute la nuit ou une demi-journée.



Photo 8: Broyage du moustique au CTAB (CREC 2012)



Photo 9: Digestion du broyat au bain-marie (CREC 2012)



Photo 10 : Dispositif de centrifugation à 1400 tours/minutes (CREC 2012)



Photo 11: Tubes eppendorf contenant l'ADN (CREC 2012)

➤ Etape 2: amplification de L'ADN

Principe de la PCR

La PCR est une technique d'amplification d'ADN qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Elle est basée sur l'utilisation de deux amorces de 27 séquences courtes qui s'hybrident à des sites complémentaires en orientations inversées sur les deux brins d'ADN encadrant la région à amplifier.

Un programme de PCR comporte une phase initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 min ; elle est suivie de 35 cycles et une phase d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Chaque cycle de PCR comporte trois étapes définies comme suit: on procède à une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 3 mn, suivie de 35 cycles comprenant chacun une phase de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une phase d'hybridation des amorces à 55°C pendant 30 s et une phase d'élongation à 72°C pendant 30 s. A la fin de l'ensemble des cycles, on a une phase finale d'élongation à 72°C pendant 5 mn.

L'identification des espèces se fait par PCR diagnostic en se servant de quatre amorces qui sont : UN, AG, AA, AM. UN est une amorce universelle qui s'hybride avec une séquence nucléotidique particulière chez toutes les espèces de moustique. AG forme avec UN le couple d'amorces qui amplifie un fragment nucléotidique précis chez *Anopheles gambiae*. Il en est de même du couple d'amorces UN et AA qui amplifie un fragment nucléotidique particulier chez *Anopheles arabiensis*. Enfin, le couple d'amorces UN et AM réalise l'amplification nucléotidique d'un fragment uniquement chez *Anopheles melas*. Les séquences nucléotidiques de ces amorces sont: UN 5'-GTGTGCCGCTTCCTCGATGT-3' ; AG 5'-CTGGTTTGGTCGGCACGTTT-3' ; AA 5'-AAGTGTCTCTTCTCCATCCTA-3'; AM 5'-GTGACCAACCACTCCCTTGA-3' (Scott *et al.*, 1993).

Pour les espèces *An. coluzzii* et *An. gambiae*, le diagnostic par PCR se fait avec quatre amorces (R3, R5, Mopti int et B/S int). Le couple d'amorces R3/R5 amplifie un fragment standard d'environ 1300pb chez les deux espèces. A ce premier fragment, s'ajoute un autre fragment d'une taille de 727pb amplifié par le couple d'amorces Mopti int et B/S int chez *An. coluzzii* alors que c'est un fragment d'environ 475pb que le même couple d'amorces amplifie chez *An. gambiae*. Les séquences nucléotidiques de ces amorces sont : R3 5'-GCAATCCGAGCTGATAGCGC-3' ; R5 5'-CGAATTCTAGGGAGCTCCAG-3' ; Mopti int 5'-GCCCCTTCCTCGATGGCAT-3' B/S int 5'-ACCAAGATGGTTCGTTGC-3' (Favia *et al.*, 2001).

➤ Etape 3: migration du produit PCR

Le produit PCR a été migré dans un gel préparé en mélangeant 3 à 4 g d'agarose et 200 ml de TBE 1X dans un Erlen. Ce mélange a été mis dans une micro-onde et surveillé jusqu'à l'ébullition. Après l'ébullition, le mélange a été refroidi jusqu'à 45°C environ et 12 µl de BET ont été ajoutés. Le gel a été coulé dans un plateau de moulage dans lequel des puits sont réalisés à l'aide des peignes. Au bout de 30 mn environ, le gel déjà refroidi et solide sera déposé dans la cuve de migration contenant le tampon TBE. 18 µl du produit PCR ont été mélangé à 5 µl de Bleu de Bromophénol et déposés dans chaque puits. A la fin de la migration, l'estimation de la taille des fragments d'ADN a été faite sous l'ultra-violet par comparaison de la hauteur de migration de la bande de chaque échantillon avec l'échelle de différentes tailles moléculaires chargées simultanément dans d'autres puits (Photo 12).



Photo 12: Dispositif de migration du produit PCR

2.3.1.7. Estimation des indicateurs de la transmission vectorielle du paludisme

Cette section est consacrée aux plus importants indices entomologiques dans la caractérisation de la transmission du paludisme par une population vectrice.

- Taux d'agressivité (PHN)

Le taux d'agressivité (PHN) est exprimé comme le nombre de piqûres qu'une personne reçoit d'une espèce vectrice particulière par nuit. Ce paramètre peut être directement estimé à partir des captures sur un volontaire, comme suit:

Taux d'agressivité (PHN) = nombre de moustiques capturés ÷ [nombre de captureurs x nombre de nuits]

- Indices d'endophagie et d'exophagie

Les indices d'endophagie et d'exophagie sont directement obtenus à partir des estimations des taux d'agressivité calculés à partir des captures sur volontaires humains à l'intérieur (i) et à l'extérieur (e) des habitations.

L'indice d'endophagie (ENGI) est donc :

$$\text{ENGI} = \text{PHN (i)} \div [\text{PHN (i)} + \text{PHN (e)}]$$

L'indice d'exophagie (EXGI) est donc :

$$\text{EXGI} = \text{PHN (e)} \div [\text{PHN (e)} + \text{PHN (i)}]$$

Noter que ENGI+EXGI est toujours égale à 1.

-Taux d'exophilie

C'est la proportion de moustiques qui se repose à l'extérieur des habitations après leur repas de sang.

$$\text{Taux d'exophilie (\%)} = [\text{nombre de moustiques femelles collecté dans les pièges-fenêtres} \div \text{nombre total de moustiques femelles collectés dans les pièges-fenêtres et les sprays}] \times 100$$

-Taux d'endophilie

C'est la proportion de moustiques qui se repose à l'intérieur des habitations après leur repas de sang.

$$\text{Taux d'endophilie (\%)} = [\text{nombre de moustiques femelles collecté dans les sprays} \div \text{nombre total de moustiques femelles collectés dans les pièges-fenêtres et les sprays}] \times 100$$

-Taux d'infection

Le taux d'infection est la proportion de moustiques porteurs de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires.

$$\text{Taux d'infection (Is)} = \text{nombre de moustiques positifs} \div \text{nombre total de moustiques analysés}$$

-Taux d'inoculation entomologique (TIE)

Le TIE est le nombre de piqûres infectantes reçues par homme et par nuit. S'il existe des méthodes plus compliquées de calcul de cet indice, la plus simple est la suivante :

$$\text{TIE} = [\text{taux d'agressivité (PHN)}] \times [\text{taux d'infection (Is)}]$$

2.3.1.8. Analyse des données sur les vecteurs et la transmission du paludisme

Nous avons étudié la composition des populations de moustiques en termes de diversité des espèces, exprimée comme la richesse spécifique (Taxa_S). Ensuite, nous avons déterminé l'indice de diversité de Shannon-Wiener et l'indice de dominance de Simpson pour chaque site.

Taxa_S = nombre d'espèces rencontrées (Simpson 1949) ;

Indice de diversité de Shannon-Wiener = $\sum - (P_i \times \ln P_i)$ ou P_i est la proportion de l'espèce i dans la population étudiée.

L'indice de Shannon n'a en théorie pas de limite supérieure. Seule son interprétation relative (dans le temps ou dans l'espace) est euristique. Cet indice doit être avantageusement

accompagné d'un autre indice: l'indice d'équitabilité (IE). Celui-ci est le rapport entre l'indice de Shannon de l'échantillon et la valeur maximale que cet indice pourrait atteindre si toutes les espèces qui constituent l'échantillon y étaient également représentées. Il varie donc entre 0 et 1. Plus cet indice tend vers 1 plus le peuplement est plat (tirage des espèces dans l'échantillon équiprobable) plus il tend vers zéro, plus ce peuplement est contrasté (représentation quantitative des espèces très variée dans l'échantillon)(Simpson 1949). La comparaison des indices de diversité des espèces de moustiques a été faite en utilisant le test t de Student à l'aide du logiciel PAST 2.07.

La méthode de calcul des intervalles de confiance de Poisson (Rothman 2012) a été utilisée pour estimer les intervalles de confiance des densités, des taux de piquê, des TIE, des taux d'endophagie et d'exophagie et des fréquences selon les espèces de moustiques.

La méthode Binomiale de calcul des intervalles de confiance (Rothman 2012) a été utilisée pour estimer les intervalles de confiance des taux de parturité.

Les méthodes d'estimation inconditionnelle du maximum de vraisemblance (Wald), ou d'estimation non biaisée médiane (mi-p) du rapport de risque (RR) suivi de leurs intervalles de confiance obtenus en utilisant l'approximation normale ou la méthode exacte mi-p et des p-values obtenus par Khi^2 ou par midp.exact (Jewell 2003) ont été utilisés pour comparer les taux d'endophagie et d'exophagie entre eux pour chaque site et les TIE entre les sites. L'analyse en composantes principales a été utilisée pour révéler la structure des données de TIE et déterminer les profils de transmission du paludisme. Les facteurs 1, 2 et 3 représentent les composantes principales 1, 2 et 3.

Pour estimer les TIE mensuels de chaque site, nous avons utilisé le zero-inflated regression models (Lambert 1992) compte tenu du nombre important de zéro que comportaient les données. Ce modèle prend le TIE comme variable dépendante et comme covariables : sites, zones et mois de capture. C'est le meilleur modèle parmi les modèles de la famille de Poisson (Poisson classique, quasi de Poisson, Binomial Négative) utilisé pour les données en se basant sur le log vraisemblance. Avec ce modèle nous avons prédit les TIE des mois non évalués. Tous ces paramètres ont été calculés et analysés avec le logiciel R-2.15.2 (R Development Core Team 2011).

2.3.2. Etude de la résistance des vecteurs aux insecticides et des mécanismes de résistance

Elle vise à évaluer le niveau de sensibilité des vecteurs aux insecticides et les mécanismes impliqués par des collectes de larves de moustiques qui sont élevées jusqu'au stade adulte. Ces moustiques adultes sont soumis aux insecticides à tester.

2.3.2.1. Collecte des larves

Nous avons réalisé des tests de sensibilité aux insecticides pour suivre l'évolution de la résistance des vecteurs dans les différents sites d'étude. De tels tests exigent des spécimens de moustiques âgés de 2 à 5 jours qu'on ne peut obtenir qu'à partir des larves. Ainsi, les larves de *An. gambiae s.l* ont été collectées au cours des saisons pluvieuses des années 2012, 2013 et 2014. Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau avec une louche, puis acheminées vers l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) pour l'élevage.

2.3.2.2. Elevage des moustiques

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

2.3.2.3. Test de sensibilité et cartographie de la résistance aux insecticides

Les moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, morphologiquement identifiés comme *An. gambiae s.l* ont été exposés à des doses diagnostiques de divers insecticides pour les tests de sensibilité en utilisant les papiers imprégnés d'insecticides décrit par le protocole standard des tests OMS (WHO 2013). Les insecticides suivants ont été testés: la deltaméthrine (0,05%), le

Pirimiphos methyl (0,05%), le Fénitrothion (1%) et le Bendiocarb (0,1%). Pour chaque insecticide, cinq tubes à essai contenant un papier non traité (tube témoin) et quatre papiers traités (tubes tests) pour l'exposition des moustiques ont été utilisés. Une moyenne de 20 à 25 moustiques a été introduite dans chaque tube. Les femelles de *Anopheles gambiae s.l* utilisées dans cette étude ont été exposées pendant une heure aux papiers imprégnés d'insecticide. Au cours de ce test, le nombre de moustiques tombés sous le choc provoqué par l'insecticide (effet knock-down) au bout de différents intervalles de temps (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) d'exposition a été enregistré. Après 60 minutes d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes contenant des papiers non traités et mis en observation (25°C et 80% d'humidité) avec un accès libre au jus sucré (jus de miel à 10%). La mortalité au bout de 24 heures a été déterminée selon le protocole de l'OMS.

La résistance aux insecticides a été évaluée par le taux de mortalité estimé comme suit :

$$\text{Taux de mortalité(\%)} = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre d'individus testés}} \times 100$$

Nous n'avons pas eu recours à la formule d'Abbot sur la mortalité corrigée puisque les taux de mortalités observés dans les témoins étaient inférieurs à 5%.

Interprétation des résultats

Le statut de résistance des moustiques testés a été déterminé selon les critères de l'OMS (WHO 2013b). Toute population de *An. gambiae s.l* dont le taux de mortalité est compris entre 98 et 100% est considérée comme sensible. Quand la mortalité est située entre 90 et 97%, les spécimens de ce groupe sont considérés comme appartenant à une population de suspicion de résistance à confirmer. Lorsque la mortalité est inférieure à 90%, la population est considérée comme résistante.

Des analyses moléculaires et biochimiques ont été utilisées pour d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance détectée et faciliter ainsi la mise en place de mesures efficaces de gestion de la résistance.

2.3.2.4. Caractérisation moléculaire de la résistance aux insecticides

Deux marqueurs moléculaires sont utilisés pour la caractérisation des gènes de résistances aux principales familles d'insecticides utilisés contre les vecteurs du paludisme. Il s'agit des marqueurs Knock-down resistance (Kdr) et Acetylcholinesterase-1 résistance (Ace-1R).

Pour le marqueur *Kdr*, le diagnostic par PCR se fait avec quatre amorces AgD1, AgD2, AgD3 et AgD4. Le couple d'amorces AgD1/AgD2 flanquent le gène de mutation *Kdr*, en amplifiant

un produit de 293pb comme contrôle. AgD3/AgD1 s'apparie seulement avec l'allèle de résistance du gène *Kdr*, pour amplifier un fragment de 195pb. Le couple AgD4/AgD2 s'associe uniquement avec l'allèle *Kdr* susceptible, en amplifiant un fragment de 137pb. Les séquences nucléotidiques de ces amorces sont : AgD1 :5'-ATAGATTCCCCGACCATG-3' ; AgD2 : 5'-ACAAGGATGATGAAC C-3' ; AgD3 : 5'-AATTTGCATTACTTACGACA-3' ; AgD4 : 5'-CTGTAGTGATAGGAAAT TTA-3' (Martinez-Torres *et al.*, 1998).

Pour le marqueur *Ace-1R*, le diagnostic par PCR se fait avec deux amorces dont les séquences nucléotidiques sont : Ex3AGdir : 5'-GATCGTGGACACCGTGTTTCG-3' Ex3AGrev : 5'-AGGAT GGCCCGCTGGAACAG-3' (Weill *et al.*, 2003).

2.3.2.5. Fréquence des mécanismes de résistance

Pour un gène quelconque diallélique (A, a), les différents génotypes attendus dans une population sont : AA, Aa et aa. L'effectif de chaque génotype dans l'échantillon étant connu, la fréquence allélique ou génique se calcule par la formule suivante : $Fr(A) = (2N_{AA} + N_{Aa}) / 2(N_{AA} + N_{Aa} + N_{aa})$. Cette formule a permis d'estimer la fréquence des gènes *Kdr* et *Ace-1*.

2.3.2.6. Caractérisation biochimique des mécanismes de résistance

Les dosages biochimiques ont été effectués pour comparer les niveaux d'activité des oxydases de fonction mixte (MFO), des estérases non-spécifiques (NSE) et de la glutathion S-transférases (GST) selon le protocole décrit par Hemingway *et al.* (1998) chez les *An. gambiae* sensibles Kisumu et les souches de terrain. Les moustiques utilisés pour l'analyse biochimique n'ont pas été exposés à des insecticides avant le dosage.

Ces activités enzymatiques ont été mesurées sur un échantillon de 50 moustiques par site. Chaque moustique a été broyé dans 200 µl d'eau distillée et l'homogénat a été centrifugé à 14000 tours/minute pendant 2 minutes. Deux répliques de 10 µl de surnageant ont été transférés dans deux puits adjacents d'une plaque de microtitrage pour les estérases non spécifiques (NSE) et les glutathion-s-transférase.

2.3.2.7. Cartographie de la résistance

Les résultats de ces tests ont été cartographiés avec le logiciel ArcGis 10.1 à partir des coordonnées géographiques des différents sites (obtenus par GPS) et du fond topographique fourni par l'Institut Géographique National.

2.3.2.8. Analyse des données

Le test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les différentes fréquences *Kdr* et *Ace-1R* avec le logiciel R 2.15.

2.3.3. Survie des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action

Cette étude vise à estimer la durée de vie des MIILD dans la communauté en tenant compte de leur survie dans les ménages, de leur intégrité physique et de l'efficacité de l'insecticide.

2. 3.3.1. Type de moustiquaire impliqué dans l'étude

La campagne de distribution de Juillet 2011, a permis de distribuer 4674799 moustiquaires Olyset®, moustiquaires en polyéthylène 150 Denier (PE-150D), imprégnées de perméthrine (2%). La durabilité de ces moustiquaires a été suivie sur les quatre sites selon les directives de l'OMS (WHO 2011).

2. 3.3.2. Recensement des ménages et distribution des MIILD

Avant la campagne de distribution, un recensement de l'ensemble des ménages a été réalisé à travers tout le pays, y compris nos sites d'étude. Le recensement a permis d'enregistrer le nom du village, le nom du chef de famille, le numéro d'identification du ménage et le nombre d'adultes et d'enfants vivant dans chaque maison (PNLP 2011). La dotation des ménages en moustiquaire a été basée sur la taille du ménage et le ratio d'une moustiquaire pour deux personnes (politique nationale pour la couverture universelle). Cette campagne de distribution a permis de couvrir 85% des ménages dans le pays. Les MIILD distribuées portent des étiquettes qui permettent de les distinguer de celles distribuées au cours d'autres campagnes ou provenant d'autres sources.

2. 3.3.3. Sélection des ménages et marquage des MIILD

Pour une étude prospective sur la durabilité des moustiquaires, l'OMS a suggéré l'estimation de la taille de l'échantillon sur la base du degré d'usure minimal des MIILD dans la région. Mais au Bénin, le degré d'usure minimale des MIILD Olyset n'est pas connu. Dans ce cas, l'OMS a suggéré qu'un échantillon de 250 moustiquaires permettra la détection d'une différence à 10% si la moustiquaire la plus performante a un degré d'usure de 10 %, et la détection d'une différence à 12% si la moustiquaire a un degré d'usure de 20 % (WHO 2011). Dans notre étude, cette taille d'échantillon de 250 moustiquaires a été doublée et 500 moustiquaires ont été sélectionnées par site d'étude pour plus de précision dans la détection de différence. Un sous-échantillon de 50 moustiquaires par site qui représente 10% de l'échantillon total a été sélectionné au hasard par intervalle de 6 mois pour mesurer l'activité de l'insecticide.

Dans chaque ménage sélectionné, une moustiquaire Olyset a été choisie au hasard si plusieurs étaient présentes. La sélection des moustiquaires dans les ménages sur chacun des quatre sites

a pris en compte le nombre de villages par site de manière à assurer un échantillonnage représentatif du site d'étude. Par exemple, Kessounou est divisé en cinq villages : Kodonou, Kessounou, Gléhoué, Hetin-Sota et Glahounsa. Comme l'évaluation porte sur 500 moustiquaires, environ 100 moustiquaires ont été sélectionnées au hasard dans chacun des cinq villages. Le tableau III résume le processus de sélection.

Tableau III: Répartition des ménages sélectionnés par site

Arrondissement	Villages	Code	Nombre de ménages sélectionnés (T₀)
Kessounou	Kodonou	KOD	100
	Kessounou	KES	101
	Glehoue	GLH	100
	Hetin-Sota	HS/HSZ	100
	Glahounsa	GLA	100
	Total		501
Allada	Alomey-Ahito	ALO/AHI	100
	Gbowele-Dodomey	GBO/DOD	100
	Dogoudo-Gbgamey	DOG/GBE	100
	Donou-Togoh	DON/TOG	100
	Tokpota-Zebou	TOK/ZEB	100
	Total		500
Kandi 1	Damadi	DAM	100
	Gansosso	GNS	100
	Keferi	KEF	100
	Pede	PED	100
	Gandokossikana	KSK	100
	Total		500
Malanville	Wouro-yesso	WOY	100
	Kotchi1	KOT	100
	Kotchi2	KCH	100
	Haro-banda	GAL	101
	Galiel	GLL	100
	Total		501
TOTAL			2002

Deux équipes composées de deux techniciens et un agent de santé villageoise (ASV) ont visité chaque ménage sélectionné. Le chef de ménage ou une personne adulte agissant au nom du chef ménage a été interviewé. En certaines occasions où aucun répondant approprié n'a été trouvé dans un ménage donné, la visite de la maison suivante a été faite. Environ 500 ménages (500-501), où les moustiquaires de la campagne étaient en cours d'utilisation, ont été sélectionnés sur chaque site de suivi. Les équipes ont identifié la MIILD de la campagne (sur la base de l'étiquette) dans chaque ménage sélectionné (ou une moustiquaire est choisie au hasard, si plusieurs moustiquaires étaient présentes). Les équipes ont marqué la MIILD pour

l'évaluation de suivi en utilisant un système de double marquage composé d'une étiquette supplémentaire avec un code unique et d'une marque d'encre indélébile (Photo 13 et 14). L'équipe a également enregistré les coordonnées GPS de chaque ménage sélectionné pour les visites de suivi (Photo 15).



Photo 13: Etiquetage de la moustiquaire **Photo 14:** Double marquage à l'encre



Photo 15: Enregistrement des coordonnées GPS

Google Earth 6.1 a été utilisée pour cartographier les ménages de l'étude (Figure 9, 10, 11 et 12).

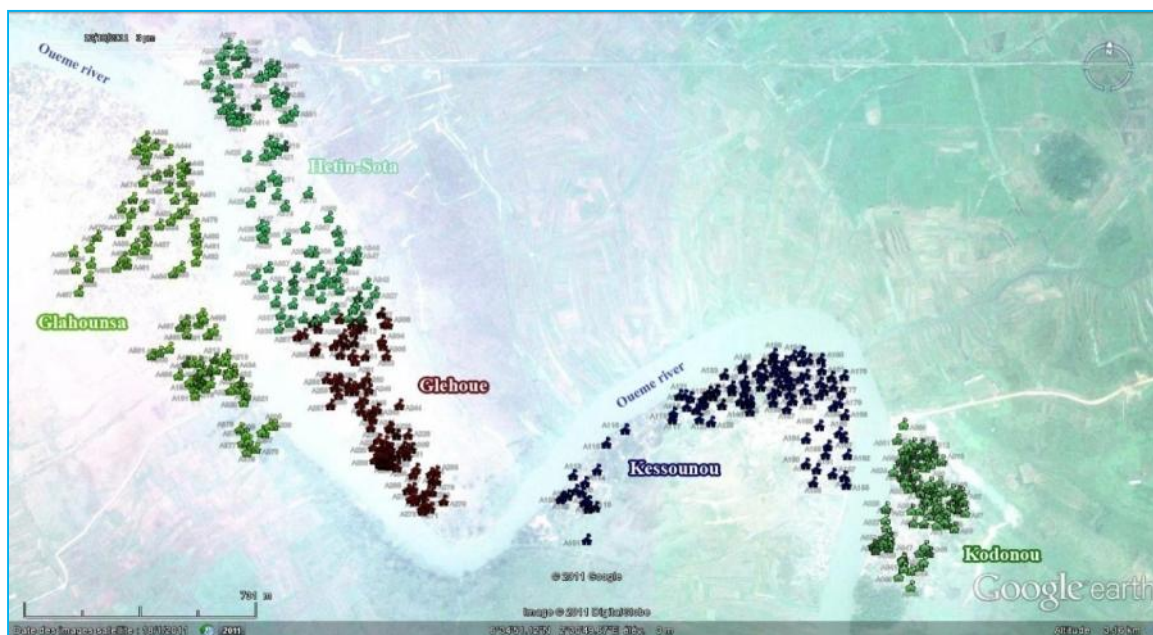


Figure 9: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Kessounou



Figure 10: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Allada



Figure 11: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Kandi



Figure 12: Image satellitaire montrant la distribution des ménages sélectionnés à Malanville

2. 3.3.4. Procédure de collecte de données

Les moustiquaires sélectionnées et marquées ont été évaluées suivant les méthodes standards suivantes :

- une enquête de suivi et une observation visuelle pour évaluer les pertes et la détérioration physique des MIILD ;
- Une évaluation de la bio-efficacité par la chromatographie en phase gazeuse (GC) et au besoin le test en cône OMS (pour confirmer les résultats des tests chromatographique) pour appréhender la baisse d'efficacité due à la dégradation de la quantité d'insecticide.

2. 3.3.5. Enquête prospective et questionnaire

Lors des visites successives, les ménages inclus dans l'étude ont été localisés par le nom du chef de ménage et par leurs coordonnées GPS. Les ménages qui n'étaient pas ouverts pour inspection après deux visites au cours d'une enquête d'évaluation ont été revisités lors des enquêtes d'évaluation suivantes. Si le ménage a été trouvé fermé pendant trois enquêtes d'évaluation, il est écarté de l'échantillon.

2. 3.3.5.1. Suivi de la présence /absence des moustiquaires marquées dans les ménages

Le taux de survie lors de la sélection des moustiquaires (T0), a été fixé à 100%. Par intervalles de 6 mois, chaque ménage a reçu une visite de suivi. Si le ménage était ouvert au moment de

la visite, l'équipe d'évaluation confirme la présence visuelle de la MIILD marquée. Si la MIILD marquée n'était pas présente dans le ménage, les équipes d'évaluation déterminent pourquoi la moustiquaire était absente en interrogeant le propriétaire. Les raisons qui justifient l'absence de la moustiquaire marquée dans le ménage ont été réparties en trois catégories. Il s'agit de (WHO 2011):

- (i) la moustiquaire marquée a été jetée parce qu'elle était physiquement endommagée et jugée non utilisable ;
- (ii) la moustiquaire marquée a été déplacée (par exemple donnée, volée, vendue, etc) ;
- (iii) la moustiquaire marquée était utilisée à d'autres fins (pêches, jardinage, etc).

2. 3.3.5.2. Suivi de l'intégrité physique

L'intégrité du tissu de la MIILD a été évaluée par un examen visuel. Les trous observés ont été affectés à l'une des quatre catégories de taille selon les méthodes décrites par l'OMS (WHO 2011):

- catégorie 1 (Photo 16a): "< pouce (0,5-2 cm)" (impossible d'insérer le pouce) ;
- catégorie 2 (Photo 16b): "> pouce < poing (2-10 cm)" (possible d'insérer le pouce mais pas le poing) ;
- catégorie 3 (Photo 16c): "> poing < tête < (10-25 cm)" (possible d'insérer le poing mais pas la tête);
- catégorie 4 (Photo 16d): "> tête (> 25 cm) " (possible d'insérer la tête).

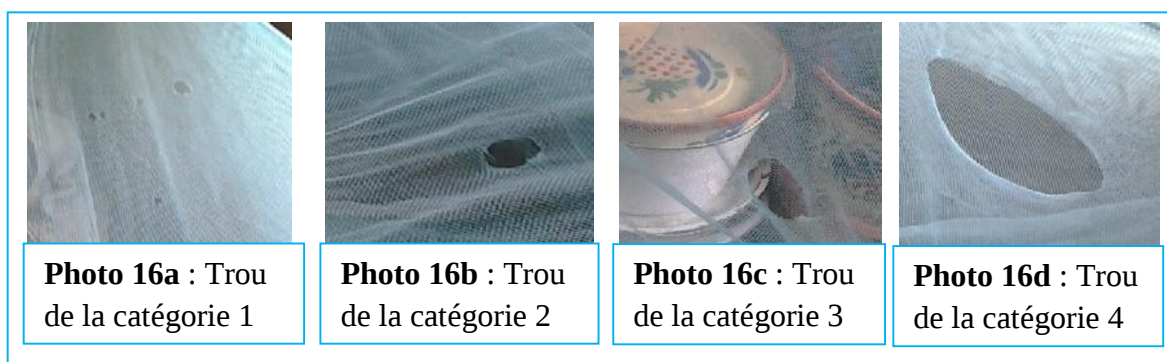


Photo 16: Différentes catégories de trou sur les moustiquaires

Les causes des trous (simples déchirures, brûlures, rats, défaut de couture) ont été aussi recensées pour évaluer la contribution de chacune d'elles à la dégradation physique de la moustiquaire.

2. 3.3.5.3. Questionnaire d'interview

Un questionnaire, recommandé par l'OMS (WHO 2011) et adapté aux besoins de notre étude, a été utilisé pour identifier les facteurs associés à la perte de l'intégrité physique et de la bio-

efficacité. Les outils utilisés pour la collecte de données sont des tablettes Samsung Galaxy Tab 10.1 ®. Un formulaire d'enquête électronique a été créé sur ces tablettes grâce au logiciel de collecte de données ODK (Open Data Kit). Cette technique a permis l'enregistrement et une mesure instantanée des données. A la fin de chaque visite, les données sont transférées directement à un serveur cloud en vue d'assurer leur sauvegarde et leur traçabilité.

2. 3.3.5.4. Evaluation de la bio-efficacité par la Chromatographie gazeuse (GC)

L'OMS recommande l'utilisation de la méthode bio-essai (test en cône) pour le suivi de la bio-efficacité. Cependant, les problèmes liés à l'élevage d'un grand nombre de moustiques et à la nécessité de disposer d'une souche de *An. gambiae s.l* sensible aux pyréthrinoïdes constituent des contraintes. Une autre méthode, le test colorimétrique, a été développée par Green *et al.* (2009) pour une utilisation avec des MIILD traitées à la deltaméthrine. L'évaluation colorimétrique de la bio-efficacité des MIILD implique un processus à deux étapes. Dans la première étape, un Dispositif d'Echantillonnage Magnétique (DEM) est utilisé pour échantillonner la quantité de l'insecticide à la surface de la MIILD (sans la déplacer au laboratoire ou couper des fragments). La quantité d'insecticide sur le disque en papier filtre que porte le DEM, est proportionnelle à la quantité d'insecticide à la surface de la moustiquaire. Comme l'échantillonnage est standardisé, les résultats des différentes moustiquaires échantillonnées sont comparables. La deuxième étape d'utilisation des tests colorimétriques consiste à estimer la quantité de la deltaméthrine dans l'échantillon de papier filtre. Les résultats colorimétriques sont ensuite validés en les comparant aux résultats des bio-essais de l'OMS (test en cône) pour une série de moustiquaires ayant des quantités différentes de deltaméthrine à leurs surfaces. L'utilisation d'un seuil standard (0,7µg/disque), a permis d'interpréter les résultats colorimétriques en termes de "si oui ou non une MIILD répond aux exigences minimales de l'OMS" pour la bio-efficacité (moustiquaire causant une mortalité supérieure à 80% dans un test cône).

Une approche conceptuellement similaire (test chimique) a été développée dans notre étude pour le suivi de la bio-efficacité des MIILD Olyset contenant de la perméthrine. Cette approche, basée sur la chromatographie gazeuse (GC), a été développée dans le but de contourner les problèmes décrits précédemment qui sont associés à la méthode des tests en cône de l'OMS pour l'évaluation de la bio-efficacité. Avec la technologie Olyset®, les molécules d'insecticide migrent de façon continue vers la surface, où les vecteurs se posent, en remplaçant l'insecticide perdu. Sur la base de cette théorie, l'outil d'échantillonnage de la

quantité d'insecticide à la surface de la MIILD a été modifié pour permettre un échantillonnage de la MIILD Olyset® sans la déplacer au laboratoire ou couper des fragments.

- Prélèvement et extraction de l'insecticide

Les échantillons d'insecticide ont été prélevés à la position B de la moustiquaire (Figure 13). Ce choix est justifié par le fait que plusieurs propriétaires peuvent mettre des couvertures sur le toit de la moustiquaire (position D) ou plier les bords inférieurs sous le matelas ou la natte (position A), entraînant ainsi une perte des molécules d'insecticide. Par conséquent, la position B au milieu de la moustiquaire (Figure 13) est la meilleure position pour prélever l'insecticide.

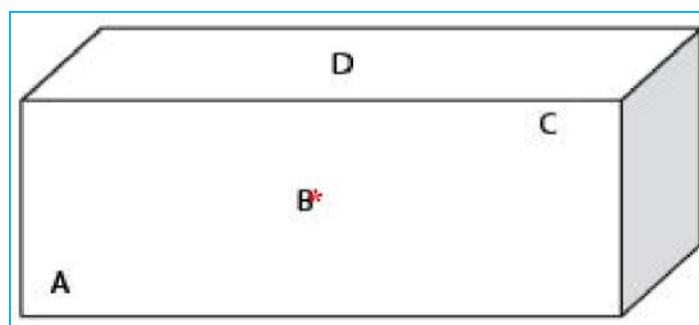


Figure 13: Identification de la position d'échantillonnage

Le prélèvement est réalisé par une technique en quatre étapes. Dans un premier temps, la moustiquaire à tester est suspendue et la position B est identifiée et fixée à un cerceau à broder (10,16 cm de diamètre) puis une portion de papier optique (2,5 cm de diamètre) est appliquée sur la surface d'un couvercle fixé à un tube Falcon de 50 ml. Dans un deuxième temps, le papier optique est frotté 10 fois le long du diamètre intérieur du cerceau (10 rotations) pour prélever l'insecticide. A la troisième étape, le papier optique est retiré du couvercle du tube Falcon puis, à la quatrième étape il est inséré dans une seringue de 1 ml et compressé avec le piston. La face opposée à la partie fixée au cerceau a été également frottée de la même manière pour prélever l'insecticide (Photo 17).

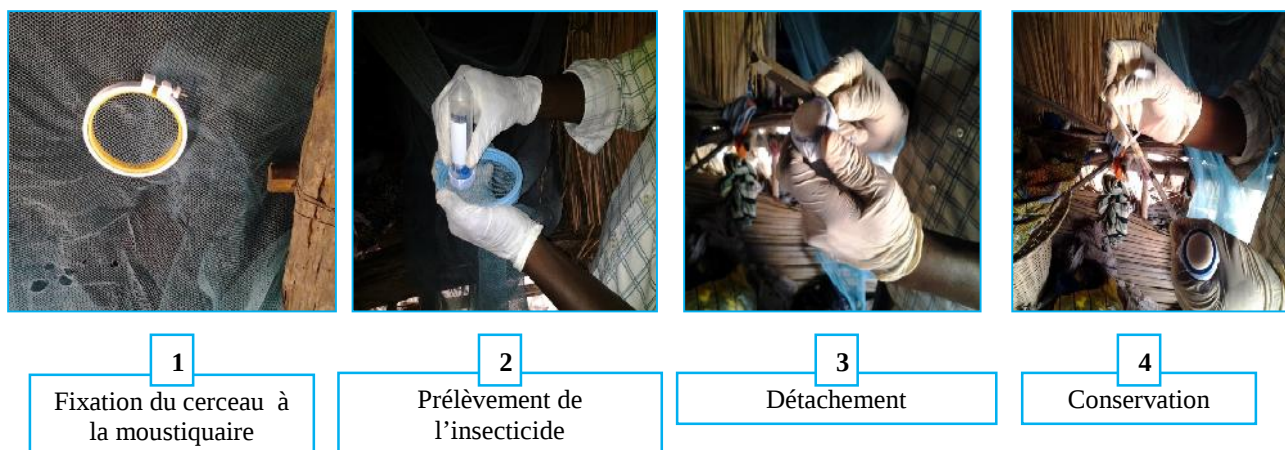


Photo 17: Différentes étapes de la technique de collecte d'insecticide

L'insecticide absorbé par le papier optique est ensuite extrait. L'extraction se fait par ajout de 100 μ l d'une solution de Triphényl phosphate (TPP) sur le contenu de la seringue. Après 5 minutes, 100 μ l de la même solution est ajouté à nouveau sur le contenu. L'éluant final est ensuite récupéré dans un tube eppendorf.

- Dosage de l'insecticide

1 μ l de l'éluant est injecté dans un chromatographe (SRI 8610C GAZ CHROMATOGRAPHE). Le standard interne (TPP) et la perméthrine sont identifiés et séparés grâce à un détecteur à ionisation de flamme utilisant de l'hydrogène comme gaz vecteur (Photo 18). Le signal de l'échantillon est comparé avec celui obtenu lors du calibrage et la quantité de perméthrine présente à la surface échantillonnée est déterminée.



Photo 18: Dosage de l'insecticide par chromatographie gazeuse

- Test en cône

Les cônes standards fournis par l'OMS sont en PolyVinyl-Chloride (PVC). Les moustiques ont des difficultés à se poser sur cette matière. L'avantage est leur contact avec le fragment de moustiquaire sur lequel est posé le cône. On a l'assurance que les tarsi du moustique sont

uniquement en contact avec les fibres traitées. On place le fragment de moustiquaires (surface : 0,25 m x 0,25 m soit 0,0625 m²) entre deux plaques de Plexiglas transparent comportant quatre trous à l'emplacement exact où doivent se trouver les cônes. Ce dispositif est fixé grâce à 4 pinces "double clips" et maintenu obliquement à 40° pour une bonne observation sur un support grillagé métallique ou en bois recouvert. L'orifice des cônes est fermé à l'aide d'un bouchon en polyéthylène sur lequel les moustiques ne peuvent pas se poser. Quatre tests en cône sont réalisés pour chaque moustiquaire. Des moustiques femelles sont sélectionnés et partagés par lot de 5 dans chacun des cônes. Les moustiques sont laissés en contact de la moustiquaire pendant 3 minutes puis retirés et mis dans quatre gobelets correspondants chacun aux lots de moustique de chaque cône. Ils sont ensuite alimentés au jus sucré (solution de saccharose à 10%). Les gobelets sont soigneusement conservés sur un portoir dans une salle à une température de 25°C et une hygrométrie de 20% à la fin des bio-essais. La mortalité des moustiques est lue 24 heures après la manipulation (WHO 2011).

- Calibrage du test chromatographique

Afin d'identifier plus facilement les moustiquaires non efficaces à partir des quantités d'insecticide, il était important de procéder à un calibrage du test chromatographique. Le but du calibrage est d'établir une relation entre la quantité d'insecticide à la surface des MIILD et la mortalité induite par les tests en cône tel que décrit précédemment pour la méthode chromatographique.

37 moustiquaires Olyset® (11 neuves et 26 en usage ayant des quantités d'insecticide différentes) ont été soumises simultanément aux tests en cône OMS et aux tests chromatographiques. L'interprétation des résultats a été effectuée sur la base de la méthode de comparaison, décrite précédemment pour la méthode colorimétrique. Une valeur seuil a été établie en comparant les résultats de GC avec les résultats des bio-essais en cône pour les mêmes moustiquaires.

2. 3.3.6. Analyse de données

- Taux de survie/Taux de perte des MIILD

Pour estimer les taux de survie ainsi que les taux de perte des moustiquaires marquées, nous avons utilisé les équations suivantes :

$$\frac{\text{Nombre de MIILDs marquées présentes dans les ménages}}{\text{Nombre total de MIILDs marquées à la sélection (T}_0\text{)}} \times 100$$

Si un ménage était fermé, lors d'une visite d'évaluation, il a été censuré selon la méthode d'analyse non-paramétrique de survie de Kaplan-Meier (Tableman & Kim 2003). La survie des moustiquaires en fonction du temps a été comparée aux modèles d'estimation de la durée

de vie utile de 2 et 3 ans développés par NetCALC (<http://www.networksmalaria.org>) et recommandés par Roll Back Malaria. Les équations utilisées pour le calcul des taux de perte associés aux différentes raisons pour lesquelles les moustiquaires marquées n'étaient plus présentes dans les ménages sont les suivants:

- Taux de perte-1 : (Raison : dommages physiques)

$$\frac{\text{Nombre de moustiquaires absentes des ménages à cause des trous ou déchirures}}{\text{Nombre total de MILDs sélectionnées à T0}} \times 100$$

- Taux de perte-2 : (Raison : déplacement)

$$\frac{\text{Nombre de Moustiquaires données, volées, vendues ou utilisées ailleurs}}{\text{Nombre total de MILDs sélectionnées à T0}} \times 100$$

- Taux de perte-3 : (Raison : autres utilisations)

$$\frac{\text{Nombre de moustiquaires utilisées pour d'autres activités}}{\text{Nombre total de MILDs sélectionnées à T0}} \times 100$$

Deux communautés ont été considérées comme ayant des taux de survie/perte significativement différents si les intervalles de confiance à 95%, déterminés selon la méthode binomiale d'intervalle de confiance (Rothman 2012), ne se chevauchent pas.

- Intégrité physique

L'intégrité physique a été quantifiée sur la base de deux mesures:

- 1) La proportion de moustiquaires avec n'importe quel trou.

$$\frac{\text{Nombre total de MILDs marquées trouées}}{\text{Nombre total de MILDs marquées présentes dans les ménages}} \times 100$$

- 2) L'indice proportionnel de trous (pHI) de chaque moustiquaire

Le pHI est calculé en faisant la somme de:

- Nombre de trous de catégorie 1 $\times$ 1
- Nombre de trous de catégorie 2 $\times$ 23
- Nombre de trous de catégorie 3 $\times$ 196
- Nombre de trous de catégorie 4 $\times$ 576

Ceci permet d'estimer la valeur approximative de la surface des trous. La formule du pHI se présente alors comme suit :

$$\text{pHI} = 1 \times \#C1 + 23 \times \#C2 + 196 \times \#C3 + 576 \times \#C4 \quad (\#C = \text{nombre de trous de la catégorie})$$

Les chiffres 1, 23, 196, et 576 représentent les surfaces moyennes estimées pour chaque catégorie de trous. Nous avons utilisé la statistique descriptive pour comparer les pHI obtenus sur chaque site (Moyenne, Médiane, Intervalle interquartile).

Sur la base des pHI calculés, chaque moustiquaire a été catégorisée comme suit (Kilian/ Roll Back Malaria: Measurement of Net Durability in the Field: Current Recommended Methodology, presented in Lyon, February 2012) :

- pHI<64 : moustiquaire « en bon état » ;
- pHI<768 : moustiquaire « à réparer » ;
- pHI>768 : moustiquaire « à remplacer ».

Pour apprécier l'influence des pressions exercées sur les MIILD par les utilisateurs et les facteurs de proximité à un cours d'eau sur l'intégrité physique des MIILD, nous avons utilisé la régression Binomiale Négative (McCullagh & Nelder 1989) en prenant le paramètre pHI comme variable d'intérêt. Une analyse de la variance de type III de la régression (Fox & Weisberg 2011) a permis d'apprécier la part d'influence de chaque facteur sur le pHI, qui est un paramètre qui résume l'intégrité physique des MIILD.

- Bio-efficacité

Le Receiver Operating Characteristics (ROC) test, appliqué aux deux ensembles de données, GC et test en cône de l'OMS, a été utilisé pour définir la valeur « seuil » d'insecticide dans les moustiquaires qui pourrait correspondre au seuil des tests en cône OMS. Une concentration minimale de perméthrine a été identifiée et utilisée comme une valeur « seuil » pour estimer le pourcentage de moustiquaires en dessous des normes minimales de bio-efficacité définies par l'OMS. Le t-test de student a été utilisé pour comparer les résultats des tests de bio-efficacité sur les différents sites.

Chapitre 3 :

Distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l et dynamique de la transmission de *Plasmodium falciparum* au Bénin

Cette étude est consacrée à la distribution des espèces d'anophèles rencontrées au Bénin et à l'intensité de leur contact avec l'homme et le parasite majeur du paludisme, *Plasmodium falciparum*, dans différentes zones géographiques. Cela a pour but d'établir les niveaux de transmission du paludisme rencontrés au Bénin (les zones de faible et de forte transmission, les zones où la transmission est brève et celles où elle est longue) afin d'aider le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) à prendre des décisions éclairées sur le choix des ses stratégies de lutte antivectorielle.

Pour cela, nous avons évalué :

- la diversité culicidienne et la distribution spatio-temporelle des espèces du complexe *An. gambiae* ;
- la densité agressive des culicidae, leur degré d'endophagie et d'exophagie sur chaque site d'étude ;
- la variation de l'âge physiologique des anophèles au niveau de chaque site ;
- la variation du degré d'endophilie (comportement de repos à l'intérieur des habitations) et du degré d'exophilie des anophèles au niveau de chaque site ;
- le taux d'infectivité des anophèles au niveau de chaque site ;
- le taux d'inoculation entomologique au niveau de chaque site.

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

Article 1 :

Gnanguenon et al. *Malaria Journal* 2014, **13**:444
<http://www.malariajournal.com/content/13/1/444>



RESEARCH

Open Access

Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin

Virgile Gnanguenon^{1,2*}, Renaud Govoetchan^{1,2}, Fiacre R Agossa^{1,2}, Razaki Ossè^{1,3}, Frédéric Oke-Agbo¹, Roseric Azondekon¹, Arthur Sovi^{1,2}, Roseline Attolou^{1,2}, Kefilath Badirou^{1,2}, Filémon T Tokponnon^{1,2,4}, Gil G Padonou^{1,2} and Martin C Akogbeto^{1,2}

1. Résultats

1.1. Diversité des moustiques

Environ 14056 moustiques ont été capturés sur homme dans l'ensemble des différentes zones d'étude. Les moustiques capturés appartiennent à six genres (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Coquilletidia* et *Uranotenia*) et 23 espèces (Tableau IV). Deux principaux vecteurs du paludisme ont été collectés: *Anopheles gambiae* s.l (qui se retrouve partout, et représente 70,1% du total des moustiques: 9861/14056) et *Anopheles funestus* (retrouvé à Allada, Kandi et Dassa : 0,1%). *Anopheles nili*, un vecteur local, a été capturé, mais à de très faibles effectifs à Parakou et Malanville (0,1%). *Anopheles pharoensis*, *Anopheles ziemanni*, *Anopheles broheri*, *Anopheles fuscicolor* et *Anopheles coustani* ont été également collectés.

Culex quinquefasciatus et d'autres espèces du genre *Culex* ont été collectés à de faibles densités (Tableau IV). Cependant, *Cx quinquefasciatus* a été le principal moustique collecté à Dassa (71%) et la deuxième espèce de moustique à agresser l'homme à Parakou (22%) et Kandi (27%). *Mansonia africana* représente la troisième espèce de moustique avec une activité agressive majeure surtout dans les localités comme Adjohoun (69%), Pobè (54%) et Allada (26%). *Coquilletidia cristata*, *Uranotenia bilineata* et certaines espèces du genre *Aedes* ont été identifiés uniquement sur certains sites (Tableau IV).

La richesse spécifique observée à Malanville est significativement plus élevée que celles de Ouidah, Dassa et Parakou ($p < 0,05$). Le nombre d'espèces collectées à Dassa (7) est significativement plus faible que ceux observés à Kandi (13), Parakou (12) et Adjohoun (13) ($p < 0,05$).

Les indices de Shannon-Wiener estimés pour les localités comme Allada, Parakou et Pobè sont significativement supérieurs à ceux des autres localités (Tableau IV). Quant aux indices de diversité de Simpson, ils montrent que la probabilité pour que deux moustiques pris au hasard appartiennent à la même espèce est élevée dans toutes les localités sauf à Pobè et Allada. L'équitabilité est faible (0,11 à 0,38) sur tous les sites sauf à Pobè (0,60). Ce qui suggère que la majorité des effectifs est concentrée sur une seule espèce à Adjohoun, Ouidah, Allada, Dassa, Parakou, Kandi et Malanville. Par contre à Pobè, le peuplement en culicidé est plat (le tirage des espèces est équiprobable).

On observe un croisement entre les profils de diversité des différentes localités pour des valeurs d'alpha inférieures à 0,72 (Figure 14). Ce qui montre qu'en général la diversité culicidienne est similaire entre les sites d'étude malgré que les profils d'Allada et de Pobè soient plus élevés que ceux des autres localités pour les valeurs d'alpha supérieures à 0,72.

Tableau IV: Diversité culicidienne observée sur les sites d'étude

	Allada		Dassa		Parakou		Kandi		Malanville		Adjohoun		Pobè		Ouidah	
Espèces	ni	Pi	ni	Pi	Ni	pi	Ni	pi	ni	Pi	ni	Pi	ni	Pi	ni	Pi
<i>Anopheles gambiae</i>	143	0,42	219	0,28	1239	0,59	653	0,69	3912	0,87	23	0,02	8	0,10	3906	0,88
<i>Anopheles funestus</i>	18	0,05	1	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Anopheles nili</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	5	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Anopheles pharoensis</i>	11	0,03	0	0,00	20	0,01	2	0,00	71	0,02	4	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Anopheles ziemanni</i>	2	0,01	0	0,00	5	0,00	0	0,00	12	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Anopheles broheri</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Anopheles coustani</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Anopheles fuscicolor</i>	0	0,00	0	0,00	16	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aedes aegypti</i>	6	0,02	0	0,00	0	0,00	3	0,00	10	0,00	1	0,00	1	0,01	11	0,00
<i>Aedes vitatus</i>	6	0,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00	40	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aedes luteocephalus</i>	1	0,00	0	0,00	2	0,00	2	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aedes gr. Palpalis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	25	0,01	7	0,01	0	0,00	3	0,00
<i>Aedes gr. Tarsalis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Aedes sp.</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	13	0,01	4	0,00	10	0,01	0	0,00	0	0,00
<i>Culex quinquefasciatus</i>	43	0,13	546	0,71	455	0,22	250	0,27	293	0,06	259	0,23	19	0,23	183	0,04
<i>Culex gr decens</i>	4	0,01	0	0,00	3	0,00	0	0,00	2	0,00	10	0,01	3	0,04	241	0,05
<i>Culex nebulosus</i>	12	0,04	6	0,01	9	0,00	4	0,00	10	0,00	15	0,01	7	0,08	31	0,01
<i>Culex annulioris</i>	1	0,00	0	0,00	14	0,01	1	0,00	25	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Culex fatigans</i>	3	0,01	0	0,00	5	0,00	5	0,01	0	0,00	18	0,02	0	0,00	1	0,00
<i>Culex thalassius</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	13	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Mansonia africana</i>	88	0,26	1	0,00	320	0,15	3	0,00	0	0,00	776	0,69	45	0,54	44	0,01
<i>Coquilletidia cristata</i>	0	0,00	1	0,00	0	0,00	0	0,00	97	0,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Uranotenia bilineata</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	0,01	0	0,00	2	0,00
Total	338	1	774	1	2089	1	940	1	4522	1	1130	1,00	83	1	4422	1
Taxas_S	13		6		12		12		17		12		6		10	
Indice de Shannon	1,66		0,65		1,12		0,78		0,63		0,91		1,27		0,60	
Indice de Simpson	0,27		0,59		0,42		0,56		0,75		0,55		0,36		0,72	
Indice d'équitabilité	0,38		0,27		0,25		0,17		0,11		0,21		0,60		0,18	

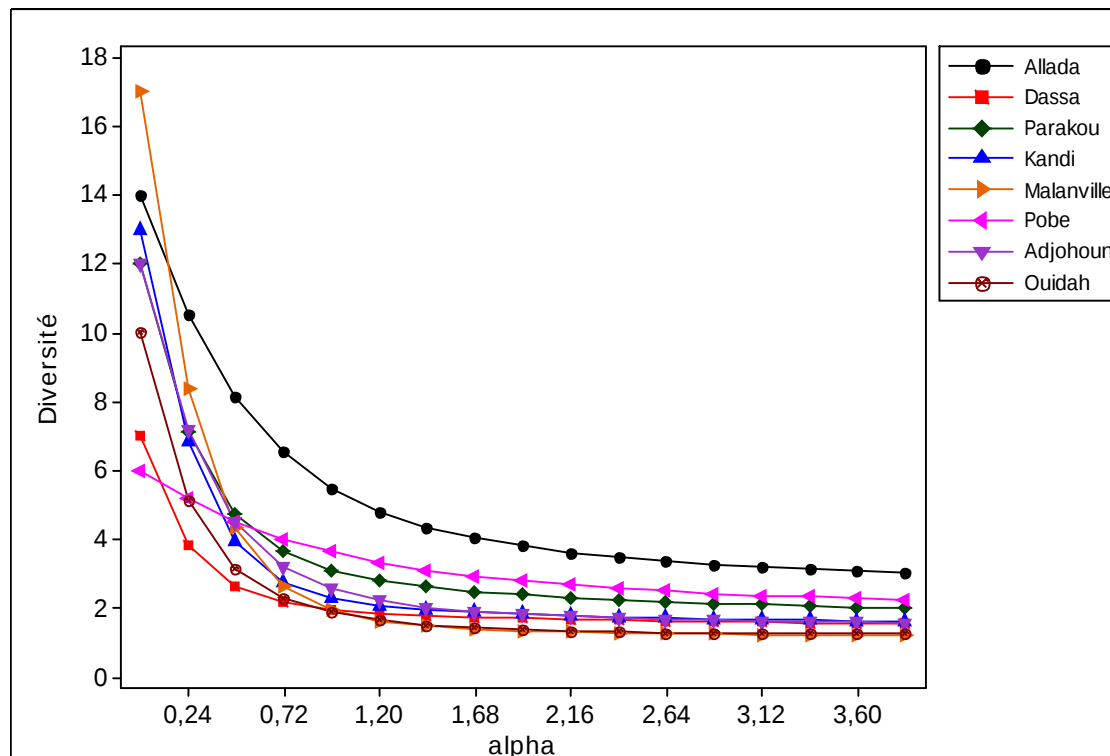


Figure 14: Profil de diversité observée sur les différents sites d'étude

1.2. Répartition spatio-temporelle des espèces du complexe *An. gambiae*

Sur les 1142 *An. gambiae* s.l passés à la PCR (pour l'identification des espèces), quatre espèces du complexe *An. gambiae* ont pu être identifiées : *An. coluzzii* (48% [45,19-50,97]), *An. gambiae* (30% [27,19-32,49]), *An. melas* (8% [6,95-10,06]) et *An. arabiensis* (14% [11,95-15,96]). La distribution de ces espèces varie dans le temps et dans l'espace (Figure 15).

Précédemment identifié dans la partie septentrionale du Bénin (de Malanville à Parakou), *An. arabiensis* a été retrouvé à Dassa et Allada, soit environ 365 km de son aire de répartition initiale. *An. arabiensis* (43%) et *An. coluzzii* (48%) prédominent à Allada de Mars à Mai. De Juillet à Novembre, la densité de *An. arabiensis* diminue jusqu'à 16% pendant que celle de *An. gambiae* augmente de 9 à 46% dans la commune. Il a été identifié à Dassa, Kandi et Malanville entre Juillet et Septembre (Figure 15) alors qu'à Parakou, il est présent durant toute la saison de transmission avec une forte prédominance en Novembre (Figure 15). Quant à *An. coluzzii* et *An. gambiae*, ils sont présents pendant toute la durée de la saison de transmission sur tous les sites ($p < 0,0001$). *An. coluzzii* prédomine de Mars à Novembre à Malanville alors que *An. gambiae* n'a été retrouvé sur ce site que dans le mois de Septembre (Figure 15). *An. gambiae* prédomine à Kandi et à Parakou de Juin à Juillet ($p < 0,05$) pendant que *An. coluzzii* prédomine durant le reste de la période de transmission ($p < 0,05$). A Allada,

Adjohoun et Dassa, *An. coluzzii* et *An. gambiae* sont présents dans des proportions similaires ($p>0,05$) (Figure 15).

An. melas a été uniquement retrouvé à Djègbadji (Ouidah) où il prédomine à 65% [56,61-71,89] contre 24% pour *An. coluzzii* et 9% pour *An. gambiae* (Figure 15).

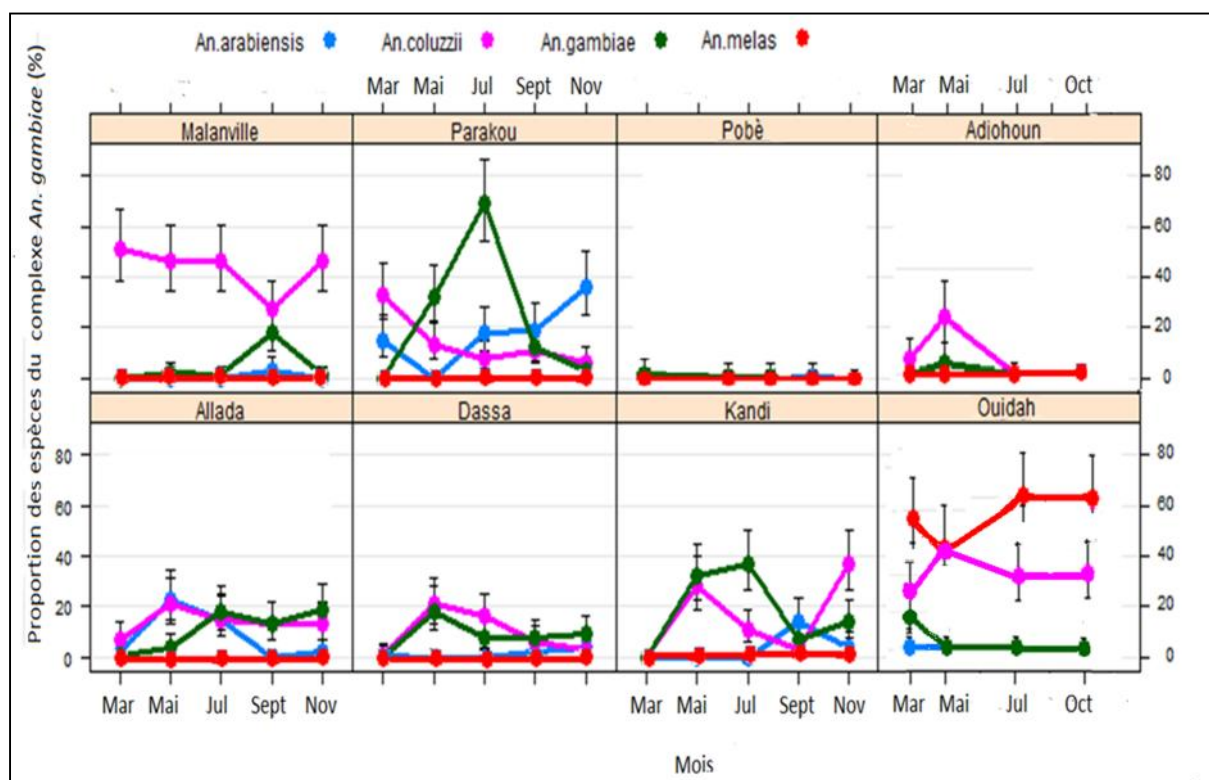


Figure 15: Distribution spatio-temporelle des espèces du complexe *An. gambiae*

1.3. Agressivité de *Anopheles gambiae* s.l

L'agressivité de *An. gambiae* s.l varie significativement d'une commune à une autre ($p<0,0001$). A Adjohoun et Pobè, elle est très faible. Elle est inférieure à une piqure/homme/nuit (Tableau V). Dans les communes d'Allada et Dassa, le taux d'agressivité est de 2 à 3 piqures/homme/nuit. L'agressivité de *An. gambiae* s.l est plus élevée à Kandi que dans les communes précédentes (8 piqures/homme/nuit). Elle est encore plus élevée à Parakou avec environ 15 piqures/homme/nuit. Les agressivités maximales de *An. gambiae* s.l ont été observées dans les communes situées à l'extrême Nord (Malanville) et à l'extrême Sud (Ouidah) du Bénin. Le taux de piqure observé dans ces deux localités est d'environ 49 piqures/homme/nuit et est significativement très élevé par rapport à ceux observés dans les autres communes ($p<0,05$).

La comparaison de l'agressivité des anophèles en milieu urbain et en milieu rural montre qu'elle est deux fois plus élevée en zone rurale qu'en zone urbaine (Rate Ratio=2,41 ;

p=0,003). Elle est en moyenne de 9 piqûres/homme/nuit en zone urbaine contre 22 piqûres/homme/nuit en zone rurale.

Mais à l'intérieur et à l'extérieur des habitations, le taux de piqûre est similaire (14 piqûres/homme/nuit contre 17 piqûres/homme/nuit ; p=0,31). L'indice d'endophagie (ENGI) de *An. gambiae s.l* est en moyenne de 0,44 contre 0,56 pour l'exophagie (EXGI).

En saison sèche, l'agressivité moyenne observée est d'environ 11 piqûres/homme/nuit (Tableau V). Elle augmente significativement jusqu'à 18 piqûres/homme/nuit en saison pluvieuse (p<0,0001).

Tableau V: Variations du taux de piqûre observées chez *An. gambiae s.l*

Variables	Modalités	N	PHN	IC-95%	RR&IC-95%	P (Wald test)	P (LR test)
Sites	Adjohoun	23	0,28 ^f	[00,18- 00,43]	-	-	<0,0001
	Pobè	08	0,10 ^f	[00,04-00,19]	-	-	
	Ouidah	3906	48,82 ^a	[47,30- 50,38]	-	-	
	Allada	143	1,79 ^e	[01,50- 02,10]	-	-	
	Dassa	219	2,74 ^e	[02,39-03,12]	-	-	
	Parakou	1239	15,49 ^c	[14,63-16,37]	-	-	
	Kandi	653	8,16 ^d	[07,55-08,81]	-	-	
	Malanville	3912	48,90 ^a	[47,38-50,46]	-	-	
Urbanisation	Zone urbaine	2965	09,26 ^b	[08,93- 09,60]	1,00	-	0,00377
	Zone périphérique	7138	22,30 ^a	[21,79- 22,82]	2,41 [2,30-2,51]	0,00157	
Emplacement	Intérieur	4507	14,08 ^a	[13,68-14,50]	1,00	-	0,3098
	Extérieur	5596	17,49 ^a	[17,03-01,95]	1,24 [1,19-1,29]	0,31061	
Saison	Sèche	1900	10,79 ^b	[10,31-11,29]	1,00	-	<0,0001
	Pluvieuse	8203	17,68 ^a	[17,30-18,06]	1,63 [1,55- 1,72]	0,000062	

Les fortes densités anophéliennes (Figure 16, 17, 18, 19 et 20) ont été observées entre Mai et Juillet (au cours de la grande saison pluvieuse) sur les sites d'étude. Cependant, malgré la forte tendance qu'a l'agressivité anophélienne à varier en fonction de la pluviométrie, elle semble ne pas être uniquement dépendante de ce facteur. Ce qui explique les taux de piqûre élevés au cours de certains mois (vers la fin de l'année) alors que la pluviométrie est faible (Figure 16, 17, 18, 19 et 20). Il faut également noter que le rythme pluviométrique varie d'une région à une autre (Figure 16, 17, 18, 19 et 20) et pourrait également expliquer les variations de l'agressivité des vecteurs entre les sites d'étude.

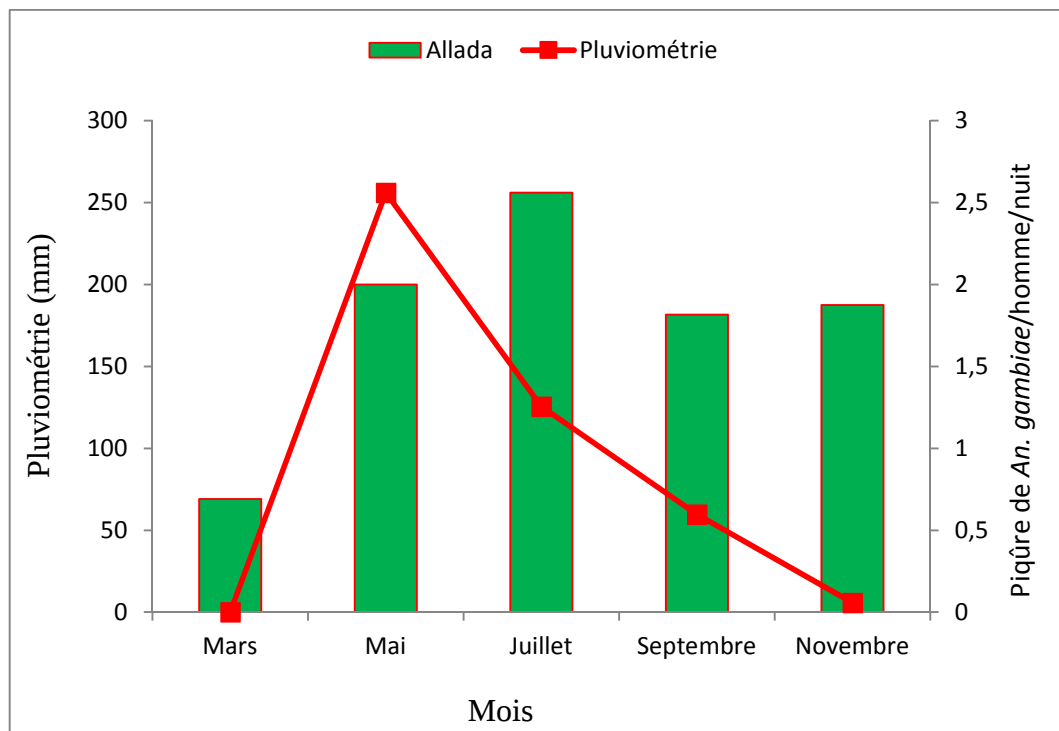


Figure 16: Variation de la densité agressive de *An. gambiae s.l* en fonction de la pluviométrie à Allada

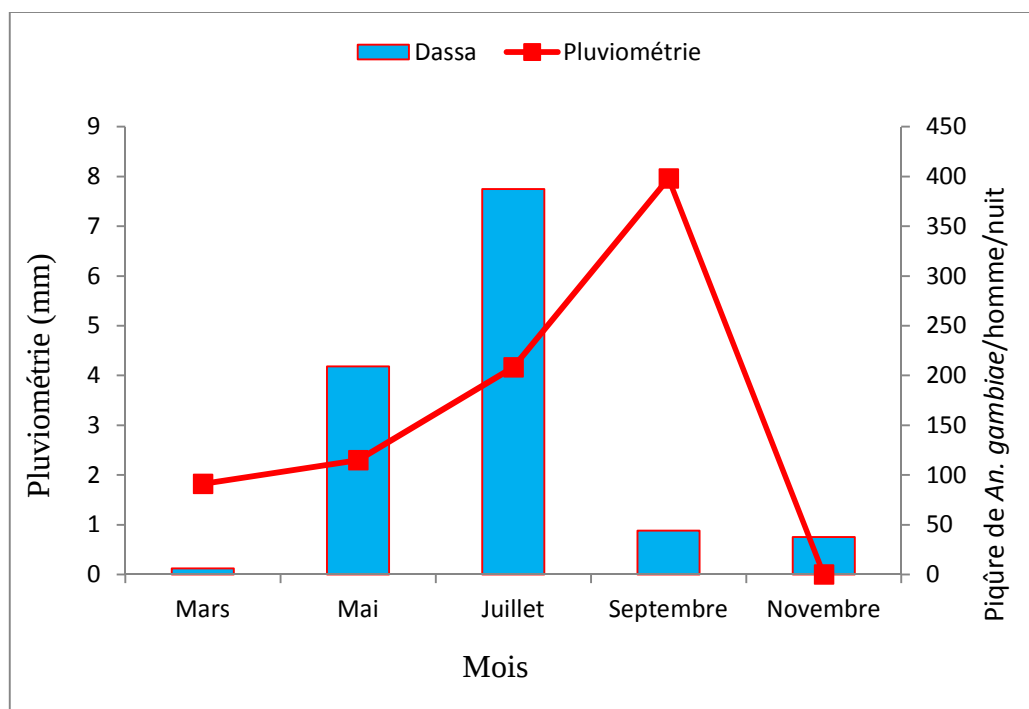


Figure 17: Variation de la densité agressive de *An. gambiae s.l* en fonction de la pluviométrie à Dassa

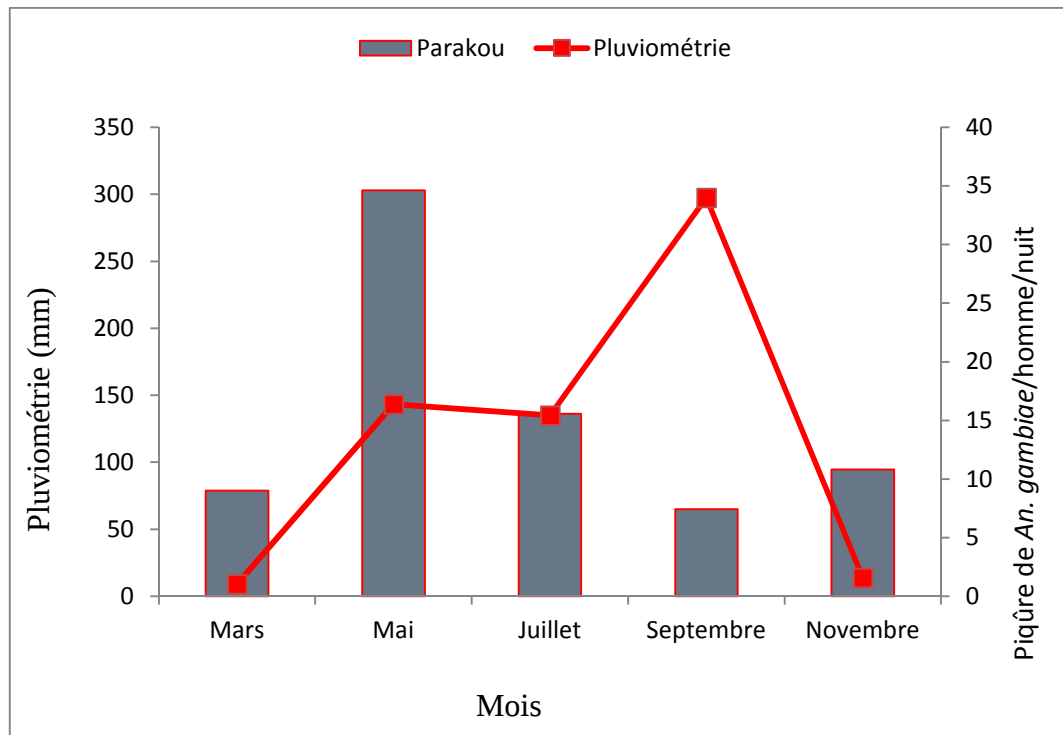


Figure 18: Variation de la densité agressive de *An. gambiae s.l* en fonction de la pluviométrie à Parakou

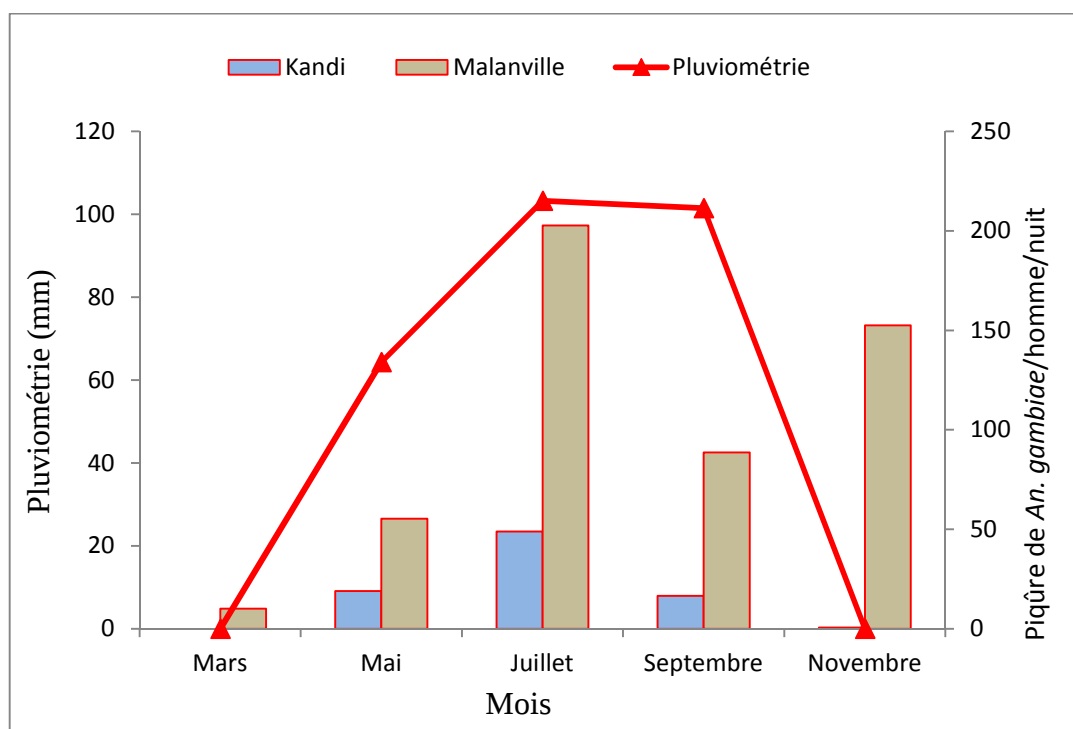


Figure 19: Variation de la densité agressive de *An. gambiae s.l* en fonction de la pluviométrie à Kandi et Malanville

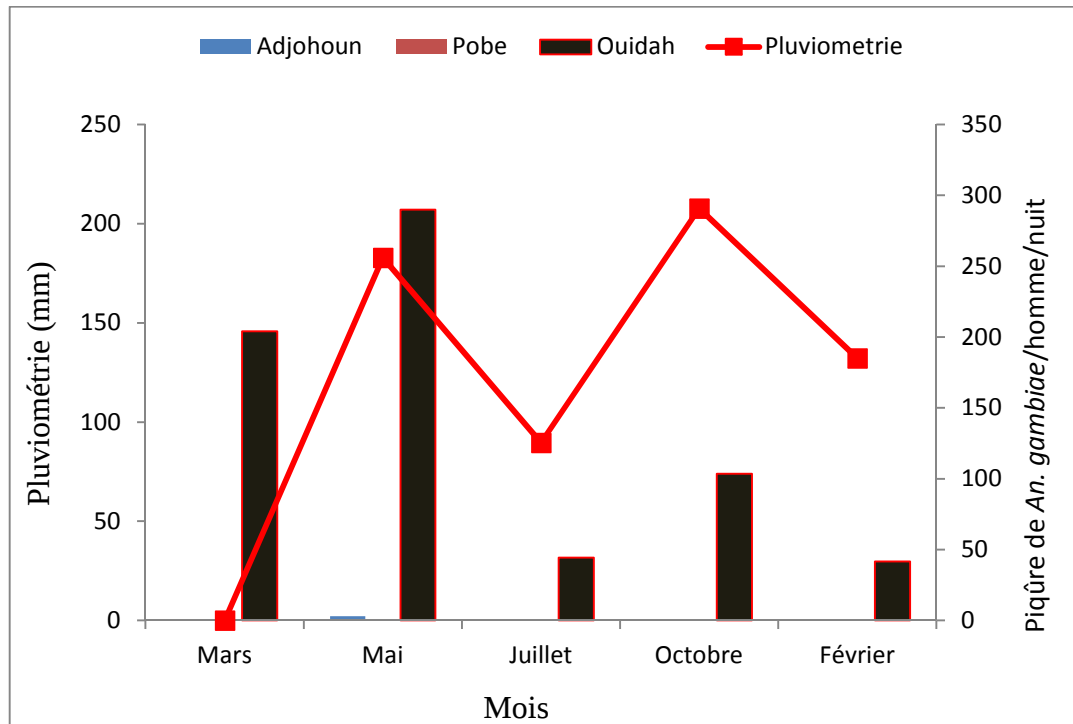


Figure 20: Variation de la densité agressive de *An. gambiae s.l* en fonction de la pluviométrie à Adjohoun, Pobè et Ouidah

1.4. Agressivité d'autres Culicidae

L'abondance d'autres espèces de moustique est significativement plus faible par rapport à celle de *An. gambiae s.l* ($p < 0,05$). Elle varie d'un site à l'autre (Tableau VI). Contrairement à *An. gambiae s.l*, les densités agressives des autres Culicidae sont similaires entre les zones urbaines et périphériques avec en moyenne 6 piqûres/homme/nuit en zones urbaines contre 7 piqûres/homme/nuit dans les zones périphériques. Cependant, les autres Culicidae piquent plus à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations ($p=0,005$) avec un indice d'endophagie (ENGI) de 0,38 contre 0,62 pour l'indice d'exophagie (EXGI). En saison sèche, leurs piqûres sont les plus observées dans les communautés ($p=0,0033$).

Tableau VI: Variations du taux de piquûre observées chez les autres moustiques nuisants

Variables	Modalités	N	PHN	IC-95%	RR&CI-95%	P (Wald test)	P (LR test)
Sites	Adjohoun	1189	14,86a	[13,96-15,66]	-	-	<0.0001
	Pobè	141	01,76d	[1,48-2,07]	-	-	
	Ouidah	591	07,39b	[6,80-8,01]	-	-	
	Allada	195	02,43	[2,10-2,80]	-	-	
	Dassa	555	06,94c	[6,37-7,53]	-	-	
	Parakou	850	10,62b	[9,92-11,36]	-	-	
	Kandi	287	3,59d	[3,18- 4,02]	-	-	
	Malanville	610	7,62b	[7,03- 8,25]	-	-	
Urbanisation	Zone urbaine	1993	6,22a	[5,95- 6,50]	1.00	-	0.18529
	Zone périphérique	2425	7,57a	[7,27 7,88]	1,21 [1,14-1,29]	0.18664	
Emplacement	Intérieur	1665	5,20b	[4,95-5,45]	1.00	-	0.00551
	Extérieur	2753	8,60a	[8,28- 8,93]	1.65 [1,55- 1,76]	0.005965	
Saison	Pluvieuse	2811	6,06a	[5,83- 6,28]	1.00	-	0.0033
	Sèche	1607	9,13b	[8,68-9,58]	1.51 [1,42-1,60]	0.004197	

1.5. Longévité de *An. gambiae s.l*

Au cours de cette étude, 2228 ovaires de *An. gambiae s.l* collectés sur homme (en saisons sèches et saisons pluvieuses) ont été disséqués (Tableau VII). La majorité des *An. gambiae s.l* disséqués sont âgés avec un taux de parturité moyen de 86% (IC 95% : 82,14-89,88). Ce taux de parturité représente le pourcentage de femelles ayant pris au moins un repas de sang et pondu des œufs. Il varie significativement entre les populations de *An. gambiae s.l* ($p < 0,0001$). Il est d'environ 75% à Adjohoun, Ouidah et Dassa. Par contre, dans les communes Pobè, Allada, Parakou, Kandi et Malanville, le degré de vieillissement des populations de *An. gambiae s.l* semble plus élevé avec des taux de parturité de plus de 80%. Le taux de parturité maximal a été observé à Kandi avec environ 90% de moustiques pares.

Tableau VII: Taux de parturité de *An. gambiae s.l* par commune

Localité	N disséqué	N pares	Parturité (%)	p-value
Adjohoun	20	15	75,00	<0,0001
Pobè	6	5	83,33	
Ouidah	392	301	76,79	
Allada	143	126	88,11	
Dassa	134	103	76,87	
Parakou	579	513	88,60	
Kandi	465	420	90,32	
Malanville	489	432	88,34	
Total	2228	1915	85,95	

1.6. Exophilie et endophilie de *An. gambiae s.l*, *Mansonia spp.* et *Culex spp.*

Au total, 2911 moustiques ont été collectés dans les pièges-fenêtres et après aspersion d'une bombe aérosol le matin dans les habitations (Tableau VIII). Ils appartiennent à trois principaux genres (*Anopheles*, *Mansonia*, et *Culex*). Le principal vecteur collecté dans les habitations est *An. gambiae s.l* avec un effectif total de 1266. Les autres espèces collectées appartiennent aux genres *Mansonia* et *Culex* avec un effectif total de 1645 (Tableau VIII). L'exophilie observée chez *An. gambiae s.l* est en moyenne de 12% contre une endophilie très élevée de 88% ($p<0,05$) traduisant une forte tendance de ce vecteur à rester à l'intérieur des habitations pour la digestion de son repas de sang (Tableau VIII). Mais cette tendance varie d'une commune à une autre ($p<0,0001$). Elle est plus faible à Dassa (48%) et Ouidah (54%) comparativement aux autres communes ($p<0,05$). Dans certaines communes comme Pobè et Malanville, l'exophilie est très faible (0 à 3%).

Les autres moustiques responsables de nuisances pour l'homme (*Mansonia* et *Culex*) ont également montré une forte endophilie (81%). Cette endophilie est très élevée à malanville (99%) alors qu'elle est plus faible dans les autres communes (Tableau VIII). Les taux d'exophilie les plus élevés pour les *Mansonia* et les *Culex* ont été observés à Adjohoun (68%) et Allada (58%).

Tableau VIII: Exophilie et Endophilie observées chez les moustiques collectés par piège-fenêtres et après aspersion d'une bombe aérosol (sprays)

Localités	<i>An. gambiae s.l</i>				<i>Mansonia and Culex spp</i>			
	Fp	Sp	Exophilie(%)	Endophilie(%)	Fp	Sp	Exophilie(%)	Endophilie(%)
Adjohoun	1	3	25,00	75,00	26	12	68,42	31,58
Pobè	0	2	0,00	100,00	4	6	40,00	60,00
Ouidah	43	50	46,24	53,76	16	71	18,39	81,61
Allada	5	24	17,24	82,76	19	14	57,58	42,42
Dassa	12	11	52,17	47,83	80	122	39,60	60,40
Parakou	9	42	17,65	82,35	38	86	30,65	69,35
Kandi	54	199	21,34	78,66	118	183	39,20	60,80
Malanville	24	787	2,96	97,04	12	838	1,41	98,59
Total	148	1118	11,69	88,31	313	1332	19,03	80,97

FP= Piège-fenêtre ; Sp=Spray matinal

1.7. Taux de gorgement des moustiques

Les taux de gorgement observés chez les moustiques collectés dans les piège-fenêtres et après aspersion de bombe insecticide le matin dans les habitations sont élevés. Ils sont en moyenne de 83% pour *An. gambiae s.l* et de 80% pour les *Mansonia* et les *Culex*. Une variation significative dans les taux de gorgement des moustiques a été observée entre les sites ($p < 0,05$) (Tableau IX). Chez *An. gambiae s.l* les taux de gorgement les plus élevés ont été observés à Allada, Adjohoun, Pobè et Malanville (93,65 à 100%). Par contre le taux de gorgement le plus faible a été observé à Ouidah (17% ; $p < 0,05$).

Mansonia spp. et *Culex* spp. ont également montré un fort taux de gorgement dans les localités de Allada, Ouidah, Parakou et Kandi (72 à 93%). Mais dans les autres localités leurs taux de gorgement sont faibles (Tableau IX).

Tableau IX: Taux de gorgement des moustiques collectés dans les habitations

Localités	<i>An. gambiae</i>				<i>Mansonia and Culex spp</i>			
	Total	Gorgés	Taux de gorgement (%)	P-value	Total	Gorgés	Taux de gorgement (%)	P-value
Adjohoun	4	4	100 ^a	<0,0001	41	16	39,02 ^c	<0,0001
Pobè	2	2	100 ^a		12	6	50,00 ^b	
Ouidah	93	16	17,20 ^c		42	33	78,57 ^a	
Allada	29	29	100,0 ^a		33	29	87,87 ^a	
Dassa	23	13	56,52 ^b		202	97	48,01 ^b	
Parakou	51	41	80,39 ^{ab}		124	90	72,58 ^a	
Kandi	253	187	73,91 ^b		301	230	76,41 ^a	
Malanville	811	759	93,58 ^a		850	790	92,94 ^a	

Les taux de gorgement portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différents ($p < 0,05$)

1.8. Infectivité de *An. gambiae s.l*

Un total de 2291 tête-thorax de *An. gambiae s.l* ont été testés par ELISA CSP pour évaluer l'infectivité au *P. falciparum* chez ce vecteur. Environ 82 ont été testés positifs pour l'antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum* soit un taux d'infectivité (Is) moyen de 3,58%. Les Indices sporozoïtiques observés sont similaires ($p > 0,05$) entre zones urbaines (4,06%: 24 thorax+/ 591 thorax) et zones rurales (3,41%: 58 thorax +/ 1700 thorax). C'est généralement entre Mars et Juillet que le taux d'infectivité semble plus élevé dans les différents sites. Cependant, l'infectivité varie d'une commune à une autre et est en moyenne de 5,8% (31 thorax+/ 531 thorax) à Parakou, 5,6% (12 thorax +/214 thorax) à Dassa, 2,5% (7

thorax +/ 280 thorax) à Kandi, 4,4% (8 thorax + / 182 thorax) à Allada, 1,30% (8 thorax +/617 thorax) à Ouidah, 3,5% (16 thorax + / 451 thorax) à Malanville et 0% à Adjohoun et Pobè. Le taux d'infection le plus élevé a été observé à Dassa urbain et le plus faible a été observé à Pobè (Tableau X et XI).

Tableau X: Variation des taux d'infectivité de *An. gambiae s.l* à Allada, Dassa, Parakou, Kandi Malanville et les périodes d'étude

Localités		Mars	Mai	Juillet	Septembre	Novembre	Is moyen (%)	RR	CI-95%	P-value
Allada urbain	Thorax	4	33	23	13	14	5,75	1,00	—	0,49
	Thorax+	0	2	1	1	1				
	Is	0	6,06	4,35	7,69	7,14				
Allada rural	Thorax	7	24	24	20	16	3,30	0,97	[0,91-1,04]	
	Thorax+	0	1	0	0	2				
	Is	0	4,17	0	0	12,5				
Dassa urbain	Thorax	0	18	23	5	7	6,86	1,00	—	0,73
	Thorax+	0	0	0	1	1				
	Is	0	0	0	20	14,29				
Dassa rural	Thorax	2	60	77	13	9	5,38	1,03	[0,96-1,10]	
	Thorax+	0	3	5	2	0				
	Is	0	5	6,49	15,38	0				
Parakou urbain	Thorax	19	40	44	29	50	5,39	1,00	—	0,57
	Thorax+	1	0	5	3	0				
	Is	5,26	0	11,36	10,34	0				
Parakou rural	Thorax	125	50	46	78	50	4,71	1,01	[0,97-1,06]	
	Thorax+	16	3	1	2	0				
	Is	12,8	6	2,17	2,56	0				
Kandi urbain	Thorax	0	9	3	24	4	0	1,00	—	0,60
	Thorax+	0	0	0	0	0				
	Is	0	0	0	0	0				
Kandi rural	Thorax	0	87	90	60	1	1,8	-	—	
	Thorax+	0	3	2	2	0				
	Is	0	3,45	2,22	3,33	0				
Malanville urbain	Thorax	11	41	48	40	50	4,84	1,00	—	0,61
	Thorax+	1	1	2	1	3				
	Is	9,09	2,44	4,17	2,5	6				
Malanville rural	Thorax	67	59	47	38	50	2,72	0,99	[0,95-1,03]	
	Thorax+	4	2	2	0	0				
	Is	5,97	3,39	4,26	0	0				
Total	Thorax	235	421	425	320	251	4,48			
	Thorax+	22	15	18	12	7				
	Is	9,36	3,56	4,24	3,75	2,79				

Tableau XI: Variation des taux d'infectivité entre Adjohoun, Pobè, Ouidah et les périodes d'étude

Localités		Mars	Mai	Juillet	Octobre	Février	Is moyen (%)	RR	CI-95%	P-value
Adjohoun urbain	Thorax	1	4	0	0	0				
	Thorax+	0	0,00	0,00	0	0	0	-	-	
	Is	0	0	-	-	0				-
Adjohoun rural	Thorax	2	8	0	0	0				
	Thorax+	0	0,00	0,00	0	0	0	-	-	
	Is	0	0	-	-	0				
Pobè urbain	Thorax	1	0	0	4	0				
	Thorax+	0	0,00	0,00	0	0	0	-	-	
	Is	0	0	-	0	-				-
Pobè rural	Thorax	0	0	0	2	0				
	Thorax+	0	0,00	0,00	0	0	0	-	-	
	Is	-	-	-	0	-				
Ouidah urbain	Thorax	22	0	6	1	0				
	Thorax+	0	0,00	0	0	0,00	0	1,00	-	
	Is	0	0	-	0	0				
Ouidah rural	Thorax	98	100	99	94	197				P>0,999
	Thorax+	0	2,00	6,00	0	0	1,36	1,03	0,00-11,87	
	Is	0	2	6,06	0	0				
Total	Thorax	124	112	105	101	197				
	Thorax+	0	2	6	0	0				
	Is	0,00	1,79	5,71	0,00	0,00				

1.9. Taux d'inoculation entomologique de *An. gambiae sensu lato*

Les tableaux XII et XIII montrent la répartition des taux d'inoculation entomologique (TIE) dans chaque localité. Ces TIE varient significativement d'une commune à une autre ($p < 0,0001$). Le taux le plus faible a été observé à Pobè (0 piqûre infectante/homme/an) (Tableau XII) alors que le taux le plus élevé a été observé à Malanville (2368 piqûres infectantes/homme/an). Les taux d'inoculation entomologique observés à Malanville, Ouidah, Kandi, Parakou et Dassa sont tous significativement plus élevés que ceux obtenus à Allada, Adjohoun et Pobè ($p < 0,05$). A Malanville, les piqûres infectantes ont été enregistrées chaque mois, de Mars à Novembre. Par contre à Ouidah où le TIE annuel est également élevé, les piqûres infectantes n'ont été observées qu'en Mai et en Juillet. Parakou est également caractérisé par une forte transmission du paludisme avec des TIE allant de 638 à 1750

piqûres infectantes/homme/an dans les zones rurales et urbaines. Les taux d'inoculation entomologique les plus bas ont été observés à Pobè, Adjohoun et Kandi urbain avec 0 piqûre/homme/an. De façon générale, les taux d'inoculation entomologique observés sont significativement plus élevés dans les zones rurales que dans les zones urbaines ($p < 0,05$), sauf à Allada, Adjohoun et Pobè où les TIE sont similaires entre les zones urbaines et rurales (Tableaux XII et XIII). Les TIE observés sont généralement plus élevés en Juillet que dans les autres mois (Tableaux XII et XIII).

Tableau XII: Variation des taux de piqûres infectantes dans les communes Adjohoun, Pobè, Ouidah

Localités	Mars	Mai	Juillet	Octobre	Février	TIE/Nuit	TIE/Mois	TIE/An	P-value	RR	P-value
Adjohoun urbain	1	7	0	0	2						
PHN	0,25	1,75	0	0	0,5	0,00	0,00	0,00			
TIE/nuit	0	0	-	-	0				1,00	1,00	-
Adjohoun rural	2	10	0	0	1						
PHN	0,5	2,5	0	0	0,25	0,00	0,00	0,00			
TIE/nuit	0	0	-	-	0						
Pobe urbain	1	1	0	4	0						
PHN	0,25	0,25	0	1	0	0,00	0,00	0,00			
TIE/nuit	0	0	-	0	-				1,00	-	1,00
Pobe rural	0	0	0	2	0						
PHN	0	0	0	0,5	0	0,00	0,00	0,00			
TIE/nuit	-	-	-	0	-						
Ouidah urbain	22	17	0	6	1						
PHN	5,5	4,25	0	1,5	0,25	0,00	0,00	0,00			
TIE/nuit	0	0	-	0	0				<0,001	-	<0,001
Ouidah rural	1144	1639	254	586	237						
PHN	286	409,75	63,5	146,5	59,25	2,63	78,90	959,95			
TIE/nuit	0	8,2	3,85	0	0						

RR= Rate Ratio

Tableau XIII: Variation des taux de piqûres infectantes dans les communes Allada, Dassa, Parakou, Kandi et Ouidah

Localités	Mars	Mai	Juillet	Septembre	Novembre	TIE/Nuit	TIE/Mois	TIE/An	P-Value
Allada urbain	4,00	22,00	18,00	10,00	14,00				
PHN	0,50	2,75	2,25	1,25	1,75	0,48	14,37	174,82	
TIE/nuit	0,00	0,16	0,10	0,10	0,12				0,45
Allada rural	7,00	10,00	23,00	19,00	16,00				
PHN	0,88	1,25	2,87	2,38	2,00	0,30	9,06	110,27	
TIE/nuit	0,00	0,05	0,00	0,00	0,25				
Dassa urbain	0,00	17,00	21,00	5,00	7,00				
PHN	0,00	2,12	2,62	0,63	0,88	0,25	7,50	91,26	
TIE/nuit	0,00	0,00	0,00	0,13	0,13				0,022
Dassa rural	2,00	50,00	103,00	9,00	5,00				
PHN	0,25	6,25	12,87	1,13	0,63	1,32	39,62	482,09	
TIE/nuit	0,00	0,31	0,84	0,17	0,00				
Parakou urbain	19,00	278,00	88,00	29,00	51,00				
PHN	2,38	34,75	11,00	3,63	6,38	1,75	52,48	638,51	
TIE/nuit	0,12	0,00	1,25	0,37	0,00				0,00
Parakou rural	125,00	276,00	161,00	90,00	122,00				
PHN	15,63	34,50	20,12	11,25	15,25	4,79	143,84	1750,03	
TIE/nuit	2,00	2,07	0,44	0,29	0,00				
Kandi urbain	0,00	4,00	3,00	23,00	4,00				
PHN	0,00	0,50	0,38	2,88	0,50	0	0	0	
TIE/nuit	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				<0,0001
Kandi rural	0,00	142,00	372,00	104,00	1,00				
PHN	0,00	17,75	46,50	13,00	0,13	2,08	62,33	758,31	
TIE/nuit	0,00	0,61	1,03	0,43	0,00				
Malanville urbain	11,00	120,00	1042,00	522,00	591,00				
PHN	1,38	15,00	130,25	65,25	73,87	8,44	253,20	3080,64	
TIE/nuit	0,12	0,37	5,43	1,63	4,43				0,0012
Malanville rural	67,00	305,00	515,00	159,00	580,00				
PHN	8,38	38,12	64,38	19,87	72,50	4,53	136,04	1655,14	
TIE/nuit	0,50	1,29	2,74	0,00	0,00				

L'analyse en composantes principales, utilisée pour voir s'il existe une structure non connue a priori sur l'ensemble des taux inoculation entomologique, a permis d'identifier quatre facteurs importants qui représentent environ 90% de la variation du taux d'inoculation entomologique (Tableau XIII). L'exposition humaine aux piqûres infectieuses observée à Allada, Ouidah, Pobè et Adjohoun a largement contribué à la formation du premier facteur ou groupe 1 (Tableau XIV). Les TIE de Kandi et Dassa ont contribué à la formation du deuxième facteur ou groupe 2, les TIE de Parakou ont permis la formation du troisième facteur, et ceux de

Malanville ont été décisifs dans la formation du facteur 4 (Tableau XIV). De façon analogue, les représentations des taux d'inoculation entomologiques sur les figures 21-23 permettent d'étudier ces structures de liaisons linéaires sur l'ensemble des TIE considérés. Ainsi, on peut distinguer 4 profils ou structures de transmission du paludisme. Le premier profil inclus Allada, Ouidah, Pobè et Adjohoun où les taux d'inoculation entomologique sont positivement corrélés, proches les uns des autres et proches de l'axe 1. Ce qui suggère que les TIE de ces localités sont proches dans l'espace (Figure 21). Les projections des TIE de Kandi et Dassa sont très proches l'une de l'autre, très proches du cercle de corrélation et proches de l'axe 2 mais en direction opposée aux projections des TIE d'Allada, Ouidah, Pobè et Adjohoun. Ce qui montre que les taux d'inoculation entomologique observés à Kandi et Dassa se regroupent dans l'espace et sont significativement différents de ceux observés à Allada, Ouidah, Pobè et Adjohoun (Figure 22 et 23). Malanville et Parakou sont proches de l'axe 3 mais Parakou est négativement corrélés à l'axe 3 alors que malanville est positivement corrélés à l'axe 3 (Figure 22 et 23). Ce qui montre que les variations des taux d'inoculation entomologique à Malanville et Parakou sont significativement différentes dans l'espace suggérant deux profils de transmission différents entre eux et différents de ceux observés à Kandi et Dassa d'une part, et de ceux observés à Allada, Ouidah, Pobè et Adjohoun d'autre part.

Tableau XIV: Localités déterminantes dans la composition des facteurs retenus

Facteurs	Localités	Corrélation	P
1	Pobe	0,9257502	0,0001214866
	Adjohoun	0,9257502	0,0001214866
	Ouidah	0,8112903	0,0043879578
	Allada	0,8045221	0,0050082296
2	Kandi	0,8262052	0,003217763
	Dassa	0,7694655	0,009256277
3	Parakou	-0,7896212	0,006590493
4	Malanville	0,7779136	0,008060782

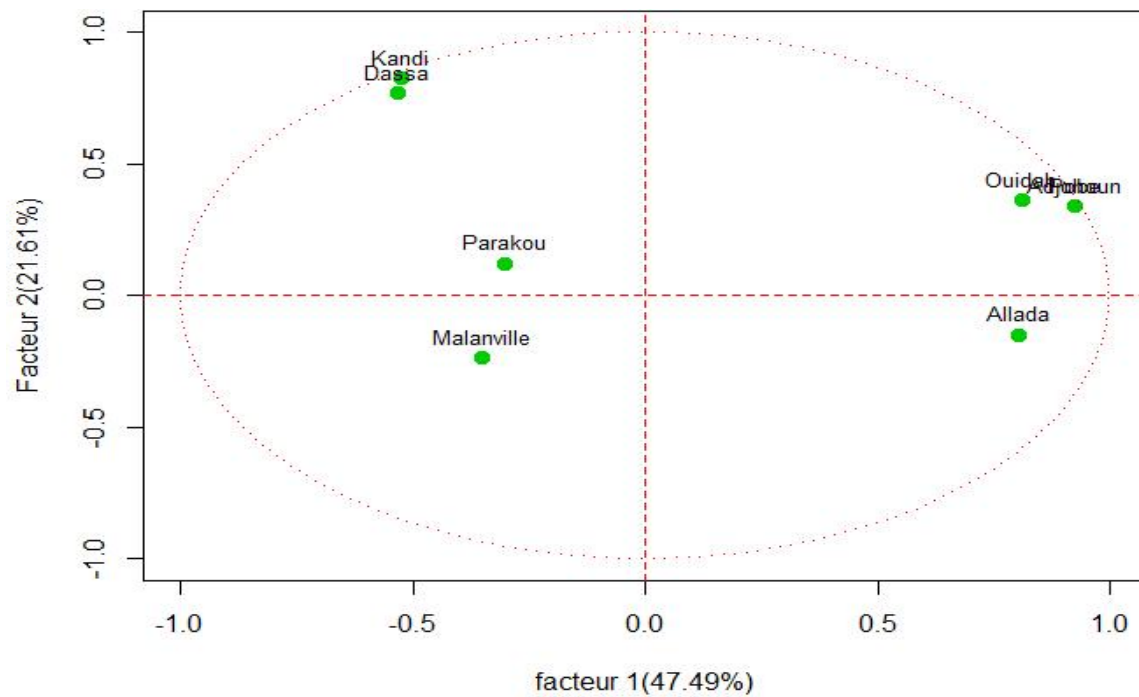


Figure 21: Représentation de la transmission entomologique du paludisme (TIE) des sites sur les axes 1 et 2

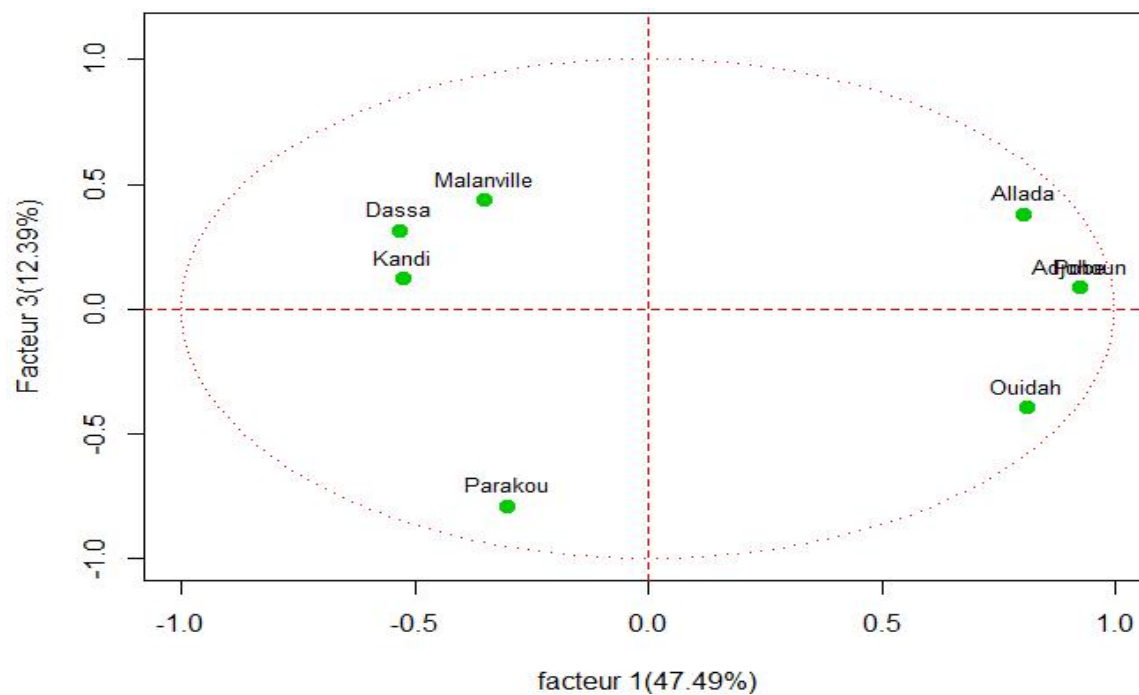


Figure 22: Représentation de la transmission entomologique du paludisme (TIE) des sites sur les axes 1 et 3

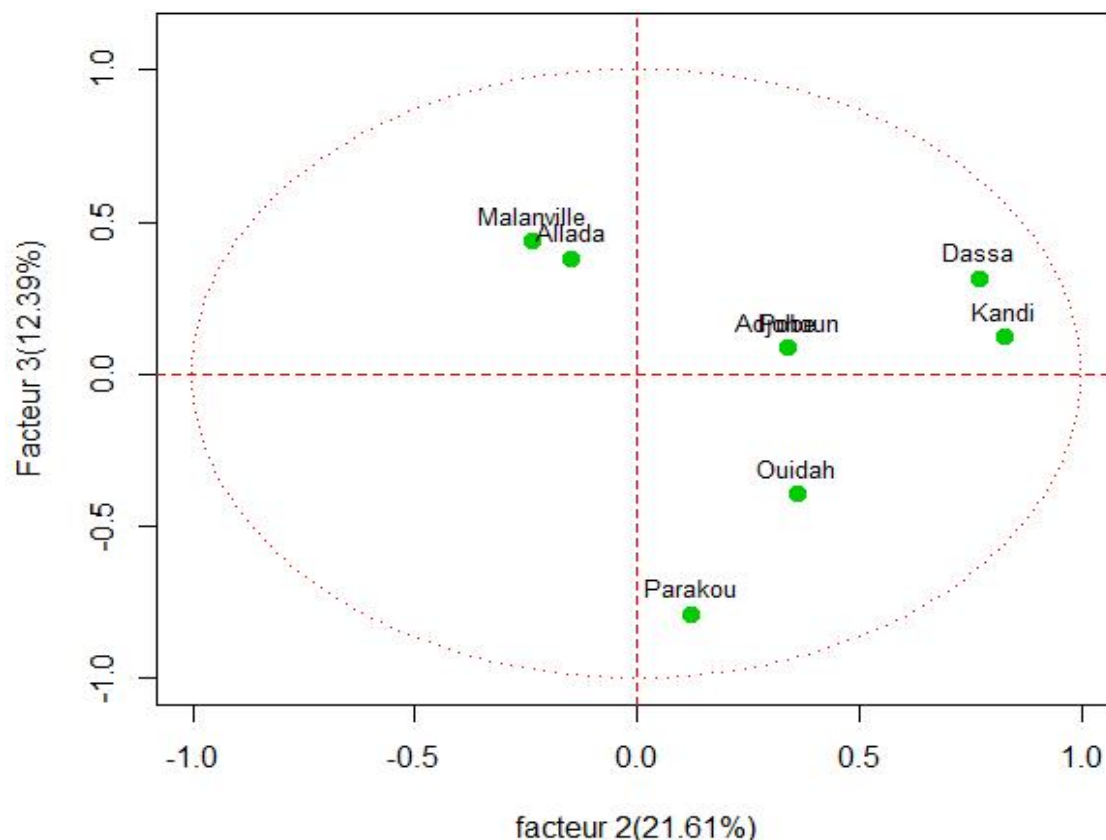


Figure 23: Représentation de la transmission entomologique du paludisme (TIE) des sites sur les axes 2 et 3

Ces profils observés ont été confirmés par le modèle de prédiction des taux d'inoculations entomologiques mensuels sur chaque site (Figure 24). Ce modèle prédictif des TIE a également montré quatre tendances ou profils de transmission du paludisme. La première tendance implique les TIE prévus à Dassa et Kandi (zone de savane) qui présentent un seul pic significativement différent de transmission ($p < 0,05$). Cette transmission commence en Juin et se termine en Août avec un maximum de 13 piqûres infectantes /homme/mois à Dassa contre 15 piqûres infectantes/homme/mois à Kandi (Figure 24). La deuxième tendance est déterminée par les transmissions prédites pour Allada, Ouidah, Pobe et Adjohoun (zone de forêts dégradées) qui sont de très faibles taux d'inoculation entomologiques (< 5 piqûres infectantes/homme/nuit) dont les pics débutent autour du mois de Mars mais pouvant aller jusqu'à deux saisons de transmission (Figure 24). La deuxième saison de transmission commence en Octobre et se termine en Novembre avec un maximum de 6 piqûres infectantes/homme/mois. La troisième tendance de transmission a été déterminée par les TIE prédits à Parakou (zone de savane) avec 3 pics suggérant une transmission continue du paludisme dans cette région. Ici, les TIE varient de 9 à 27 piqûres infectieuses/homme/mois

(Figure 24). La quatrième tendance est celle observée à Malanville (zone de savane) montrant plusieurs pics de TIE au cours de l'année avec des valeurs allant de 9 à 120 piqûres infectieuses/homme/mois (Figure 24). Elle suggère également une transmission continue dans cette localité, mais avec des valeurs largement supérieures à celles de Parakou.

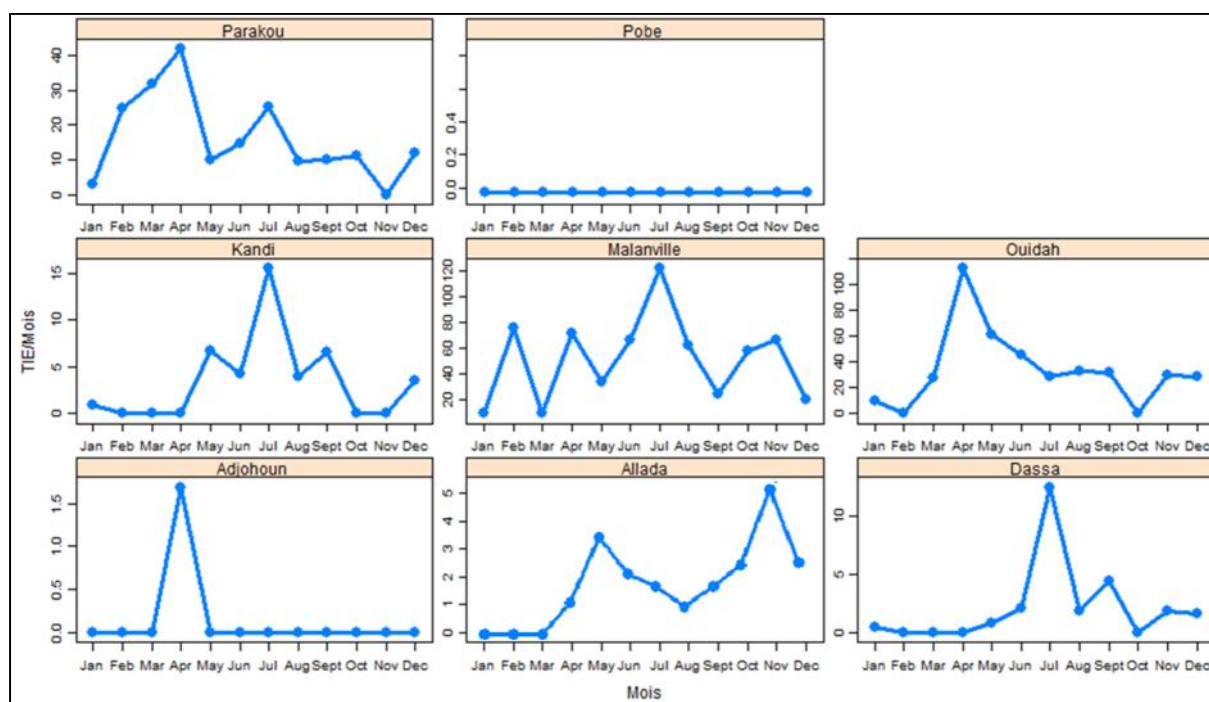


Figure 24: Taux d'inoculations entomologiques prédits dans chaque localité

2. Discussion

L'étude des moustiques vecteurs et de la dynamique de la transmission du paludisme est un préalable indispensable non seulement pour comprendre l'épidémiologie de cette affection, mais aussi pour mettre en place un contrôle efficace et ciblé de ces vecteurs (Fontenille *et al.*, 2003). Le suivi entomologique que nous avons réalisé a révélé que la majorité des moustiques récoltés (70%) sont des *An. gambiae s.l* dont l'abondance varie selon le degré d'urbanisation. L'agressivité de ce vecteur est la même à l'intérieur et à l'extérieur des habitations. Le nombre de piqûres infectieuses de *An. gambiae s.l* par homme et par nuit varie entre les sites. Sur la base de ces résultats, quatre profils de transmission du *Plasmodium falciparum* ont été observés le long du transect Nord-Sud du Bénin.

Une similarité du profil de diversité culicidienne a été observée entre certains sites où une même stratégie de lutte antivectorielle peut être mise en œuvre. Le regroupement des sites par profil de similarité entomologique facilite l'adaptation des méthodes de lutte et offre l'avantage de réduire les coûts élevés associés à l'application de différentes stratégies de lutte dans différentes localités (Lingenfelser *et al.*, 2010). Les résultats taxonomiques montrent également une variation spatio-temporelle des espèces du complexe *An. gambiae* comme observée au Nigeria, au Cameroun et au Burkina Faso (Onyabe & Conn 2001; Dabiré *et al.*, 2009).

Anopheles arabiensis, un vecteur des zones de savane sèche dont la localisation était limitée en 1980 entre Parakou et l'extrême Nord du Bénin (Malanville) (Akogbeto 1992; Akogbeto & Di Deco 1995) a été retrouvé à Dassa et Allada en 2012. Ces résultats suggèrent une extension de la distribution spatiale de ce vecteur due probablement à la destruction des forêts et de vastes zones (70 000 ha/an) destinées à l'agriculture, la chasse, le pâturage et la récolte du bois au Centre et au Sud du Bénin (FAO 2002). Ces modifications de l'habitat affectent la distribution de ce vecteur (Hall 1972; Dukeen & Omer, 1986; Gatton *et al.*, 2013) et pourraient contribuer à sa propagation dans le Sud du Bénin. Selon Muturi *et al.* (2013), les pratiques agricoles telles que l'irrigation pour la culture du riz favorisent également la propagation de *An. arabiensis*. Ces pratiques se développent progressivement au Bénin surtout dans les régions de Dassa et Allada connues par le passé comme des régions d'accès difficile à l'eau. En outre, les longues saisons sèches récemment observées au Bénin et ailleurs en Afrique, en raison du changement climatique (Baudoin *et al.*, 2013), peuvent également favoriser la propagation de *An. arabiensis* d'où les densités relativement élevées durant certains mois (Mai, Septembre et Novembre) dans la région méridionale.

Anopheles melas représente l'espèce vectrice la plus abondante rencontrée à Djègbadji, dans la zone côtière lagunaire de Ouidah. *An. melas* est inféodé aux eaux saumâtres ; on le rencontre sur le littoral, dans les estuaires, les lagunes et les mangroves (Diagne *et al.*, 1994). C'est ce qui explique sa présence dans cette région du Bénin en bordure d'un lac d'eau saumâtre.

La variation de l'agressivité des différentes espèces de moustique entre les sites s'explique par les caractéristiques écologiques de chaque site. Certains sites d'étude, tels que Malanville et Parakou, sont favorables pour la reproduction des vecteurs. Ce sont des zones de plaine où la culture du riz et des légumes sont les principales activités (Yadouleton *et al.*, 2009; Yadouleton *et al.*, 2011). Le fort taux d'agressivité de *An. gambiae s.l* observé dans la zone urbaine de Malanville est dû à l'existence de zones de culture du riz qui engendre plus de

gîtes permanents de reproduction des moustiques comparativement à la zone périphérique (Yadouleton *et al.*, 2009). L'existence de marécage et d'une lagune à Ouidah ainsi que la proximité de cette commune avec la mer favorise le développement des gîtes des vecteurs du paludisme. Par contre, Allada, Dassa, Kandi et Pobè sont des zones de plateaux où l'accès à l'eau est difficile et où le développement des gîtes de moustiques n'est possible qu'à certaines périodes de l'année (saisons pluvieuses) (Govoetchan *et al.*, 2014). Quant à Adjohoun, cette commune est caractérisée par une zone de plateau et une zone marécageuse. Mais la mise en œuvre d'une stratégie de pulvérisation intradomiciliaire (PID) dans un passé récent a contribué à la réduction significative des vecteurs dans cette localité. Ce qui traduit la faible abondance des vecteurs observée dans la commune d'Adjohoun.

Le taux d'inoculation entomologique (TIE) estime l'exposition humaine aux vecteurs infectés par les parasites responsables du paludisme. Il est couramment utilisé pour évaluer l'endémicité et l'intensité de la transmission du paludisme (Fontenille *et al.*, 2005). Dans la présente étude, les TIE observés varient considérablement entre les sites. Les taux les plus élevés ont été observés à Parakou, Ouidah et Malanville avec plus de deux piqûres infectantes/homme/nuit. Ce qui suggère que les populations de Malanville, Ouidah et Parakou sont plus exposées à la transmission de *P. falciparum* par rapport à d'autres endroits. Le risque de transmission du paludisme observé dans chaque site serait également associé à leurs caractéristiques environnementales. Koudou *et al.* (2007) ont rapporté une augmentation du TIE de 38 piqûres infectantes/homme/an à 295 piqûres infectantes/homme/an suite à un retour à la culture du riz dans la région de Zitta en Côte d'Ivoire. Une exposition permanente au paludisme a également été signalée par Yadouleton *et al.* (2009) dans les communautés proches des cultures maraîchères au Bénin. Ces observations suggèrent que la culture du riz et des produits maraîchères sont des facteurs clés associés à un risque élevé de la transmission du paludisme et pourraient expliquer la transmission observée à Malanville, Ouidah et Parakou. En outre, Kandi, Dassa, Pobè et Allada sont de hauts plateaux considérés comme ayant un risque de transmission du paludisme plus faible que les basses régions (Malanville et Parakou) (Omukunda *et al.*, 2013). L'impact de l'utilisation des moustiquaires par les populations peut également expliquer les faibles densités de vecteurs et les TIE observés dans certaines régions où la prévalence du paludisme ne semble pas être en corrélation avec les TIE estimés (Terlouw *et al.*, 2010; Sovi *et al.*, 2013). Mais une conclusion ferme sur cette corrélation entre la prévalence et le TIE pourra être établie lorsque les données entomologiques et parasitologiques seront simultanément collectées.

Les taux de piqûres de vecteurs infectieux élevés en zone rurale par rapport à la zone urbaine dans une même commune suggèrent une hétérogénéité spatiale des TIE. Cela montre l'importance des conditions locales ou micro-écologiques et les caractéristiques de l'environnement dans l'intensité de la transmission du paludisme. Les forts TIE observés sur certains sites sont particulièrement liés à une forte agressivité de *An. gambiae s.l.*, mais pas à un fort taux d'infectivité.

Les tendances observées dans la transmission de *P. falciparum* montrent l'hétérogénéité de la transmission du paludisme au Bénin. Il existe des localités à une saison de transmission du paludisme (zone de savane), des localités avec deux saisons de transmission (zone de forêts dégradées) et des localités à transmission continue du paludisme (zone de savane et de forêt). Malanville et Parakou sont des localités à risque élevé de transmission où des stratégies de lutte antivectorielle urgentes et efficaces doivent être mises en œuvre pour aider les populations. Compte tenu de l'intensité et du caractère continu de la transmission dans ces communes, les méthodes de lutte antivectorielle les plus indiquées sont l'utilisation systématique des moustiquaires et l'aménagement de l'environnement.

Cette étude démontre le rôle de la biologie des vecteurs dans l'épidémiologie du paludisme au Bénin. Cependant, le manque de données sur la prévalence du paludisme estimée par microscopie ou par les tests de détection rapide sur chaque site d'étude représente une limite importante. L'étude pourrait aussi être améliorée en augmentant la fréquence des collectes et en incluant d'autres régions.

L'étude de la dynamique de la transmission du paludisme est très importante pour la mise en œuvre des interventions de lutte antivectorielle basée sur l'utilisation des insecticides au Bénin où plusieurs interventions de lutte antivectorielle à grande échelle (MIILD et PID) sont en cours. Elle guidera les politiques dans le choix des régions prioritaires pour les interventions de lutte antivectorielle. La connaissance des saisons de transmission dans chaque région contribuera également à la mise en œuvre de pulvérisations intradomiciliaires efficaces et rentables.

Conclusion

Cette étude a révélé quatre profils entomologiques de la transmission du paludisme du Sud au Nord du Bénin. Le premier profil inclut les localités de la zone de forêts dégradées avec une à deux saisons de transmission. Les trois autres profils s'observent dans les régions de savanes avec des localités à une saison de transmission et des localités à transmission continue de *P. falciparum*. L'étude a également montré une variation spatio-temporelle de la distribution des vecteurs du paludisme dont les principaux sont *Anopheles coluzzii*, *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*. Ces quatre espèces jouent des rôles très importants dans le maintien du paludisme au Bénin. Une hétérogénéité spatiale de l'exposition humaine aux piqûres infectieuses de ces vecteurs a également été observée avec des taux élevés en zones rurales. Cette agressivité des vecteurs vis-à-vis de l'homme pourrait s'accroître de manière significative dans les zones urbaines caractérisées par la présence d'activités agricoles (zones maraichères).

Ces données recueillies représentent une source d'informations qui pourrait guider la mise en œuvre de toute stratégie de lutte contre les vecteurs du paludisme au Bénin. La prise en compte de ce profil entomologique du paludisme est indispensable pour l'élaboration des stratégies de lutte antipaludique. Ces informations pourraient également être utilisées pour guider l'extension des zones de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide en ciblant les zones qui remplissent les meilleures conditions. Il s'agit des sites ayant une seule saison de transmission dont la durée coïncide avec celle de l'effet insecticide après la pulvérisation.

Chapitre 4 :

Résistance des vecteurs aux insecticides et mécanismes de résistances impliqués

Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les espèces de moustiques responsables de la transmission du paludisme au Bénin sont principalement *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. melas*. Le comportement et la biologie des larves de ces moustiques sont différents. Ce qui affecte la facilité avec laquelle chacun d'entre eux peut être contrôlé. Les adultes de *An. gambiae* et *An. coluzzii* préfèrent se nourrir sur homme et se reposer à l'intérieur des habitations tandis que *An. arabiensis* et *An. melas* peuvent se nourrir sur homme ou sur animal et se reposer à l'intérieur ou à l'extérieur. De ce fait, ils sont plus difficiles à contrôler (Coetzee *et al.*, 2013). Les larves de *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* peuvent être trouvées dans les collections d'eau de pluie temporaires, les empreintes de sabots sur les bords des barrages et dans les rizières alors que les larves de *An. melas* se développent plus dans les eaux saumâtres (Sinka *et al.*, 2012). Les traitements larvicides et la modification de l'habitat des larves ne sont pas toujours faciles.

L'approche la plus répandue et efficace pour contrôler les moustiques vecteurs du paludisme est l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) et les pulvérisations intradomiciliares d'insecticides à effet rémanent (PID). Les insecticides les plus couramment utilisés pour le contrôle de ces vecteurs sont les pyréthrinoides et cette classe d'insecticide est la seule actuellement recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour le traitement des moustiquaires (WHOPES 2014)). Il n'est donc pas surprenant que les vecteurs du paludisme aient développé une résistance aux pyréthrinoides sur tout le continent africain (Brooke *et al.*, 1999; Ranson *et al.*, 2011). Trois autres classes d'adulticides recommandées par l'OMS (organophosphorés, carbamates et organochlorés) ont été également utilisées pour la PID (WHOPES 2015). Plusieurs pays ont observé des cas de résistance à ces trois catégories d'insecticide chez les vecteurs. Ces données de résistance aux insecticides sont nécessaires pour éclairer les politiques de lutte antivectorielle pour une gestion efficace de la résistance aux insecticides afin de préserver ou de prolonger l'efficacité des interventions de lutte antivectorielle (WHO 2013).

En cas expérimentales, les carbamates et les organophosphorés représentent les classes d'insecticides encore efficaces pour la PID au Bénin (Agossa *et al.*, 2014). Cependant, les données existantes sur la résistance des populations vectrices à ces insecticides ne concernent que quelques localités isolées et sont insuffisantes pour une prise de décision sur l'utilisation de ces insecticides à l'échelle nationale.

Le but de la présente étude est donc de fournir des informations sur l'état de sensibilité de *An. gambiae s.l.* aux insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle au Bénin et d'étudier la possibilité d'une co-résistance à plusieurs insecticides dans la même population de *An. gambiae s.l.* Les résultats obtenus (article 2) permettront aux programmes de lutte antivectorielle de mettre en place des stratégies appropriées de gestion de la résistance.

Article 2 :

Gnanguenon et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:223
DOI 10.1186/s13071-015-0833-2



RESEARCH

Open Access

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

Virgile Gnanguenon^{1,2*}, Fiacre R Agossa^{1,2}, Kefilath Badirou^{1,2}, Renaud Govoetchan^{1,2}, Rodrigue Anagonou^{1,2}, Frédéric Oke-Agbo¹, Roseric Azondekon¹, Ramziath AgbanrinYoussof^{1,2}, Roseline Attolou^{1,2}, Filemon T Tokponnon⁴, Rock Aikpon^{1,2}, Razaki Ossé^{1,3} and Martin C Akogbeto^{1,2}

1. Résultats

1.1. Effet de la deltaméthrine sur les moustiques (effet knock-down et effet léthal)

L'effet knock-down de la deltaméthrine sur les moustiques testés dans les huit communes est très faible (Figure 25). Après 15 min, la proportion de moustiques "knocked-down" (tombés sur le dos) est comprise entre 0 et 16% contre environ 80% pour Kisumu (souche sensible). Cet effet est similaire ($p > 0,05$) sur les différentes populations de moustiques après 15 min d'exposition. Après 30 minutes d'exposition, la proportion maximale de moustiques tombés sur le dos est passée à 60% mais avec un effet significativement plus faible sur les populations de moustiques de Parakou, Kandi et Malanville comparativement aux autres localités ($P < 0,05$). Après 45 minutes, l'effet Knock-down est resté toujours faible à Parakou et Malanville (3,75 à 9,52%) mais a augmenté chez les populations vectrices d'Adjohoun, Allada, Dassa, Pobè, Ouidah et Kandi. A 60 minutes d'exposition, l'effet knock-down a été observé chez moins de 80% des populations de moustiques testées. Les souches de Parakou et de Malanville sont celles qui ont été les moins sensibles à l'effet Knock-down après une heure d'exposition (12-19% contre 100% pour Kisumu).

Après 24 heures (Figure 26), les populations du complexe *An. gambiae* de Ouidah ont montré un taux de mortalité élevé à la deltaméthrine (100%), suggérant que cette population de moustiques est sensible à ce pyréthrianoïde (Figure 26). Quant aux populations vectrices de Pobè et Parakou, elles ont montré une baisse de sensibilité (suspicion de résistance) avec des

taux de mortalité allant de 91 à 97 %. Enfin, dans les communes de Malanville, Kandi, Dassa, Adjohoun et Allada, les mortalités observées sont comprises entre 14 et 87% (contre 100% pour Kisumu) montrant que les vecteurs de ces localités sont résistants à la deltaméthrine.

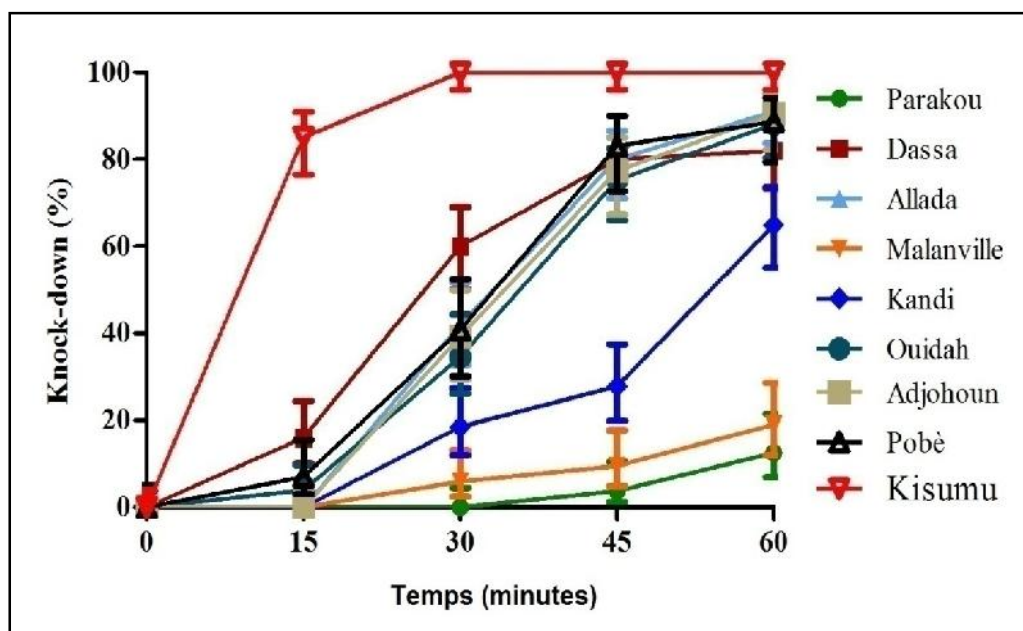


Figure 25: Pourcentage de *An. gambiae s.l* tombés sur le dos "knocked-down" en fonction du temps au cours de leur exposition à la deltamethrine

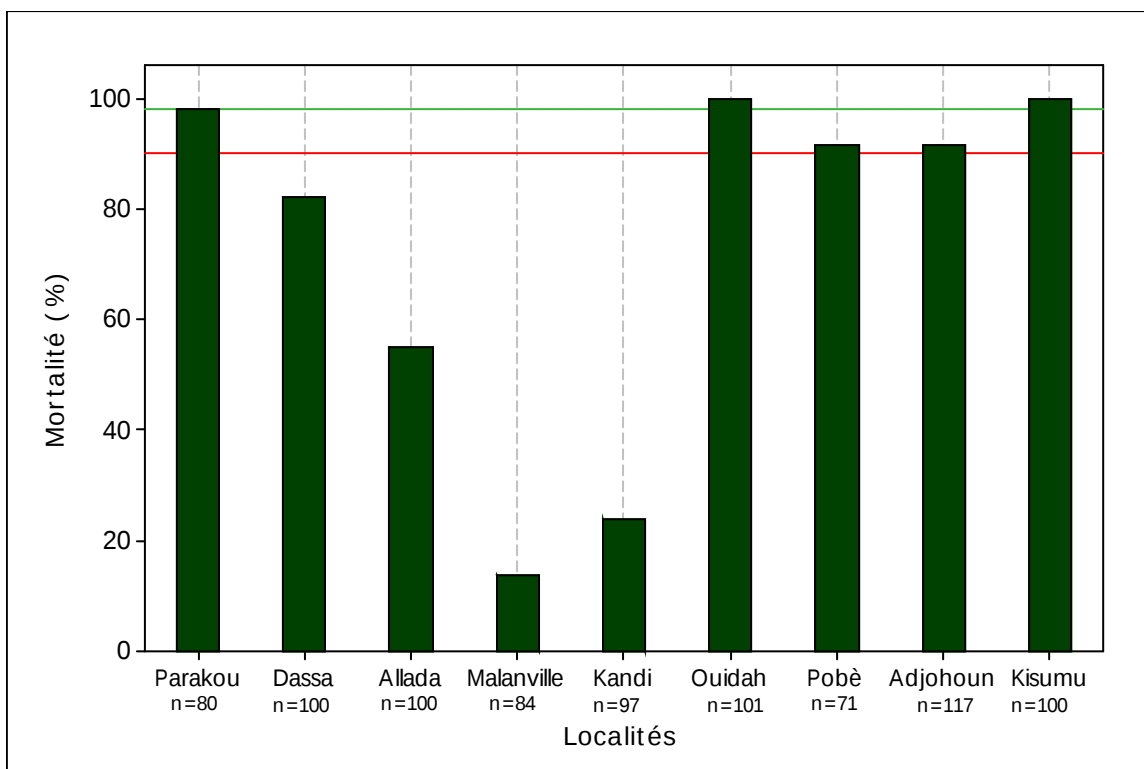


Figure 26: Pourcentage de mortalité de *An. gambiae s.l* après 60 minutes d'exposition aux papiers imprégnés de deltamethrine et après 24 heures de mise en observation

1.2. Effet du bendiocarb sur les moustiques

La figure 27 montre les mortalités immédiates induites par le bendiocarb sur les différentes souches de moustiques. Après 15 min, la proportion de moustiques morts varie entre 0 et 27%. Déjà à 15 minutes d'exposition, une différence significative entre les mortalités immédiates induites par le bendiocarb sur les souches de Pobè, Malanville et Kandi d'une part, et celles de Parakou, Allada, Dassa et Adjohoun ($p < 0,05$) d'autre part, a été observée. La proportion de moustiques morts après 30 minutes d'exposition au bendiocarb est de 3 à 93% contre 15 à 99% après 45 minutes (Figure 27). Au bout des 60 minutes d'exposition, environ 80% des moustiques testés sont morts sauf à Parakou, Dassa et Adjohoun où les mortalités observées sont significativement plus faibles (33 à 77%).

Les taux de mortalité observés après 24h à Pobè, Dassa, Allada, Malanville et Adjohoun sont supérieurs à 98% (Figure 28) et montrent une sensibilité de ces souches au bendiocarb. Par contre à Kandi et à Parakou les taux de mortalité observés sont respectivement de 92,93% [86,12-96,53] et de 89,53% [81,88-94,24] contre 100% pour Kisumu. Ce qui montre une baisse de sensibilité chez les souches de Kandi et une résistance chez les souches de Parakou (Figure 28).

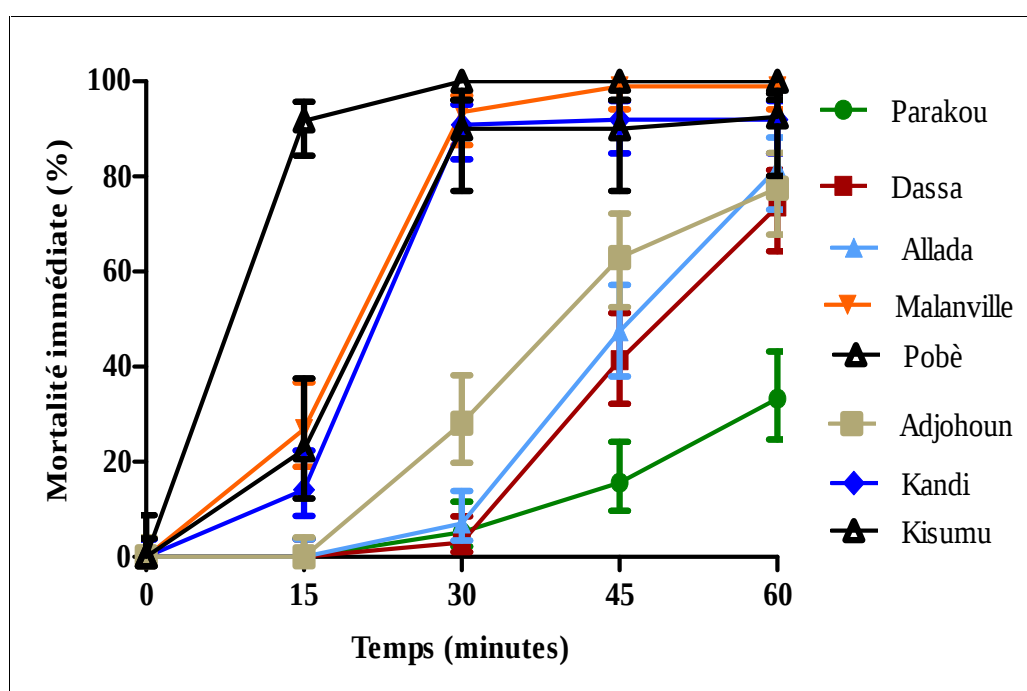


Figure 27: Mortalités immédiates observées au cours des 60 minutes d'exposition des moustiques au bendiocarb

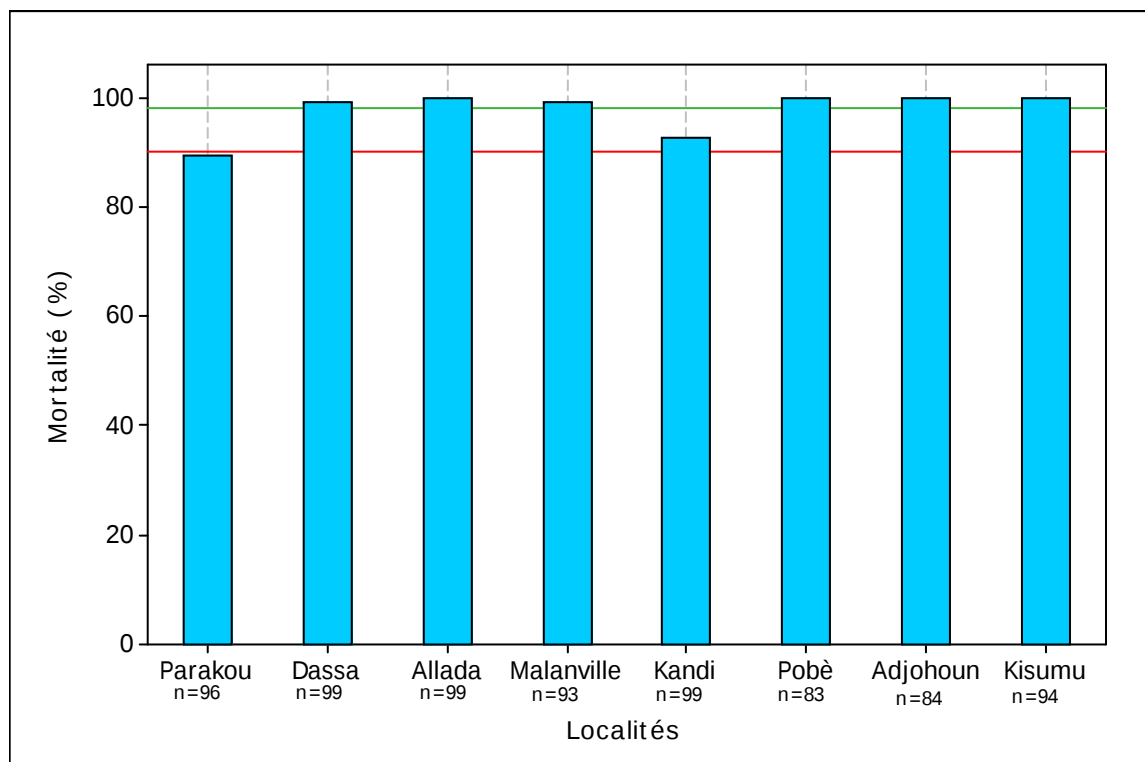


Figure 28: Mortalités observées 24h après exposition des moustiques au bendiocarb

1.3. Effet du pirimiphos méthyl sur les moustiques

Les mortalités immédiates induites par le pirimiphos méthyl varient significativement entre les différentes souches de moustiques testées ($p < 0,05$) (Figure 29). C'est au bout de la trentième minute que l'effet du pirimiphos méthyl a été plus perceptible sur les moustiques testés (Figure 29). Les mortalités immédiates observées varient de 24 à 95% dans les communes d'Allada, Parakou, Kandi et Malanville contre 100% pour la souche Kisumu. Par contre à Pobè, Adjohoun et Allada, la plupart des moustiques étaient toujours vivants (Figure 29). Après une heure d'exposition, les taux de mortalité immédiate ont augmenté dans la plupart des localités (43 à 100%) sauf à Pobè et Adjohoun où les mortalités sont presque nulles (Figure 29).

Les taux de mortalité observés après 24h chez les différentes souches testées sont de 100% montrant une sensibilité de toutes les souches testées au pirimiphos méthyl (Figure 30).

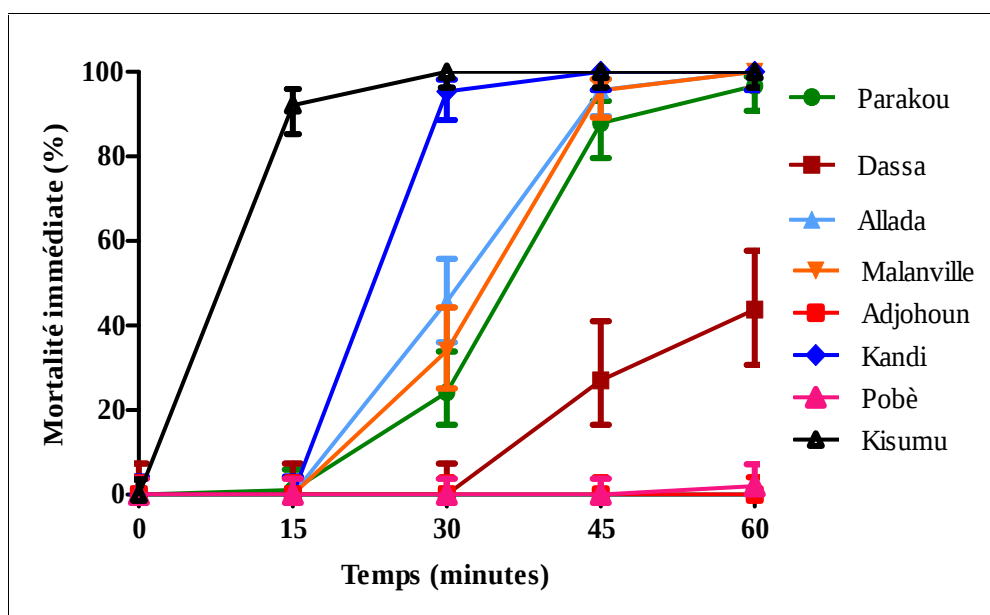


Figure 29: Mortalités immédiates observées au cours des 60 minutes l'exposition des moustiques au pirimiphos méthyl

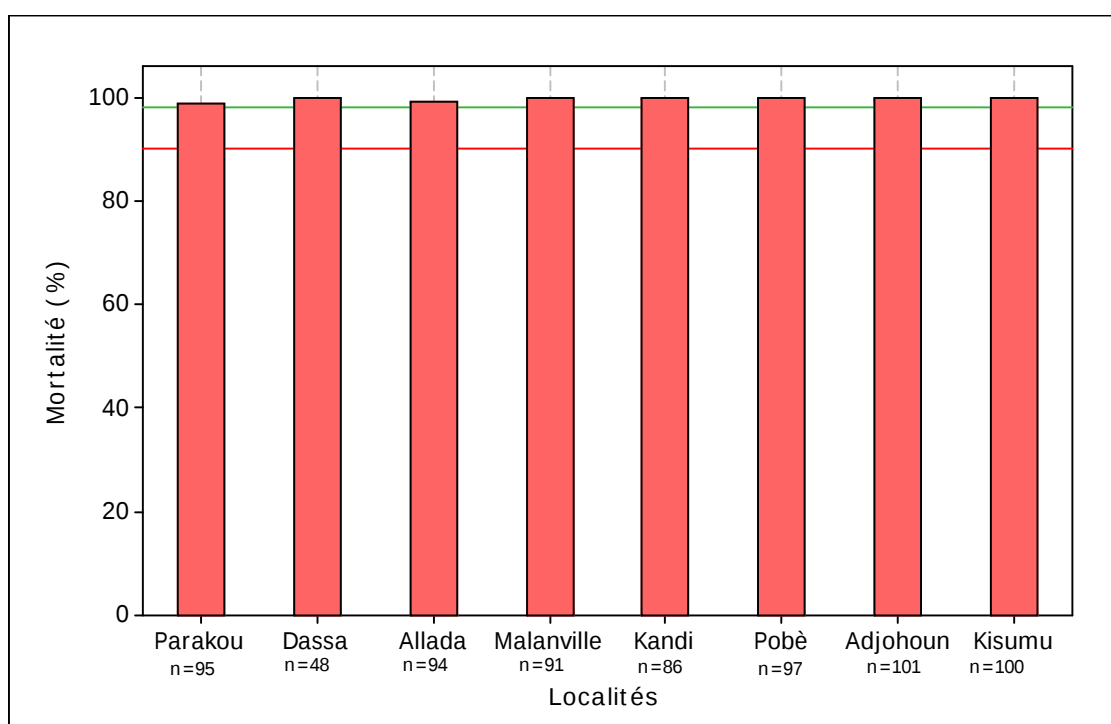


Figure 30: Mortalités observées 24h après exposition des moustiques au pirimiphos méthyl

1.4. Effet du Fenitrothion sur les moustiques

La mortalité immédiate induite par le fénitrothion sur les moustiques testés est généralement faible et similaire entre les souches au cours de l'exposition (Figure 31). Après 15 et 30

minutes d'exposition, les mortalités immédiates observées sont presque nulles (0 à 2,40%) alors qu'elle est très élevée chez la souche de référence Kisumu (100%). Ce n'est qu'au bout de 45 minutes que l'effet immédiat du fénitrothion est plus perceptible chez les souches de Malanville et d'Allada (25,61% [17,40-36,00] et 23% [32,15-15,84]). A 60 minutes d'exposition, les mortalités immédiates ont augmenté jusqu'à 75% dans les communes de Malanville, Kandi, Parakou, Dassa et Allada. Mais dans les communes de Pobè et Adjohoun les mortalités immédiates sont restées nulles (Figure 31).

Après 24 heures d'observation, les mortalités observées varient de 98 à 100% suggérant que toutes les populations de vecteurs testés sont sensibles au fénitrothion (Figure 32).

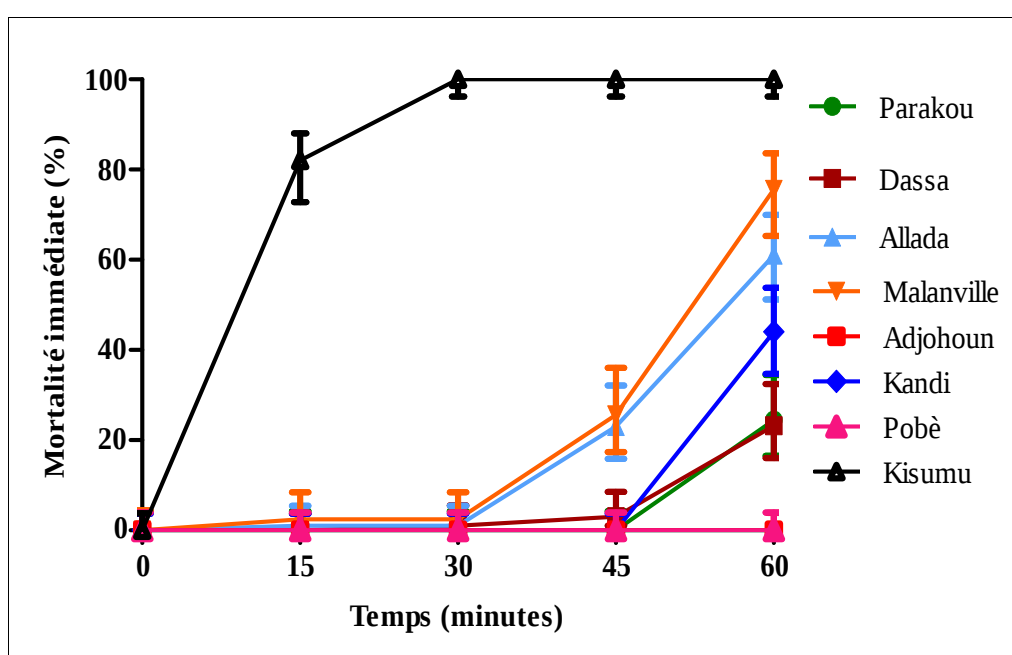


Figure 31: Mortalités immédiates observées au cours des 60 minutes l'exposition des moustiques au fénitrothion

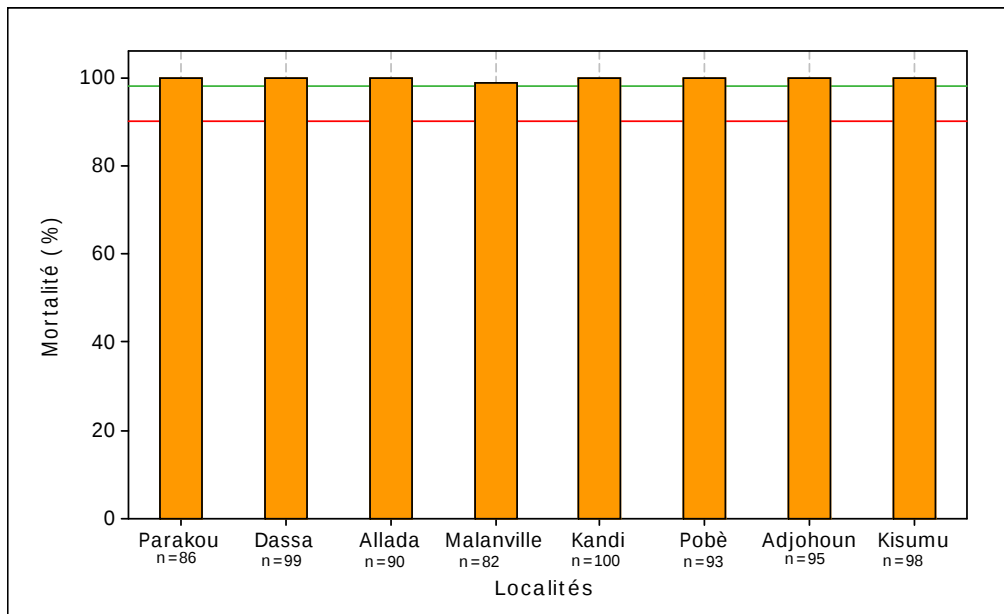


Figure 32: Mortalités observées 24h après exposition des moustiques au fénitrothion

1.5 Cartographie de la résistance aux insecticides

La cartographie de la résistance (Figure 33) montre une distribution généralisée de la résistance à la deltaméthrine du Nord au Sud. On note également, un début de résistance des vecteurs au bendiocarb dans le Nord et une large distribution de leur sensibilité au fénitrothion et au pirimiphos méthyl.

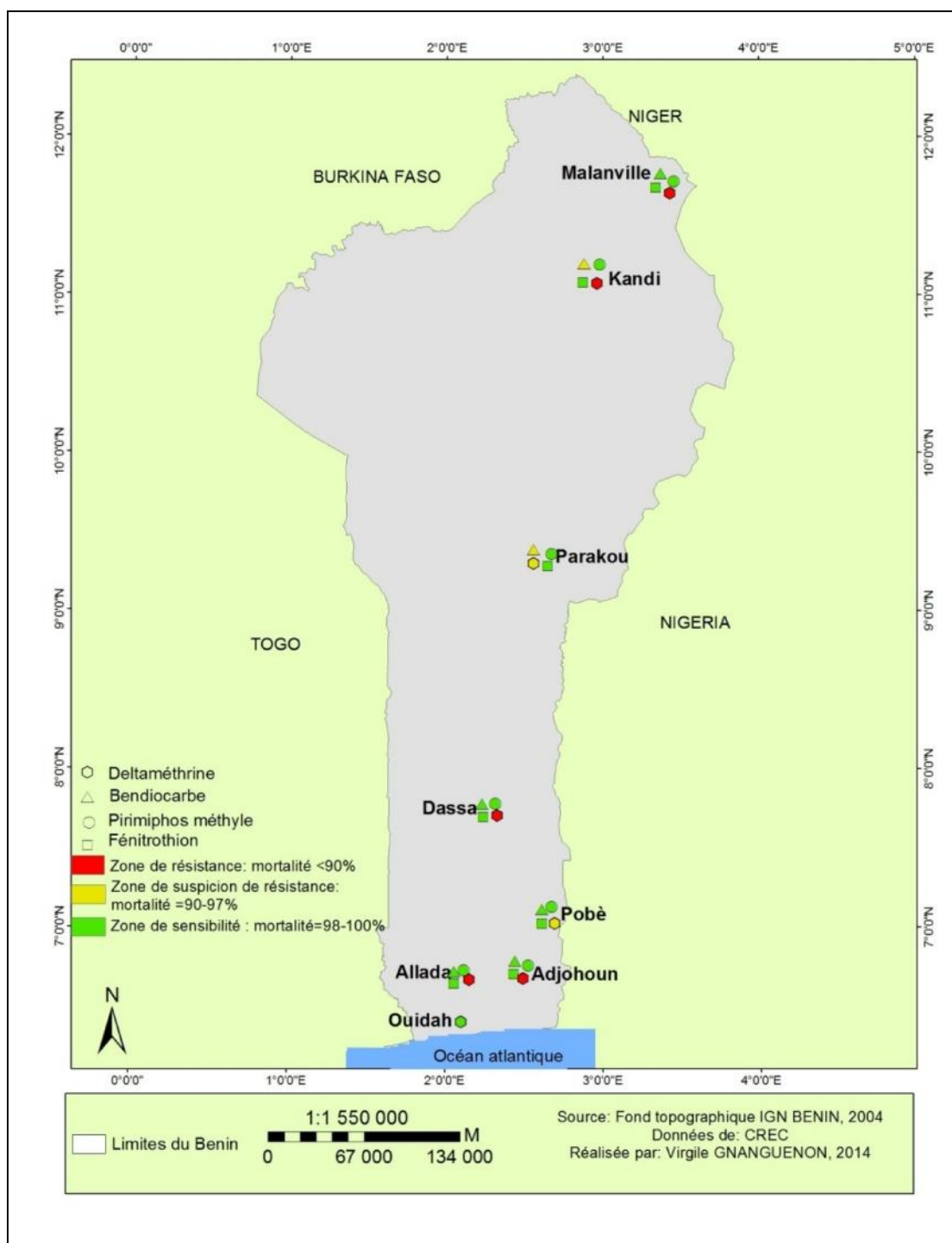


Figure 33: Distribution de la résistance des vecteurs aux insecticides

1.6. Mécanismes de résistance moléculaire aux insecticides détectés chez *Anopheles gambiae s.l*

Le Tableau XV présente la répartition du mécanisme de résistance à l'effet choc (Kd) des insecticides chez les différentes espèces du complexe *An. gambiae* au Bénin (*An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. coluzzii* et *An. melas*). Les fréquences Kdr sont très élevées chez toutes les espèces rencontrées sur les différents sites. Elles varient de 78 à 93% (Tableau XV).

Aucune différence significative n'a été observée lorsqu'on compare les différentes fréquences ($p > 0,05$).

Quant à la mutation Ace-1R, elle a été identifiée à Kandi et Parakou à de très faibles fréquences (1 à 3%) (Tableau). Dans les autres localités, cette mutation est absente avec des fréquences nulles (Tableau XVI).

Tableau XV: Fréquences Kdr observées chez les différentes espèces du complexe *An. gambiae*

Commune	Espèces	Nombre	RR	RS	SS	F (Kdr)	OR (95%CI)	p-value
Allada	<i>An. gambiae</i>	14	11	3	0	0,89a	1,00	-
	<i>An. arabiensis</i>	7	5	2	0	0,86a	1,39 [0,20-9,44]	1,000
	<i>An. coluzzi</i>	20	13	7	0	0,83a	1,77 [0,41-7,53]	0,5072
Dassa	<i>An. gambiae</i>	21	17	4	0	0,90a	1,00	-
	<i>An. arabiensis</i>	8	5	3	0	0,81a	2,19 [0,43-11,12]	0,381
	<i>An. coluzzi</i>	18	15	3	0	0,92a	0,86 [0,18-4,14]	1,00
Parakou	<i>An. gambiae</i>	15	13	2	0	0,93a	1,00	-
	<i>An. arabiensis</i>	19	15	4	0	0,89a	1,65 [0,28-9,67]	0,6870
	<i>An. coluzzi</i>	14	10	4	0	0,86a	2,33 [0,39-13,87]	0,4154
Kandi	<i>An. gambiae</i>	22	16	6	0	0,86a	1,00	-
	<i>An. arabiensis</i>	14	12	2	0	0,93a	0,49 [0,09-2,60]	0,4705
	<i>An. coluzzi</i>	12	11	1	0	0,96a	0,27 [0,03-2,43]	0,4073
Malanville	<i>An. gambiae</i>	18	14	4	0	0,89a	1,00	-
	<i>An. arabiensis</i>	3	2	1	0	0,83a	1,6 [0,15-17,38]	0,5568
	<i>An. coluzzi</i>	27	19	7	1	0,83a	1,6 [0,45-5,65]	0,55141
Ouidah	<i>An. gambiae</i>	9	5	4	0	0,78a	1,00	-
	<i>An. melas</i>	27	19	8	0	0,85a	0,61 [0,16-2,33]	0,47922
	<i>An. coluzzi</i>	11	8	3	0	0,86a	0,55 [0,11-2,87]	0,67983
Pobè	<i>An. gambiae</i>	5	4	1	0	0,90	1,00	-
	<i>An. coluzzi</i>	43	29	14	0	0,84	0,51 [0,14-2,77]	0,59762
Adjohoun	<i>An. gambiae</i>	6	4	2	0	0,83	1,00]	-
	<i>An. coluzzi</i>	39	31	8	0	0,89	0,57 [0,16-2,69]	0,36310

F= fréquence ; OR = Odds Ratio ; RR=Homozygote résistant ; SS=Homozygote sensible ;
RS= Hétérozygote

Tableau XVI: Fréquences Ace-1R observées chez les différentes espèces du complexe *An. gambiae*

Commune	Espèces	Nombre	RR	RS	SS	F (Ace-1R)	p-value
Allada	<i>An. gambiae</i>	14	0	0	14	0	P>0,999
	<i>An. arabiensis</i>	7	0	0	7	0	
	<i>An. coluzzii</i>	20	0	0	20	0	
Dassa	<i>An. gambiae</i>	21	0	0	21	0	P>0,999
	<i>An. arabiensis</i>	8	0	0	8	0	
	<i>An. coluzzii</i>	18	0	0	18	0	
Parakou	<i>An. gambiae</i>	15	0	3	12	0,1	0,22
	<i>An. arabiensis</i>	19	0	0	19	0	
	<i>An. coluzzii</i>	14	0	0	14	0	
Kandi	<i>An. gambiae</i>	22	0	1	21	0,002	P>0,999
	<i>An. arabiensis</i>	14	0	0	14	0	
	<i>An. coluzzii</i>	12	0	0	12	0	
Malanville	<i>An. gambiae</i>	18	0	0	18	0	P>0,999
	<i>An. arabiensis</i>	3	0	0	3	0	
	<i>An. coluzzii</i>	27	0	0	0	0	
Ouidah	<i>An. gambiae</i>	9	0	0	9	0	P>0,999
	<i>An. melas</i>	27	0	0	27	0	
	<i>An. coluzzi</i>	11	0	0	11	0	

F= fréquence ; RR=Homozygote résistant ; SS=Homozygote sensible ; RS= Hétérozygote

1.7. Mécanismes de résistance biochimique

Les dosages biochimiques ont montré des activités enzymatiques significativement élevées chez certaines populations de moustiques (Figure 34 à 37). La figure 34 montre le niveau moyen d'activité oxydasique (MFO) chez les différentes populations testées. L'activité du cytochrome P450 est significativement élevée dans les localités de Parakou et Allada comparativement à Kisumu ($p<0,05$) (Figure 34).

Quant aux estérases non-spécifiques (α et β estérase), leur activité est plus élevée chez les populations de Kandi, Dassa, Allada et Pobè par rapport à Kisumu ($p<0,05$) (Figures 35 et 36).

Par contre les activités du Glutathion-S-Transférase les plus élevées ont été observées chez les populations de Dassa, Allada et Pobè comparativement à Kisumu ($p<0,05$) (Figure 37).

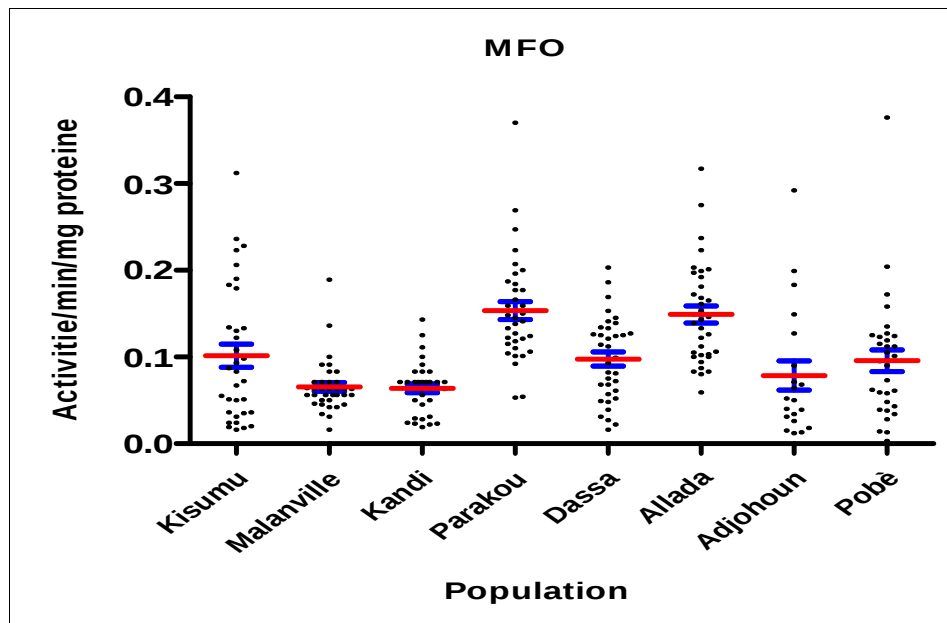


Figure 34: Activités des mono-oxygénases chez les *An. gambiae s.l* collectés

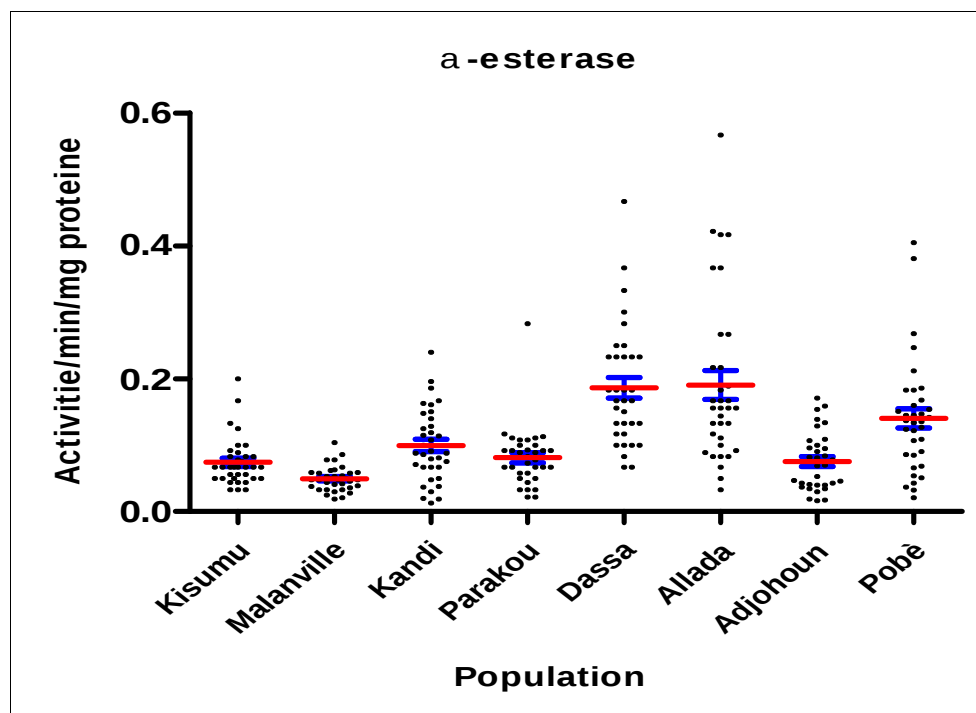


Figure 35: Activités des α -estérases chez les *An. gambiae s.l* collectés

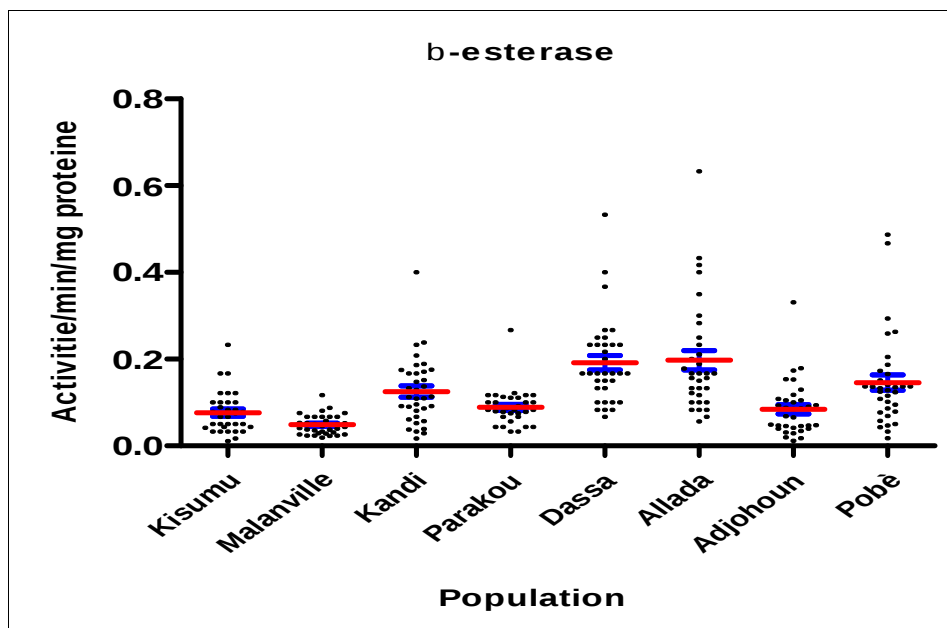


Figure 36: Activités des β -estérases chez les *An. gambiae s.l* collectés

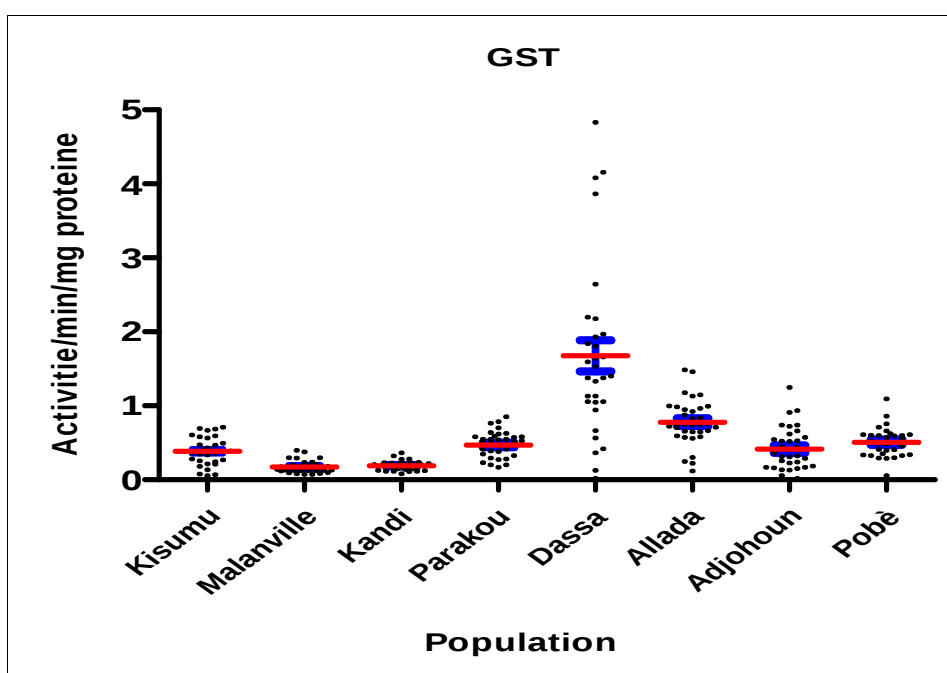


Figure 37: Activités des Glutathion-S-transférase chez les *An. gambiae s.l* collectés

1.8 Cartographie des mécanismes de résistance

La figure 38 montre une répartition du Nord au Sud du mécanisme de résistance Kdr. Il est présent sur tous les sites d'étude. Quant à la mutation Ace-1R, elle est seulement présente dans le Nord à de très faibles fréquences (Figure 38). La résistance métabolique est présente dans certaines localités alors qu'elle est absente dans d'autres (Figure 38).

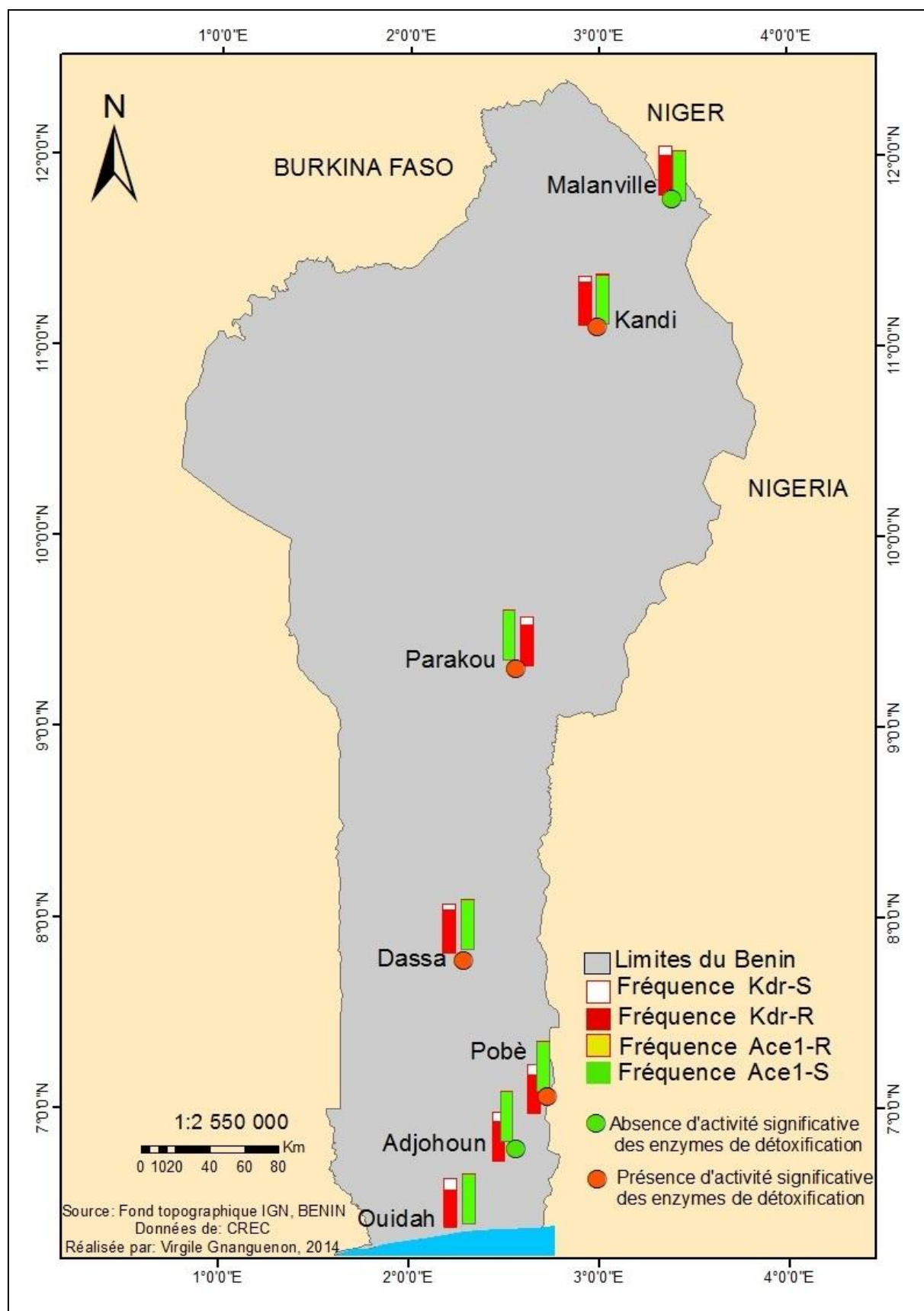


Figure 38: Distribution des mécanismes de résistance aux insecticides sur les sites d'étude

2. Discussion

Le suivi de la résistance aux insecticides est recommandé par l'OMS dans tous les pays qui utilisent les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MIILD) ou la pulvérisation intradomiciliaire (PID) pour la lutte antipaludique (WHO 2013). La plupart des pays d'Afrique qui ont mis en place une politique de surveillance de la résistance depuis 2010 se sont rendu compte que la résistance n'est pas seulement l'apanage des pyréthrinoïdes (Knox *et al.*, 2014). Au Bénin par exemple, des cas de résistance aux différentes classes d'insecticide ont été également signalés (Akogbeto & Yakoubou 1999; Yadouleton *et al.*, 2010; Djègbè *et al.*, 2011; Aikpon *et al.*, 2013b; Aizoun *et al.*, 2013). La présente étude révèle une résistance confirmée à la deltaméthrine (pyréthrinoïde) sur l'ensemble du pays sauf à Ouidah. Elle montre également une résistance au bendiorcarb (carbamates) dans certaines localités et une sensibilité au pirimiphos méthyl et au fénitrothion (organophosphoré).

Les niveaux de résistance à la deltaméthrine varient significativement d'une commune à une autre. La sensibilité observée à Ouidah pourrait être due à la prédominance de *An. melas* probablement sensible aux insecticides comme l'ont montré Akogbeto et Yakoubou (1999).

La variation du niveau de résistance à la deltaméthrine dépend de la variation des pressions de sélection exercées sur les différentes populations vectrices. En effet, cette classe d'insecticide se retrouve sur la plupart des moustiquaires distribuées à l'échelle nationale (Laxminarayan *et al.*, 2006). Mais à cela, s'ajoutent les pressions engendrées par l'utilisation des insecticides agricoles dans les localités où l'agriculture et le maraîchage constituent les activités principales (Diabate *et al.*, 2002; Ranson *et al.*, 2009).

Le gène Kdr est fortement associé à cette résistance et représente le principal gène sélectionné chez les populations résistantes aux insecticides. Il a été retrouvé à des fréquences alléliques très élevées (0,80 en moyenne) dans les populations de *An. gambiae s.l* testées. Les individus résistants aux pyréthrinoïdes précédemment détectés dans les zones cotonnières (Akogbeto & Yakoubou 1999; Yadouleton *et al.*, 2010) sont actuellement largement répandus sur le territoire national et se retrouvent aussi bien dans les populations de *An. gambiae* que dans les populations de *An. melas* et *An. coluzzii*. Ils proviennent souvent d'événements mutationnels indépendants (Boyer 2011). Leur expansion est liée à la fois à la bio-écologie du vecteur et à l'intensité de la pression de sélection exercée par l'utilisation des insecticides en santé publique et en agriculture (Ndiath *et al.*, 2012).

Outre la résistance aux pyréthrinoïdes, nous avons noté l'apparition de la résistance aux carbamates. Elle est associée à de faibles fréquences du gène Ace-1R détecté dans les localités concernées. Cette mutation a été précédemment signalée par Corbel *et al.* (2007),

Djogbénou *et al.* (2008), Djènantin *et al.* (2010), Yadouleton *et al.* (2010) et Aïkpon *et al.* (2013a). Ce début de sélection du gène Ace- R est à suivre de très près en ce sens que, depuis quelques années au Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme s'emploie à utiliser le bendiocarb en pulvérisations intradomiciliaires dans le cadre de la mise en œuvre de ses stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme. Ce qui pourrait augmenter, les années à venir, la fréquence du gène de résistance Ace-1R dans les populations vectrices. Il urge à cet effet que des surveillances continues soient effectuées dans les milieux traités au bendiocarb afin de suivre l'évolution du gène Ace-1R par rapport à l'état initial. Cette surveillance permettra de mieux gérer la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides pour un meilleur contrôle de la transmission du paludisme

Cependant, si les gènes Kdr et Ace-1R confèrent un effet significatif à la résistance des vecteurs, ils n'expliquent pas complètement les cas de résistance observés car de nombreux individus homozygotes sensibles survivent à l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux carbamates (Tia *et al.*, 2006). Ce qui suggère que d'autres mécanismes alternatifs de résistance comme les mécanismes métaboliques opèrent dans ces populations de moustiques.

Afin d'explorer les mécanismes de résistance métabolique impliqués dans la résistance de ces populations, une approche biochimique a été utilisée. Elle a permis d'identifier une forte activité de la Glutathion-S-transférase, du cytochrome P450 et des estérases non-spécifiques dans certaines localités. Ces enzymes peuvent conférer la résistance aux organophosphorés, aux organochlorés, aux pyréthrinoïdes et aux carbamates (Vontas *et al.*, 2002). La surexpression de ces enzymes peut expliquer la lenteur de l'effet des insecticides sur les populations de moustiques en absence de résistance moléculaire (Felix & Silveira 2012). L'utilisation des moustiquaires traitées avec des synergistes pourrait faciliter la lutte contre les populations de moustiques portant les mécanismes de résistance métabolique.

Idéalement, l'apparition de la résistance à un insecticide doit induire un changement de politique visant à remplacer cet insecticide par un autre dans le cadre d'une utilisation judicieuse de ces produits. Cependant, très peu d'insecticides sont actuellement disponibles pour pourvoir aisément à ce remplacement (Rush & Schneider 1990). Le changement d'insecticide peut également entraîner des coûts plus élevés des programmes d'intervention limitant ainsi les options de la gestion de la résistance. De façon générale, l'utilisation d'insecticides ne crée pas de résistance en soi, mais sélectionne une petite proportion d'individus ayant une mutation génétique qui leur permettent de résister et de survivre aux effets de l'insecticide. Si cet avantage est maintenu par l'utilisation constante du même insecticide, les individus résistants se reproduisent et les mutations génétiques qui confèrent la

résistance sont transférées à la descendance augmentant ainsi la fréquence des individus résistants dans la population (Berticat *et al.*, 2008). Ce processus de sélection prendra plus de temps à se propager si le gène de la résistance est rare ou présent à une faible fréquence. Sa propagation dans la population est complexe et dépend de plusieurs facteurs d'ordre génétiques, biologiques et opérationnelles (IRAC 2011). Les facteurs biologiques concernent le cycle de vie de l'insecte (le taux de reproduction, le nombre de génération ou progéniture, le taux de migration et d'isolement, etc.), tandis que les facteurs génétiques comprennent les caractéristiques intrinsèques des gènes de résistance (mono fonction de la résistance polygénique, la domination, le coût génétique et l'interaction des gènes) (Corbel & N'Guessan 2013). Les facteurs opérationnels concernent le traitement insecticide lui-même, y compris la méthode et la fréquence d'application, le dosage et l'activité résiduelle des insecticides ainsi que le niveau de couverture de l'insecticide. Ces différents facteurs doivent donc être pris en compte pour une gestion efficace de la résistance.

En théorie, la gestion de la résistance aux insecticides devrait être effectuée en alternant les méthodes de lutte antivectorielle basées sur l'utilisation d'insecticide et les méthodes non-insecticides. Dans la pratique, la plupart des méthodes non-insecticides fonctionnent bien dans les essais expérimentaux, mais deviennent difficiles lorsque les programmes intensifient leur utilisation à long terme (opérationnel) (Gentilini *et al.*, 2012). Ce qui suggère que sur le plan opérationnel, la forme la plus simple de gestion de la résistance devrait concerner la gestion de l'utilisation des insecticides. La mise en place des stratégies de gestion pouvant retarder la pression de sélection des insecticides sur les différents mécanismes de résistance présents dans les populations de moustiques constitue donc la principale porte de sortie pour les programmes de lutte antivectorielle. Une autre alternative est la recherche d'autres formulations insecticides qui permettront de renforcer les possibilités de choix d'insecticides.

Conclusion

Cette étude montre le profil de résistance des vecteurs du paludisme aux différentes catégories d'insecticides utilisés pour la lutte antivectorielle. Elle révèle une distribution généralisée de la résistance de *An. gambiae s.l* aux pyréthrinoides et un début d'émergence de la résistance aux carbamates dans la région septentrionale du pays. Ce vecteur est encore sensible aux organophosphorés notamment le pirimiphos méthyl et le fénitrothion mais avec une sensibilité plus rapide à l'effet du pirimiphos méthyl (mortalité immédiate plus rapide). Le gène de résistance Kdr a été observé à des fréquences élevées chez les quatre vecteurs détectés : *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. gambiae* et *An. melas*. Le gène Ace-1R a été

également détecté mais a de très faibles fréquences. L'implication des mécanismes métaboliques de résistance a été également observée avec une surexpression de l'activité de ces enzymes dans certaines localités.

La possibilité la plus pratique de gestion de cette résistance qui s'offre pour les programmes de lutte antivectorielle repose sur l'usage approprié des insecticides. Le moment d'utilisation des insecticides, la méthode d'utilisation (combinée ou simple), la fréquence et la durée de leur utilisation sont des facteurs qui doivent faire l'objet de planification pour retarder la propagation de la résistance en attendant la conception et la mise en place d'autres stratégies plus efficaces.

Chapitre 5 :

Etude de la survie des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action dans les conditions de terrain et des facteurs associés à leur dégradation physique

La distribution nationale de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) est une intervention clé de prévention contre le paludisme (Lengeler 2004; Roll Back Malaria 2005; Gamble *et al.*, 2007). Cependant, les MIILD ont une durée de vie utile limitée et leur remplacement doit être programmé en temps opportun pour maintenir leur impact. Les retards souvent observés dans leur remplacement sont préjudiciables à leur efficacité opérationnelle. De même, un remplacement prématuré n'est pas envisageable pour des raisons de coût-efficacité. L'hypothèse actuelle concernant la durée de vie utile des MIILD est de trois à cinq ans dans des conditions de terrain (WHO 2008; Masum *et al.*, 2010). Même si le principe d'une durée d'efficacité de 3 à 5 ans est intégré dans la planification des campagnes de distribution des MIILD, l'unanimité sur cette durée d'efficacité des MIILD n'est pas obtenue partout (Mejia *et al.*, 2013).

Au Bénin, plus de 4 millions de MIILD de type Olyset® furent distribuées aux populations en 2011. Cette distribution massive a permis au PNLP d'atteindre son objectif, à savoir, une couverture universelle en moustiquaires imprégnées (PNLP 2011). Mais le second défi est le maintien de cette couverture à un niveau élevé. Pour relever ce défi, il est important de suivre l'efficacité et la durabilité des moustiquaires mises à la disposition des populations pour identifier le moment où il faut procéder à leur remplacement.

Pour identifier le meilleur moment où il faut remplacer les moustiquaires distribuées en 2011, nous avons évalué trois facteurs : (i) la survie des MIILD pour estimer les pertes en moustiquaires au sein des ménages, (ii) l'intégrité physique pour estimer leur taux d'usure, (iii) leur bio-efficacité pour estimer la chute de la quantité d'insecticide. Nous avons mesuré ces indicateurs, tout juste après la distribution et par intervalle de 6 mois. Nous avons utilisé les taux de perte observés pour décrire la vitesse à laquelle les moustiquaires perdraient leur impact. Les résultats sont discutés dans le contexte de la question du temps nécessaire pour procéder à une autre campagne de distribution.

Etant donné que l'usure des MIILD est fonction des pressions extérieures qu'elles subissent, nous avons suivi les moustiquaires dans différentes zones écologiques et dans plusieurs ethnies. Les principaux facteurs qui influencent l'intégrité physique et chimique des MIILD étant les fréquences d'utilisation et de lavage, nous avons mené nos investigations dans des zones où la forte densité culicidienne oblige la population à une utilisation systématique des moustiquaires et où la disponibilité en eau facilite leur lavage régulier. Les données enregistrées ont été confrontées à celles des zones témoins où les fréquences d'utilisation et de lavage sont faibles (Articles 3 et 4).

Article 3 :

Azondekon et al. *Parasites & Vectors* 2014, **7**:6
<http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/6>



RESEARCH

Open Access

A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin

Roseric Azondekon^{1,2*}, Virgile Gnanguenon^{1,3}, Frederic Oke-Agbo¹, Speraud Houeвоessa¹, Michael Green⁴ and Martin Akogbeto^{1,3}

Article 4:

Gnanguenon et al. *BMC Infectious Diseases* 2014, **14**:69
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/69>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Durability assessment results suggest a serviceable life of two, rather than three, years for the current long-lasting insecticidal (mosquito) net (LLIN) intervention in Benin

Virgile Gnanguenon^{1,2*}, Roseric Azondekon^{1,3}, Frederic Oke-Agbo¹, Raymond Beach⁴ and Martin Akogbeto^{1,2}

1. Résultats

1.1. Taux de survie/perte

Après 6 mois, 147 moustiquaires marquées sur les 2002 n'étaient plus présentes dans les ménages où elles se trouvaient au départ (T0) (Tableau XVII). Nous avons noté une différence significative entre les taux de survie des MIILD en fonction de la position géographique des sites (Nord versus Sud). Mais cette différence n'est pas significative lorsqu'on considère la proximité par rapport à un cours d'eau. Après 12 mois, la survie des MIILD estimée dans le Sud est de 65 % [IC 95 % : 62,54- 68,41]. Elle est significativement plus élevée dans le Nord avec un taux de 78 % [IC 95 % : 75,04 - 80,19]. Le taux de survie est de 71 % [IC 95 % : 67,87 à 73,49] pour les communautés éloignées des cours d'eaux et 73 % [IC 95 % : de 70,06 à 75,56] pour celles qui sont proches. La même tendance a été observée après 18 mois. La survie moyenne estimée au cours de cette période est de 50 % [IC

95 % : de 46,86 à 53,04] dans le Sud. Par contre, elle est nettement supérieure dans le Nord, 65 % [IC 95 % : 61,83- 67,73] et est de 57 % [54,00-60,12] pour les communautés éloignées de l'eau contre 58% [IC 95 % : 54,61- 60,73] pour les communautés proches de l'eau. Au bout de deux ans (T24), les taux de survie observés ne sont que de 38% à Kessounou, 54% à Malanville, 33% à Allada et 52% à Kandi (Tableau XVII).

En résumé, le taux de survie des MIILD (pour l'ensemble des communautés) est de 93% après 6 mois, 72 % après 12 mois, 57 % après 18 mois et 44% après 24 mois. Ces taux sont significativement différents entre les localités du Sud et du Nord, mais ne semblent pas varier en fonction de la distance à l'eau pour le lavage des moustiquaires. La perte des MIILD dans le Sud est 1,62 fois [IC 95 % : 01,41-01,86] plus élevé que dans le Nord.

Ces observations nous ont permis de prédire par le modèle de Weibull le taux de survie minimal des moustiquaires Olyset sur les différents sites d'étude. A Kessounou et Allada (au Sud) le taux de survie le plus faible (2%) serait observé au bout de 42 à 43 mois (Figure 39). Par contre à Malanville et à Kandi, ce taux minimal serait observé au bout de 52 à 54 mois (Figure 39). 50% des MIILD (médiane) seront perdues au bout de 20 mois à Kessounou et Allada contre 25 mois pour Malanville et Kandi.

Les taux de survie observés ont été comparés à ceux du modèle de NetCalc qui prédit la durée de vie utile des MIILD (Figure 40). Selon NetCalc, à 24 mois, on devrait observer un taux de survie de 74% pour les moustiquaires qui ont une durée de vie utile de trois ans et un taux de survie de 50% pour les moustiquaires qui ont une durée de vie utile de 2 ans. Cependant, le taux de survie moyen observé dans les communautés d'étude à 24 mois est de 44%. Ce taux est significativement inférieur ($P = 0,000$) à celui prévu pour une durée de vie utile de trois ans mais similaire au taux prédit pour une durée de vie utile de 2 ans ($p = 0,257$).

Tableau XVII: Taux de survie des MIILD par site d'étude

		Kessounou (Sud)	Malanville (Nord)	Allada (Sud)	Kandi (Nord)	Total
Proximité de l'eau pour le lavage des MIILD		<0,05 km	<0,05 km	>5,0 km	>5,0 km	
Données de base (T₀)	Ménages sélectionnés	501	501	500	500	2002
Après 6 mois (T₆)	Ménages éligibles	501	501	500	500	2002
	Ménages visités/ouverts	493	455	420	451	1819
	MIILD marquées retrouvées	444	424	374	430	1672
	(MIILD perdues)	(49)	(31)	(46)	(21)	(147)
	Taux de survie (%)	90	94	91	96	93
	IC 95%	87,30-92,52	91,35-95,61	87,95-93,03	93,66-97,24	91,50-94,60
Après 12 mois (T₁₂)	Ménages éligibles	452	470	454	479	1855
	Ménages visités/ouverts	393	411	396	442	1642
	MIILD marquées retrouvées	253	338	286	348	1225
	(MIILD perdues)	(140)	(73)	(110)	(94)	(417)
	Taux de survie (%)	62	79	69	77	72
	IC 95%	58,20-66,70	75,80-82,90	64,90-73,00	73,40-80,80	69,90-73,80
Après 18 mois (T₁₈)	Ménages éligibles	312	397	344	385	1438
	Ménages visités/ouverts	293	350	274	345	1262
	MIILD marquées retrouvées	227	279	184	283	973
	(MIILD perdues)	(66)	(71)	(90)	(62)	(289)
	Taux de survie (%)	49	65	51	65	57
	IC 95%	44,90-53,70	62,90-71,10	46,60-55,40	58,70-67,20	55,30-59,60
Après 24 mois (T₂₄)	Ménages éligibles	246	326	254	323	1149
	Ménages visités/ouverts	229	295	211	243	978
	MIILD marquées retrouvées	173	231	120	187	711
	(MIILD perdues)	(56)	(64)	(91)	(56)	(417)
	Taux de survie (%)	38	54	33	52	44
	IC 95%	33,90-42,40	49,90-58,60	28,70-37,00	47,40-56,20	41,90-46,30

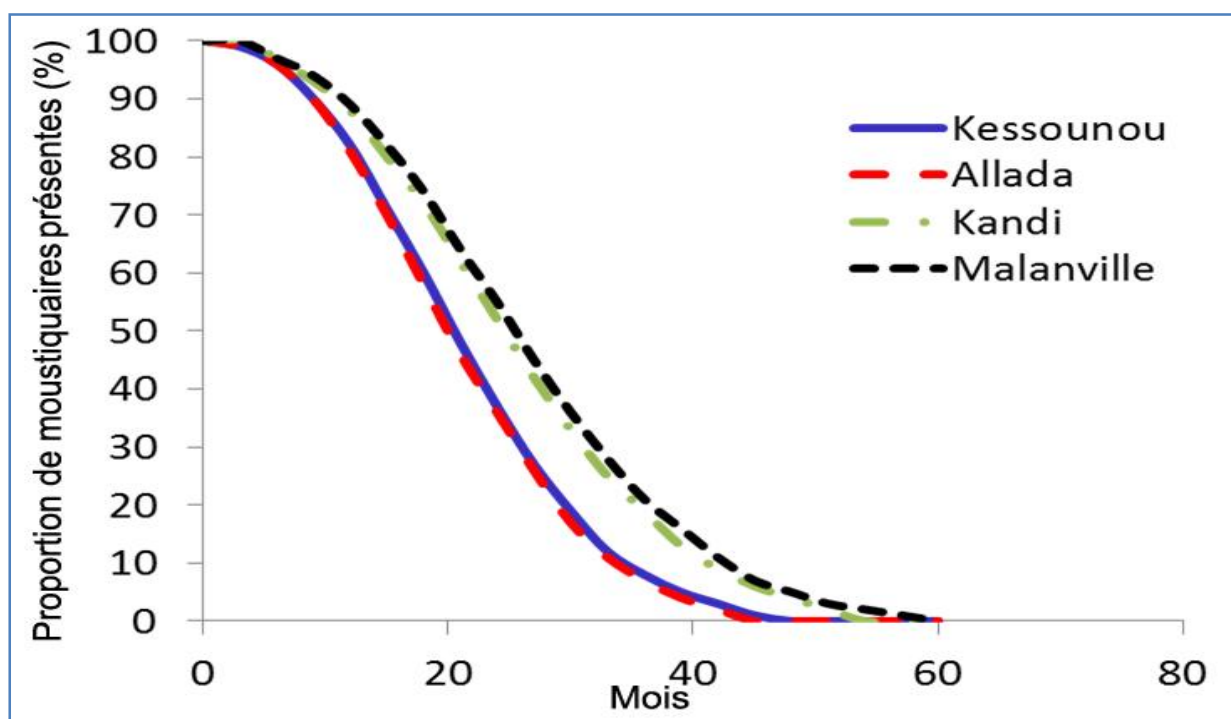


Figure 39: Modèles de perte en moustiquaires estimés pour les différents sites

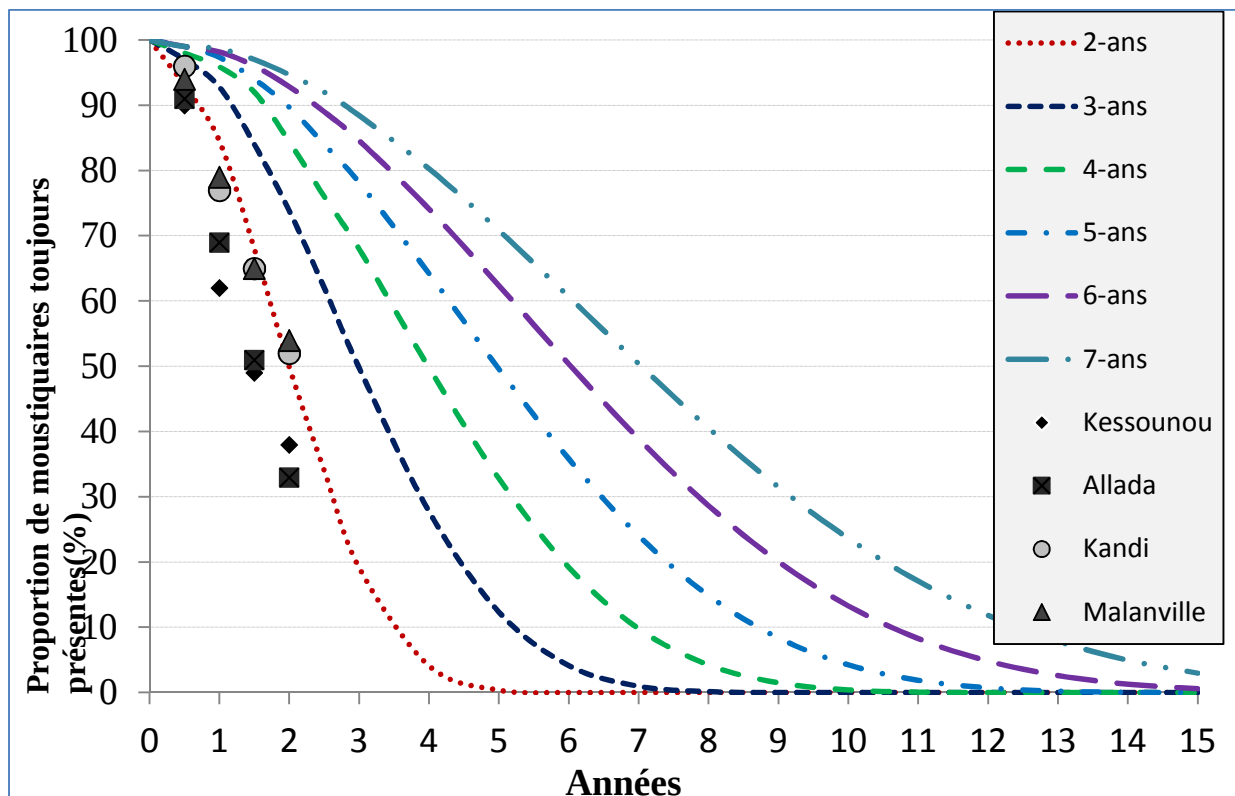


Figure 40: Comparaison des taux de survie observés à ceux prédits par Netcal

1.2. Raisons de la perte des moustiquaires

En deux ans (T0 à T24), 1120 moustiquaires sur les 2002 marquées ont été perdues dans la cohorte de départ. 147 moustiquaires étaient absentes à T6, 417 à T12, 289 à T18 et 267 à T24. Ce qui donne un taux de perte globale de 56% en deux ans soit 7% après 6 mois, 28% après un an et 43 après 18 mois. Le « déplacement » (taux de perte-2), représente la raison la plus souvent citée pour une moustiquaire non retrouvée. Elle a été mentionnée par 616 répondants sur les 1120 interviewés. Les moustiquaires jetées pour cause de « dommages physiques » ont été citées par 436 répondants. La « réorientation » de la moustiquaire a été mentionnée moins souvent (68 répondants après deux ans) (Tableau XVIII).

En résumé, les taux de pertes dues aux moustiquaires jetées pour cause de déchirures sont de 1% après 6 mois, 7% après 12 mois, 14% après 18 mois et 22% après deux ans. Les taux de pertes dues aux moustiquaires déplacées sont de 6% à T6, 18% à T12, 24% à T18 et 31% à T24 (Tableau XVIII). Les taux de perte-3 représentent seulement 3% des pertes observées.

Les pertes dues aux « dommages physiques » ont été plus souvent citées dans les communautés situées près de l'eau, avec 20% [IC 95 % : 16,69-23,68] à Malanville et 34% [IC 95 % : 16,69-23,68] à Kessounou, contre 13% [IC à 95 % : 10,51-16,45] à Kandi et 19% [IC 95 % : 16,36-23,31] à Allada. Le "déplacement", le sort le plus courant d'une MIILD non

retrouvée, a été citée plus souvent dans les communautés éloignées avec 30 % [IC 95 % : 26,53-34,57] à Kandi et 45% [IC 95 % : 41,09-49,78] à Allada, contre 21 % [IC 95 % : 17,43-24,53] à Kessounou et 26% [IC 95 % : 22,87-30,58] à Malanville. Le phénomène de « moustiquaire de pêche » a été observé à Kessounou où 7% des moustiquaires ont été utilisées pour la pêche.

Tableau XVIII: Raisons de la perte des moustiquaires

	Kessounou	Malanville	Allada	Kandi	Total
T₆ (MIILD perdues)	(49)	(31)	(46)	(21)	(147)
Taux de perte-1 (%) (T0 à T6)	2 (n=10)	1(n=3)	1 (n=5)	0(n=1)	1(n=19)
IC ₉₅ (%)	01,09-03,63	00,20-01,75	00,43-02,32	00,04-01,12	00,61-01,48
Taux de perte-2 (%)	7 (n=35)	5(n=28)	8(n=41)	4(n=20)	6(n=124)
IC ₉₅ (%)	05,07-09,56	03,89-07,96	06,10-10,94	02,60-06,10	05,22-07,34
Taux de perte-3	1 (n=4)	0(n=0)	0	0	0(n=4)
IC ₉₅ (%)	00,31-02,03				00,08-00,51
% MIILD perdues (perte totale)	10	6	9	4	7
T₁₂ (MIILD perdues)	(140)	(73)	(110)	(94)	(417)
Taux de perte-1 (%) (T0 à T12)	18 (n=89)	05 (n=22)	04 (n=18)	02 (n=8)	07 (n=137)
IC ₉₅ (%)	14,67-21-35	02,92-06,56	02,29-05,62	00,81-03,13	05,82-08,03
Taux de perte-2 (T0 à T12)	14 (n=69)	15 (n=77)	25 (n=126)	18 (n=92)	18 (n=364)
IC ₉₅ (%)	11,03-17,07	12,48-18,79	21,59-29,18	15,25-22,03	16,55-19,93
Taux de perte-3 (T0 à T12)	06 (n=31)	01 (n=05)	02 (n=12)	03 (n=15)	03 (n=63)
IC ₉₅ (%)	04,-39-08,65	00,43-02,31	01,38-04,15	01,83-04,89	02,47-04,01
% MIILD perdues (perte totale)	38	21	31	23	28
T₁₈ (MIILD perdues)	(66)	(71)	(90)	(62)	(289)
Taux de perte-1 (%) (T0 à T18)	25 (n=127)	12 (n=58)	10 (n=49)	07 (n=35)	14 (n=269)
IC ₉₅ (%)	21,74-29,34	09,06-14,68	07,49-12,72	05,08-09,58	12,01-15,00
Taux de perte-2 (T0 à T18)	19 (n=95)	22 (n=111)	37 (n=185)	25 (n=127)	26 (n=518)
IC ₉₅ (%)	15,77-22,63	18,74-26,00	32,88-41,32	21,78-29,39	24,00-27,84
Taux de perte-3 (T0 à T18)	07 (n=33)	01 (n=6)	02 (n=12)	03 (n=15)	03 (n=66)
IC ₉₅ (%)	04,73-09,11	00,55-02,59	01,38-04,15	01,83-04,89	02,60-04,17
% MIILD perdues (perte totale)	51	35	49	35	43
T₂₄ (MIILD perdues T0 à T24)	311	239	337	233	1120
Taux de perte-1 (%) (T0 à T24)	34(n=172)	20(n=100)	19(n=98)	13(n=66)	22(n=436)
IC ₉₅ (%)	30,31-38,59	16,69-23,68	16,36-23,31	10,51-16,45	20,03-23,64
Taux de perte-2 (T0 à T24)	21(n=104)	26(n=133)	45(n=227)	30(n=152)	31(n=616)
IC ₉₅ (%)	17,43-24,53	22,87-30,58	41,09-49,78	26,53-34,57	28,79-32,83
Taux de perte-3 (T0 à T24)	7(n=35)	1(n=6)	2(n=12)	3(n=15)	3(n=68)
IC ₉₅ (%)	5,07-9,56	0,55-2,59	1,38-4,15	1,83-4,89	2,69-4,28
% MIILD perdues (perte totale)	62	47	66	46	56

1.3. L'intégrité du tissu des MIILD

Parmi les moustiquaires marquées retrouvées dans les ménages à T6, les trouées représentent 36% à 64% (Tableau XIX). A T12, ces pourcentages sont passés de 62% à 87%. De 18 mois à 24 mois, la proportion de moustiquaires trouées est restée stable à Kessounou et Malanville

avec un taux de 92% à T18 et T24. Par contre à Allada et Kandi, la perte de l'intégrité a continué d'augmenter passant d'environ 60% (62-69%) à T18 à environ 80% (73-82%) à T24. Des différences significatives ont été observées dans la perte de l'intégrité physique entre les communautés proches des sources d'eau par rapport aux communautés éloignées des sources d'eau (Tableau XIX).

Après un an, les indices proportionnels de trous (pHI) dans les communautés près des sources d'eau sont en moyenne de 691 à 799, contre 398 à 510 dans les communautés éloignées des sources d'eau. En outre, les valeurs médianes du pHI pour les communautés proches des cours d'eau sont de 243 à 290, et, sont trois à six fois supérieures à celles observées dans les communautés éloignées des sources d'eau (46 à 86). L'application des différentes catégories de condition des moustiquaires (en bon état, à réparer et à remplacer), a montré que 30 à 33% des moustiquaires sont à remplacer dans les communautés proches des cours d'eau contre 16 à 22% dans les communautés éloignées des sources d'eau. De plus, le nombre de moustiquaires dans la catégorie « en bon état » est significativement plus élevé ($p < 0,05$) dans les communautés éloignées des sources d'eau.

Après deux ans, les moyennes des indices proportionnels de trous (pHI) dans les communautés proches de l'eau sont de 888 à 1479, contre 447 à 623 dans les communautés éloignées des sources d'eau. Les valeurs médianes des pHI pour les communautés à accès facile à l'eau sont de 312 à 706, et, sont également supérieures à celles observées dans les communautés éloignées des sources d'eau (96 à 105). Il y a 36 à 48% des moustiquaires à remplacer dans les communautés à accès facile à l'eau, contre 18 à 24% dans les communautés éloignées des sources d'eau (Tableau XIX). Le nombre de MIILD en « bon état » est toujours significativement plus élevé ($p < 0,05$) dans les communautés éloignées des sources d'eau.

Tableau XIX: Conditions physiques des MIILD après chaque visite d’évaluation

	Kessounou (Sud)				Malanville (Nord)				Allada (Sud)				Kandi (Nord)			
	T6	T12	T18	T24	T6	T12	T18	T24	T6	T12	T18	T24	T6	T12	T18	T24
MIILD marquées retrouvées	444	253	227	173	424	338	279	231	374	286	184	120	430	348	283	187
n (%) de MIILD trouées	230(52)	219 (87)	210 (92)	159 (92)	271(64)	294 (87)	260 (93)	217 (94)	134(36)	178 (62)	133 (72)	91 (76)	153(36)	241 (69)	208 (73)	153 (82)
IC ₉₅ (%)	45,04-56,54	81,73-90,51	88,28-95,58	86,79-95,51	59,14-68,49	82,92-90,38	89,57-95,85	90,04-96,65	28,96-40,92	56,34-67,88	65,22-78,62	67,17-83,18	31,05-40,31	64,11-74,06	67,95-78,55	75,53-87,07
pHI Moyen	NA	799	1479	1205	NA	691	888	1139	NA	398	623	1012	NA	510	447	573
pHI Médian	NA	290	706	606	NA	243	312	599	NA	46	105	138	NA	86	96	138
IQR pHI	NA	1034	2057	1737	NA	978	1156	1484	NA	439	667	995	NA	560	477	1484
n (%) de MIILD 'en bon état'	NA	69 (27)	43 (19)	39 (23)	NA	107(32)	73 (26)	61 (26)	NA	162 (57)	83 (46)	50 (42)	NA	161 (46)	133 (47)	80 (43)
IC ₉₅ (%)		22,16-33,07	14,38-24,54	16,95-29,33		26,93-36,80	21,36-31,62	21,14-32,44		50,8-62,26	39,2-53,67	33,24-50,61		41,10-51,52	41,26-52,81	35,91-49,95
n (%) de MIILD 'utilisable'	NA	100 (40)	74 (33)	59 (34)	NA	129 (38)	105 (38)	69 (30)	NA	79 (28)	53 (30)	36 (30)	NA	112(32)	99 (35)	60 (32)
IC ₉₅ (%)	NA	33,70-45,66	26,83-38,94	27,45-41,44		33,15-43,45	32,1-43,45	24,34-36,06		22,76-33,08	23,4-36,67	22,53-38,72		27,49-37,26	29,66-40,71	25,81-39,08
n (%) de MIILD 'à remplacer'	NA	84 (33)	110 (48)	75 (43)	NA	102 (30)	101 (36)	101 (44)	NA	45 (16)	43 (24)	34 (28)	NA	75 (22)	51 (18)	47 (25)
IC ₉₅ (%)	NA	27,69-39,22	42,04-54,93	36,19-50,80	NA	25,53-35,27	30,7-41,27	37,48-50,17	NA	11,9-20,40	18,3-30,78	21,04-36,97	NA	17,5-26,17	13,98-22,92	19,46-31,81

NA : Non Applicable ; IQR : Interval interquartile ; IC₉₅ : Intervalle de confiance à 95% ; T6= 6 mois ; T12=12 mois ; T18=18 mois ; T24=24 mois

1.4. Causes directes de la perte de l'intégrité physique

La catégorisation des moustiquaires trouées selon la nature du trou représentant soit une simple déchirure dans le tissu , une déchirure dans la couture , un trou de brûlure ou le résultat de déchirure par les rongeurs , a montré que la catégorie « simple déchirure dans le tissu » représente en moyenne 85 % des dégâts , tandis que les « trous de brûlures » représentent 10% (Tableau XX). Les « coutures ouvertes » représentent 3% et 2% pour les « dégâts de rongeurs » lors de l'évaluation T12 (Tableau XX).

Après deux ans, la catégorie « simple déchirure dans le tissu » représente en moyenne 77 % des dégâts, tandis que les « trous de brûlures » représentent 16 %. 3 % des dégâts sont dus aux « coutures ouvertes » contre 2 % pour les dégâts engendrés par les rongeurs (Tableau XX). Les dommages physiques dus à la « simple déchirure dans le tissu » sont similaires entre les communautés proches et éloignées des cours d'eau ($p > 0,05$). Cependant, les trous de brûlures sont significativement élevés à Kessounou ($p < 0,05$).

Tableau XX: Distribution des types de dommages physiques observés sur les moustiquaires après 12, 18 et 24 mois

	Kessounou (Sud)			Malanville (Nord)			Allada (Sud)			Kandi (Nord)		
	T12	T18	T24	T12	T18	T24	T12	T18	T24	T12	T18	T24
n (%) de MIILD troués	219	210	159	294	260	217	178	133	91	241	208	153
MIILD avec simple déchirure	158 (72)	142 (68)	110(69)	279 (95)	248 (95)	178(82)	133 (75)	114 (86)	78(86)	219 (91)	178 (86)	112(73)
CI ₉₅ (%)	65,87-77,66	61,02-73,58	62,57-74,92	91,75-96,88	92,11-97,34	76,38-86,57	67,86-80,54	78,76-90,66	77,08-91,46	86,57-93,89	80,16-89,71	65,68-79,59
n (%) de MIILD avec défaut de couture	4 (2)	5 (2)	4(3)	3 (1)	5 (2)	8(4)	10 (6)	3 (2)	2(2)	9 (4)	16 (8)	13(8)
CI ₉₅ (%)	00,71-04,60	01,02-05,45	00,97-05,62	00,35-02,96	00,82-04,42	01,88-07,10	03,08-10,03	00,77-06,42	00,11-03,38	01,98-06,94	04,79-12,13	05,03-13,99
n (%) de MIILD avec brûlures	52 (24)	62 (29)	44(27)	9 (3)	6 (2)	29(13)	26 (14)	11 (8)	8(9)	12 (5)	9 (4)	20(13)
CI ₉₅	18,59-29,80	23,77-36,02	21,31-35,09	01,62-05,71	01,06-04,94	09,47-18,53	10,17-20,54	04,68-14,20	05,51-13,71	02,87-08,50	02,29-08,02	08,62-19,33
n (%) de MIILD déchirées par les rongeurs	5(2)	2 (1)	1(1)	3(1)	1(1)	2(1)	9 (5)	5 (4)	3(3)	1 (0)	5 (2)	8(5)
CI ₉₅	00,98-05,23	00,26-03,41	00,11-03,48	00,35-02,96	00,07-02,15	00,25-03,30	02,68-09,33	01,62-08,50	01,13-07,25	00,07-02,31	01,03-05,50	02,62-09,98

1.5. Facteurs associés aux déchirures des moustiquaires

Le Tableau XXI donne les caractéristiques des ménages et des MIILD par site : utilisation des MIILD, le matériau de toiture, l'emplacement de la moustiquaire dans la journée, l'emplacement de la cuisine, le combustible utilisé pour la cuisson et le type de mobilier de couchage (lit, matelas, autres).

La fréquence de lavage est plus élevée dans les communautés proches des cours d'eau. A Kessounou et Malanville, la plupart des résidants ont indiqué qu'ils ont lavé leurs moustiquaires entre 2-5 fois lors des 6 premiers mois d'utilisation. A Allada et Kandi, la fréquence est plus faible : deux fois pour la même période. Après deux ans environ, un tiers des répondants ont lavé leurs moustiquaires plus de 10 fois à Kessounou et Malanville alors qu'à Allada et Kandi, les moustiquaires lavées plus de 10 fois sont rares (2%).

La plupart des répondants ont indiqué avoir dormi sous leurs MIILD la nuit précédant l'enquête (55-84%). Plus de la moitié des habitations ont comme toiture la tôle en acier. La plupart des ménages (62 à 100%) ont utilisé du bois de chauffage pour la cuisine. Comme matériel de couchage, nous avons observé que les nattes sont plus fréquentes (50-95%) à Kessounou et Malanville (Tableau XXI), alors que, à Allada et Kandi les lits sont plus fréquemment utilisés (44-51%).

Les facteurs en relation avec la perte de l'intégrité physique des moustiquaires sont la fréquence de lavage, le faible entretien des MIILD, l'emplacement de la cuisine (à l'intérieur du ménage), le type de combustible pour la cuisine, la fréquence d'utilisation, la proximité à un cours d'eau et le nombre de dormeur dans la moustiquaire (Tableau XXII). Plus la fréquence de lavage augmente, plus le risque de détérioration physique de la moustiquaire augmente ($p < 0,0001$).

Tableau XXI: Distribution des caractéristiques des ménages visités à T12, T18 e t T24

Facteurs	Modalités	KESSOUNOU			MALANVILLE			ALLADA			KANDI		
		T12	T18	T24	T12	T18	T24	T12	T18	T24	T12	T18	T24
Fréquence de lavage	aucune	08,16	02,17	02,08	04,00	00,00	0,00	28,00	31,91	14,63	14,29	22,45	02,44
	Une Fois	04,08	02,17	04,17	06,00	06,12	02,27	30,00	10,64	12,20	16,33	12,24	02,44
	2-5fois	61,22	36,96	18,75	52,00	24,49	22,73	38,00	44,68	51,22	63,27	48,98	60,98
	6-10fois	16,33	39,13	41,67	24,00	34,69	52,27	04,00	12,77	19,51	06,12	16,33	31,71
	10+	10,20	19,57	33,33	14,00	34,69	22,73	00,00	00,00	02,44	00,00	00,00	02,44
Etat de propreté	propre	30,61	41,30	22,92	46,00	26,53	27,27	28,00	25,53	29,27	36,73	28,57	17,07
	Sale	69,39	58,70	77,08	54,00	73,47	72,73	72,00	74,47	70,73	63,27	71,43	82,93
Fréquence d'usage	pas du Tout	04,08	04,35	02,08	00,00	06,12	04,55	08,00	00,00	07,32	02,04	2,04	04,88
	souvent	26,53	30,43	41,67	16,00	34,69	27,27	22,00	25,53	26,83	16,33	42,86	31,71
	tous les soirs	69,39	65,22	56,25	84,00	57,14	68,18	70,00	74,47	65,85	81,63	55,10	63,41
Type de toit	dalle	2,04	02,17	08,33	02,00	01,15	02,27	02,00	02,13	0,00	01,00	02,04	00,00
	paille	20,41	34,78	29,17	22,00	21,30	27,27	00,00	00,00	0,00	06,12	02,04	02,44
	Tôle/Tuile	77,55	63,04	62,50	76,00	77,55	70,45	98,0	97,87	100,0	92,88	95,92	97,56
Emplacement des MIILD	accrochée	71,43	71,74	35,42	74,00	59,18	40,91	64,00	80,85	56,10	81,63	71,43	68,29
	Pliée	22,45	23,91	60,42	26,00	36,73	56,82	20,00	14,89	36,59	16,33	28,57	24,39
	rangée	6,12	04,35	04,17	00,00	04,08	02,27	16,00	04,26	07,32	02,04	00,00	07,32
Emplacement de la Cuisine	dehors	83,67	76,52	75,00	90,00	100,0	97,73	96,00	93,62	100,0	97,96	100,0	97,56
	intérieur	16,33	23,48	25,00	10,00	00,00	02,27	04,00	06,38	00,00	02,04	00,00	02,44
Chauffage	Bois	97,96	97,83	100,0	90,00	97,96	93,18	62,00	68,09	65,85	67,35	87,76	87,80
	Charbon	02,04	02,17	00,00	08,00	02,04	06,82	36,00	29,79	34,15	30,61	10,20	12,20
	électricité	00,00	00,00	00,00	02,00	00,00	00,0	02,00	00,00	00,00	02,04	02,04	00,00
	Pétrole	0,00	00,00	00,00	0,00	00,00	00,0	0,00	02,13	00,00	0,00	00,00	00,00
Couchage	Autres	0,00	00,00	00,00	8,00	12,24	04,55	4,00	02,13	04,88	20,41	10,20	04,88
	lit	4,08	08,70	08,33	42,00	30,61	40,91	44,00	48,94	41,46	51,02	51,02	39,02
	natte	95,92	91,30	91,67	50,00	57,14	54,55	52,00	48,94	53,66	28,57	38,78	56,10
Nombre total de ménages visités/ouverts		393	293	229	411	350	295	396	274	211	442	345	243

Tableau XXII: Facteurs associés à la perte de l'intégrité physique des MIILD

Facteurs	Modalités	coefficients	Rate Ratio	IC-95%(RR)	P (Wald test)	P (LR-test)
Fréquence de lavage	Aucune	-	1,00	-	-	
	01	1,24	3,45	[01,63-07,29]	0,001225	
	02-05	1,11	3,02	[01,57-05,82]	0,000915	<0,0001
	06-10	1,75	5,73	[02,92-11,25]	<0,00001	
	10+	2,12	8,36	[04,06-17,21]	<0,00001	
Type de Toit	Tôle	-	1,00	-	-	
	Dalle	0,36	1,43	[00,63-03,25]	0,39118	0,490519
	Paille	-0,14	0,87	[00,60-01,25]	0,44034	
Localisation de la cuisine	Extérieur	-	1,00	-	-	0,012664
	intérieur	0,51	1,67	[01,11-02,50]	0,0131	
Energie cuisine	feu de Charbon	-	1,00	-	-	0,017557
	feu de bois	0,53	1,70	[01,09-02,66]	0,01951	
Type de couchage	Autres	-	1,00	-	-	
	Lit	-0,48	0,62	[00,37-01,03]	0,06566	0,20685
	matte	-0,38	0,69	[00,42-01,12]	0,13257	
Entretien	Propre	-	1,00	-	-	0,000822
	Sale	0,49	1,63	[01,22-02,17]	0,00091	
Fréquence d'utilisation	Pas du tout	-	1,00	-	-	
	souvent	-1,03	0,36	[00,20-00,65]	0,00077	0,004242
	Tous les Soirs	-0,88	0,42	[00,23-00,74]	0,00269	
Proximité à un cours d'eau	>5 km	-	1	-	-	0,000106
	<0,5 km	0,48	1,61	[01,27-02,05]	0,000106	
Nombre de dormeur	Nombre de Dormeur	0,13	1,14	[01,03-01,26]	0,014079	0,01660

1.6. Bio-efficacité

1.6.1. Calibrage du test GC

La Figure 41 montre les mortalités observées lors des essais biologiques en cône test OMS. Sur les 37 moustiquaires testées, 23 ont montré une mortalité supérieure à 80%. La mortalité moyenne observée est de 83% pour les moustiquaires neuves et 79% pour les moustiquaires déjà en cours d'utilisation sur le terrain. La mortalité minimale est de 18% et la maximale de 100%. En comparant ces résultats avec la méthode GC, nous avons identifié une valeur seuil de 2,73 µg perméthrine pour une surface de 35 cm², correspondant à la quantité d'insecticide susceptible d'entraîner une mortalité supérieure à 80% comme pour les tests en cône OMS. Les moustiquaires ayant une quantité de perméthrine supérieure ou égale à 2,73 µg sont alors

considérées comme ayant une bio-efficacité adéquate pour atteindre le seuil requis par l'OMS pour une MIILD. Les MIILD donnant des résultats de GC en dessous de 2,73 μg ont été comptés comme ne répondant pas au seuil minimum de bio-efficacité pour l'OMS. L'évaluation statistique de l'essai, à l'aide du receiver operating characteristic (ROC) test a montré que la méthode de GC peut prédire les résultats des tests en cône de l'OMS dans des marges raisonnables (spécificité = 75,9%, sensibilité = 87,0%, AUC = 0,83 (0,7-0,92)) (Figure 42). Cette sensibilité et cette spécificité qui sont de loin au dessus de 50%, valident l'efficacité et la performance de la mesure diagnostique utilisée.

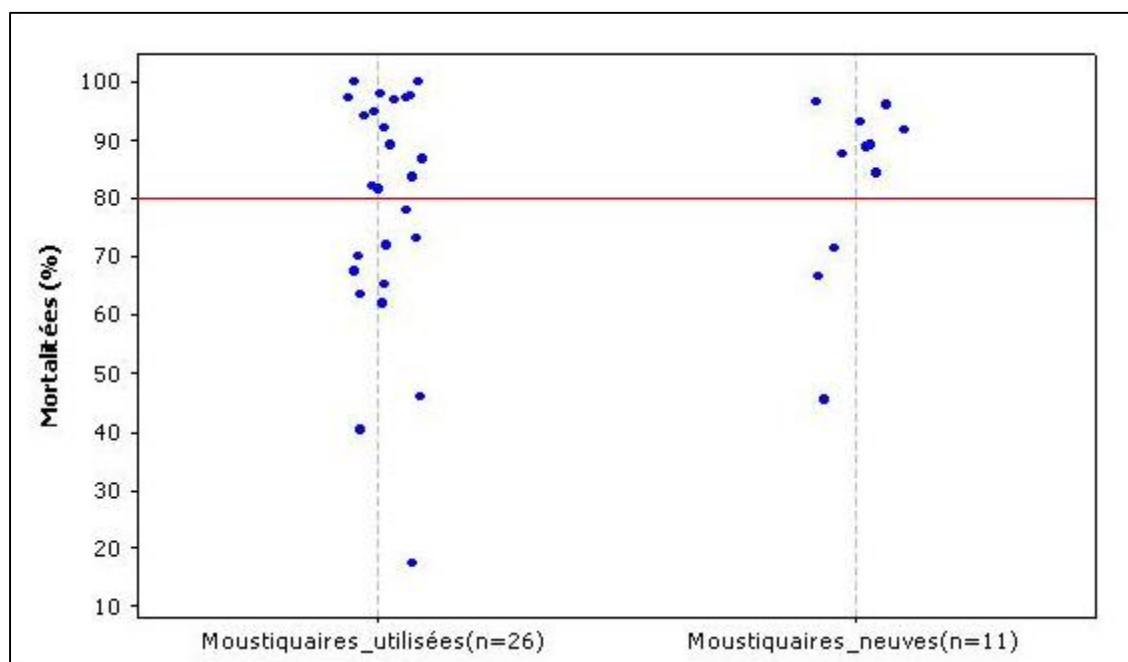


Figure 41: Mortalités observées avec les tests en cône de l'OMS et utilisées pour déterminer le seuil de GC

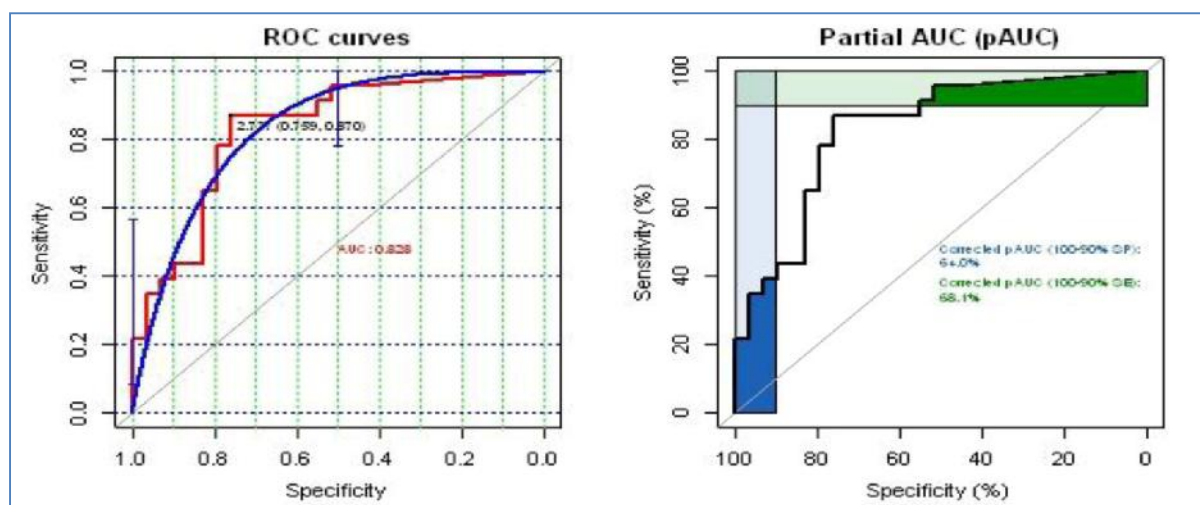


Figure 42: courbes ROC montrant la prédiction des résultats des tests en cône de l'OMS par la méthode GC

1.6.2. Suivi de la bio-efficacité

Le suivi de la bio-efficacité des MIILD a été effectué par la méthode de chromatographie en phase gazeuse d'échantillons d'insecticides prélevés à la surface des MIILD sélectionnées au hasard. Les résultats obtenus sont comparés à ceux des données de base (données des mesures effectuées sur des moustiquaires neuves juste après la distribution). La ligne rouge sur les figures 43 à 46 indique le seuil GC équivalant à une quantité d'insecticide de surface suffisamment élevée pour donner au moins 80% de mortalité des moustiques.

Après la campagne de distribution des MIILD, une seule moustiquaire neuve sur 50 testées présentait une quantité d'insecticide en dessous du seuil d'efficacité de 2.73 µg, soit un taux d'efficacité des MIILD neuves testées à 98%. Après six mois d'utilisation, la perte de la bio-efficacité est de 58% à Kessounou, 52% à Kandi, 44% à Allada et de 9% à Malanville. A T6, nous avons enregistré 72 MIILD (44% : 72/162) en dessous du seuil minimal de bio-efficacité. Les résultats sont résumés sur la figure 40. Ils montrent une perte importante de la bio-efficacité sur tous les quatre sites au cours de la période d'évaluation (T0-T6) ($p=0,0001$). Aucune différence significative n'a été observée entre les sites proches des cours d'eau et les sites éloignés des sources d'eau. Cependant, une variabilité entre les quantités d'insecticide des moustiquaires sur les différents sites a été observée (Figure 44).

Un total de 191 moustiquaires a pu être effectivement analysé par chromatographie gazeuse à T12 (12 mois après distribution) et comparé aux moustiquaires évaluées à T0 (juste après la distribution). Seulement 2% (3/191) des moustiquaires échantillonnées ont montré une concentration d'insecticide au dessus du seuil d'efficacité (Figure 45). Cela représente une chute d'efficacité de 98% (188/191) après un an d'utilisation. Toutefois, nous avons noté une différence significative entre la concentration d'insecticide des moustiquaires d'Allada, de Kessounou et Kandi ($p<0,05$). Mais c'est le cas contraire entre Allada et Malanville ($p=0,142$) d'une part et entre Kessounou, Kandi et Malanville ($p>0,05$) d'autre part.

Toutes les moustiquaires testées à T18 et T24 sont en dessous du seuil d'efficacité de 2,73µg. Aucune des moustiquaires testées pendant ces périodes n'a montré une quantité d'insecticide pouvant induire une mortalité des anophèles supérieure à 80% (Figure 46). Cette tendance a été vérifiée avec les tests en cône après un an. En effet, sur seize moustiquaires de Kessounou et d'Allada testées par la méthode OMS des bio-essais (test en cône), seulement 3 avaient induit une mortalité supérieure au seuil de 80% (Figure 47). Ce qui représente un taux d'efficacité de 18,75%. Seuls les facteurs comme la fréquence d'utilisation ($p=0,028$) et le type de couchage ($p=0,0117$) ont montré une influence significative sur la dégradation de l'insecticide.

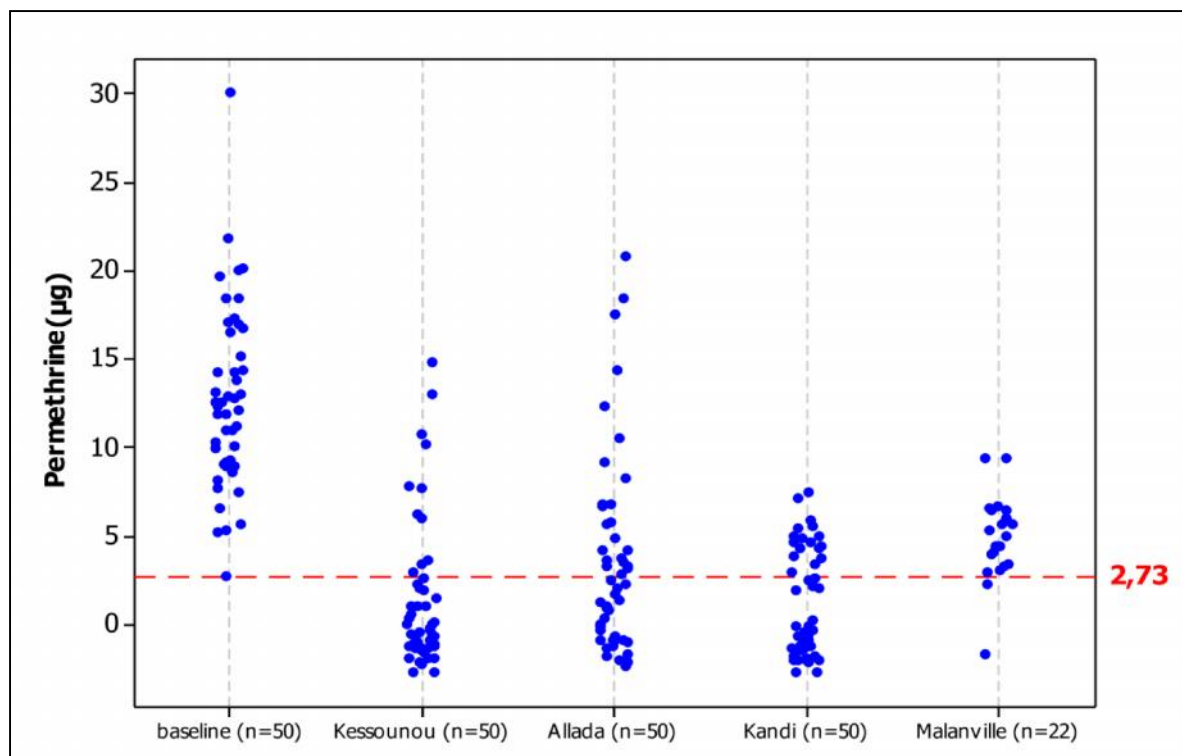


Figure 43: Diagramme de dispersion des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T6

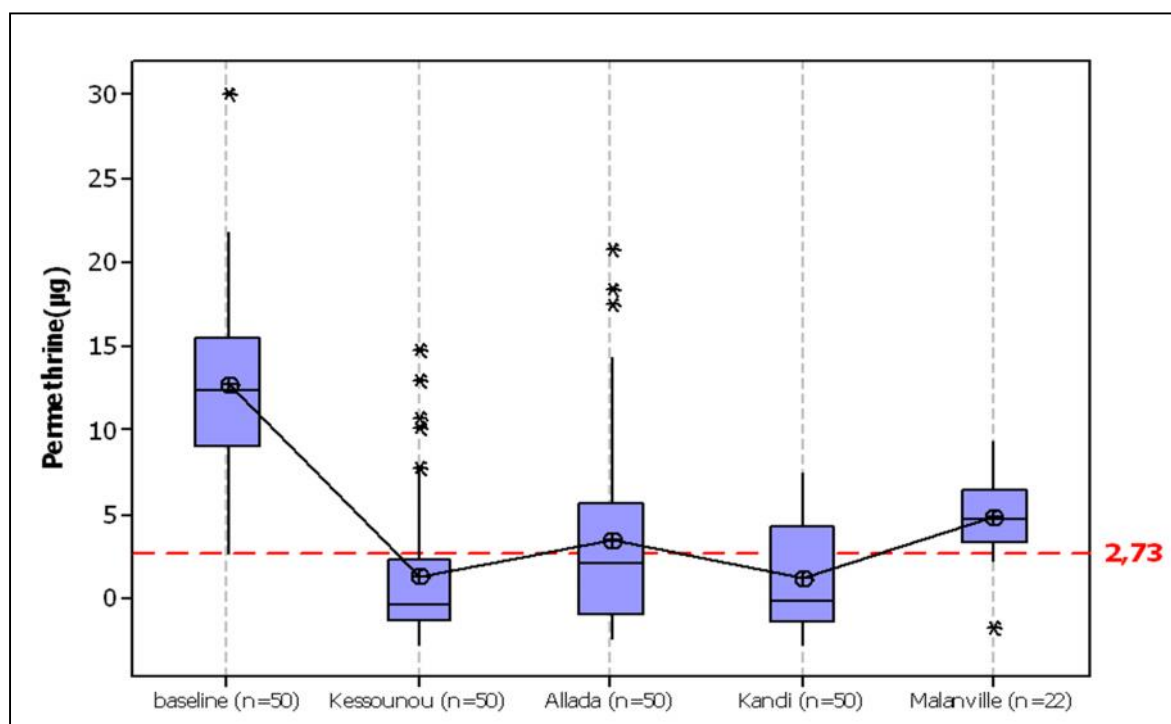


Figure 44: Variabilité des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T6

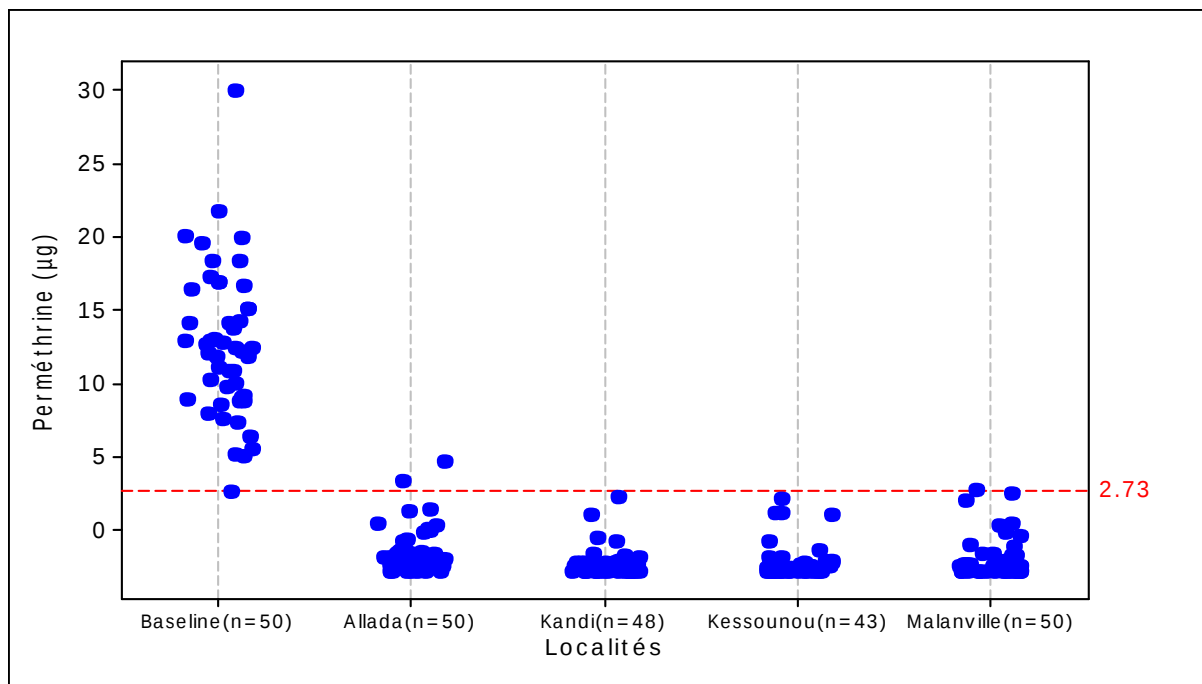


Figure 45: Diagramme de dispersion des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T12

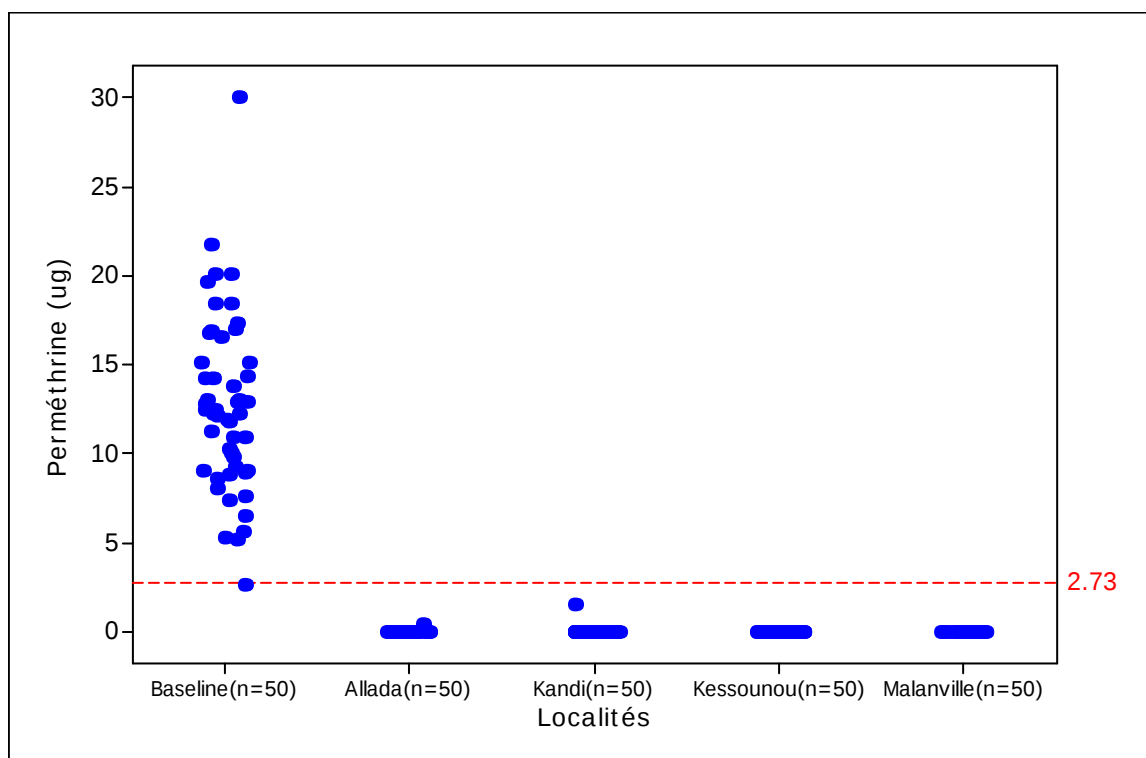


Figure 46: Diagramme de dispersion des quantités d'insecticide (perméthrine) à la surface des MIILD à T18 et T24

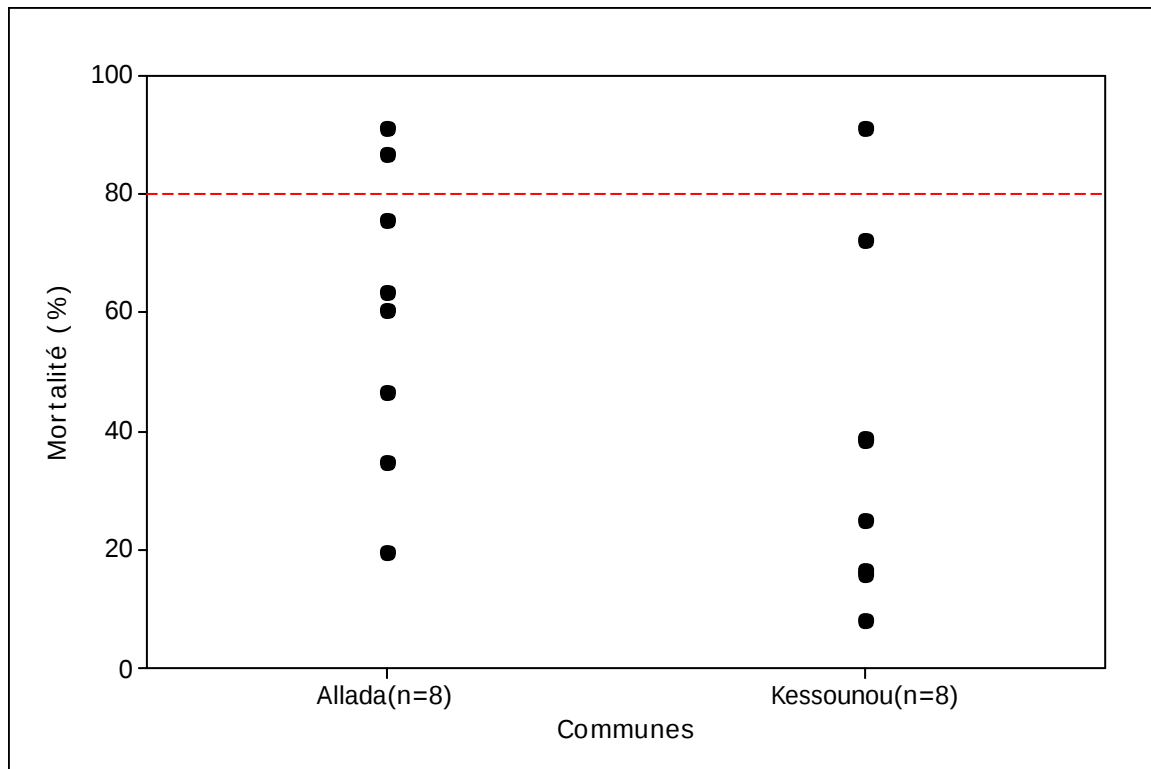


Figure 47: Résultats des tests en cône - taux de mortalité observé après 3 mn d'exposition des femelles de *An. gambiae* Kisumu à des moustiquaires Olyset après 12 mois d'utilisation

2. Discussion

La campagne nationale de distribution des moustiquaires de Juillet 2011 fut la première grande distribution de MIILD jamais effectuée dans l'histoire du Bénin. Elle est destinée à protéger la population béninoise pendant au moins trois ans. Mais sur la base de nos résultats, cette durée de vie protectrice, mesurée par le taux de survie des MIILD dans la communauté, a été plus faible que prévue (environ deux ans). Ce taux de survie ne semble pas être affecté par la proximité ou non d'un cours d'eau. En revanche, la fréquence de lavage est l'élément fondamental de la perte de l'intégrité physique des moustiquaires. Cette intégrité physique est un facteur qui influe sur la capacité des MIILD à réduire le contact homme-vecteur. Ce qui montre toute l'importance des études de suivi de la durabilité des moustiquaires (Atieli *et al.*, 2010; WHO 2011; Malaria Policy Advisory Committee 2013). Des études récentes (Gnanguenon *et al.*, 2013; Haji *et al.*, 2013; Ochomo *et al.*, 2013) ont montré que, malgré une perte d'intégrité relativement faible, des *An. gambiae s.l* réussissent à pénétrer dans les moustiquaires imprégnées chaque nuit en zone de résistance. Une perte d'efficacité et d'intégrité physique des MIILD deux ans après leur utilisation pourrait donc contribuer à un rebond du paludisme au cours de la troisième année.

Une observation majeure de cette étude est le déplacement des moustiquaires de leurs lits initiaux. Ce phénomène a été observé dans 31% des ménages sélectionnés. Plusieurs de ces moustiquaires se retrouvent dans les concessions voisines (par exemple données à d'autres maisons de la communauté). Il est donc possible que ces moustiquaires aient continué de contribuer à la protection de la communauté. Néanmoins, les pourcentages des moustiquaires jetées (22%) et des moustiquaires utilisées à d'autres fins (8%) sont élevés dans certaines communautés comme Kessounou.

L'indice proportionnel de trous (pHI) (WHO 2011) fournit une approche standardisée pour mesurer le degré de détérioration physique de la moustiquaire. L'application des seuils de cet indice (Kilian 2012) nous a permis d'observer que, après 12 mois, 16 à 22% des MIILD doivent être remplacées sur les sites éloignés des cours d'eau (Allada et Kandi) contre 30 à 33% dans les communautés proches des cours d'eau (Malanville et Kessounou). Les estimations de la perte des moustiquaires due aux déchirures sont de 34 à 48%. Si la perte augmente à ce rythme, près de la moitié des moustiquaires retrouvées dans les ménages devrait être remplacées en deux ans. Ainsi, en tenant seulement compte de la perte de l'intégrité physique, les moustiquaires Olyset de 2011 ne devraient pas fournir une protection adéquate après deux saisons de transmission.

Plusieurs facteurs extrinsèques sont responsables de la détérioration rapide des MIILD. Ils sont liés à l'environnement immédiat des moustiquaires (emplacement de la cuisine, proximité à un cours d'eau) et aux actions de l'homme (le combustible utilisé pour la cuisine, le faible entretien des MIILD, le nombre de dormeurs et le lavage fréquent des MIILD). Selon plusieurs auteurs (Sexton 2011; Sangaré *et al.*, 2012), les pratiques sociales d'entretien des MIILD, varient d'une communauté à l'autre, et influencent probablement l'état des moustiquaires dans chaque région. Il est par conséquent important de renforcer la sensibilisation sur les meilleures pratiques de soins et de réparation des MIILD.

Une étude récente au Kenya (Mutuku *et al.*, 2013) a rapporté que le lavage fréquent des MIILD accélérât leur détérioration physique. L'étude a également montré que les moustiquaires de couleur claire sont plus susceptibles d'être plus fréquemment lavées que les moustiquaires de couleur foncée. Or, les moustiquaires distribuées en 2011 et évaluées dans notre étude sont bleu clair. La majorité de ces moustiquaires (54-83%) était sale lors de leur inspection. Ce qui aurait conduit à leur lavage fréquent et favorisé la perte rapide de leur intégrité. Cette observation a été également faite au Bénin (Azondekon *et al.*, 2014).

Dans cette étude, nous avons utilisé une nouvelle méthode (GC) pour évaluer l'efficacité de l'insecticide. Cette méthode est plus rapide que le test en cône de l'OMS. Elle ne nécessite

pas de moustiques, elle n'est pas destructrice pour la moustiquaire et est plus facile à utiliser pour tester une taille d'échantillon statistiquement significatif. Bien que la méthode GC semble potentiellement offrir plusieurs avantages, elle a montré plusieurs insuffisances. En réalité, la technologie Olyset[®] incorpore les molécules de perméthrine dans les fibres des MIILD (N'Guessan *et al.*, 2001). En théorie, ces molécules d'insecticide migrent de façon continue vers la surface (Gimnig *et al.*, 2005 ; Sumitomo 2012). Cependant, ce procédé de régénération de l'insecticide n'est pas forcément rapide et la durée de régénération de l'insecticide peut aller jusqu'à trois semaines après lavage de la moustiquaire (Gimnig *et al.*, 2005) . Pendant ce temps, la concentration de l'insecticide en surface mesurée par la méthode de GC peut être très faible. Cela implique que la méthode GC aurait bien pu sous-estimer la bio-efficacité des MIILD évaluées. Ce qui suggère que la méthode GC doit être améliorée afin d'évaluer la bio-efficacité réelle de ces moustiquaires. A l'heure actuelle, le test en cône semble être la seule mesure fiable de la bio-efficacité des moustiquaires imprégnées de perméthrine. Si la lenteur de l'insecticide à migrer vers la surface lors de la régénération peut être responsable des résultats du GC, alors, ceux de la méthode des tests en cône devraient être aussi affectés.

Les résultats de cette étude montrent que les MIILD sont affectées par des pratiques liées à l'homme et à l'environnement qui réduisent leur durée d'efficacité sur le terrain. En effet, un taux de perforation globale de plus de 50% des Olyset après seulement 6 mois d'utilisation est élevé. On se demande si c'est le tissu qui a servi à la fabrication de la moustiquaire qui est en cause ou si ces perforations précoces sont dues à un manque de soin et d'entretien dans les ménages. Les moustiquaires étant distribuées gratuitement et régulièrement aux populations, elles pourraient être considérées comme un outil vulgaire et perdre leur valeur. L'usure rapide associée à la dégradation accélérée de l'insecticide contenu dans les fibres moustiquaires pose le problème du choix des matériaux imprégnés dans un contexte de forte résistance des vecteurs aux insecticides.

Tout en ressortant l'impact des facteurs externes sur l'efficacité des MIILD, les résultats de l'étude ramènent sur la table la problématique de définition du concept MIILD, sa contextualisation et ses limites sur le terrain.

Conclusion

Cette étude montre que le lot de MIILD Olyset[®], distribué en 2011 au Bénin, a une durée de vie effective de deux ans. Elle montre également que la détérioration physique de ces

moustiquaires ainsi que la chute de leur bio-efficacité ont été plus rapides que prévues. L'état des moustiquaires Olyset® après deux ans d'utilisation soulève des doutes sérieux quant à leur utilité dans la réduction du contact homme-vecteur au cours de la troisième année. Cette situation est due à plusieurs facteurs à prendre en compte pour améliorer les performances des MIILD.

Les stratégies de communication pour un changement de comportement (CCC) sur l'entretien et la réparation des MIILD devraient être renforcées en vue d'augmenter leur durée de vie. Les systèmes de distribution de routine entre les campagnes nationales devraient être renforcés pour remplacer les moustiquaires qui ne répondent plus aux normes minimales d'intégrité physique. D'autres types de moustiquaire imprégnée à longue durée d'action approuvés par le WHOPEs devraient être aussi évalués en guise de comparaison avec les moustiquaires Olyset®.

Chapitre 6 :

Discussion Générale, Conclusion et Perspectives

1-Dynamique des vecteurs et variabilité de la transmission du paludisme

Le paludisme représente une menace réelle au Bénin (WHO 2013a). Une connaissance approfondie des modalités de transmission de la maladie est nécessaire pour définir les stratégies appropriées de lutte. La présente étude montre que cette transmission est forte aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine mais avec un risque plus élevé en zone rurale. Elle est assurée par quatre principaux vecteurs du complexe *Anopheles gambiae* : *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles melas*. La prédominance de ces espèces varie dans le temps avec généralement de fortes densités en saison pluvieuse. *An. coluzzii* et *An. gambiae* se retrouvent partout sur le territoire national alors que *An. arabiensis* et *An. melas* sont inféodés à certaines régions du Bénin. Des taux maximums d'inoculation entomologique sont observés en saison pluvieuse autour du mois de Juillet mais particulièrement en zone rurale. Ces taux varient significativement d'une commune à une autre. Ce qui montre que la réalité de la transmission est modulée constamment en fonction du milieu, des caractéristiques des populations et de leurs modes de vie. Par exemple, des différences significatives des types d'habitation et de l'occupation du sol dans un rayon d'une centaine de mètres peuvent être à l'origine de variations significatives du niveau de transmission du paludisme dans un même village (Pierrat 2012). Ce qui remet en cause la pertinence de la définition d'aires vastes et uniformes d'endémicité et suggère une forte hétérogénéité de l'endémicité à l'échelle village ou commune. Dans la présente étude, Kandi et Malanville sont deux communes relativement proches, mais le taux d'inoculation entomologique observé à Malanville est huit fois plus élevé que celui observé à Kandi. De plus, dans les zones rurales et urbaines de chacune des communes, les taux d'inoculation entomologique sont significativement différents. Selon Patz (1998), le taux d'humidité du sol et la densité de la végétation ont un impact sur le TIE. La distance qui sépare des habitations des gîtes d'anophèles influence également le TIE qui peut être très élevé dans les habitations plus proches des gîtes car les moustiques sont attirés par des appâts plus proches d'eux (Sogoba *et al.*, 2007 ; Service 1997). Ce qui montre l'importance de la micro-échelle dans la planification et la mise en œuvre des mesures de lutte antivectorielle. Ces observations suggèrent une redéfinition des aires de transmission ou d'endémicité du paludisme au Bénin basée sur l'approche village ou commune.

Quatre profils ou aires de transmission se dégagent de cette étude dont une en zone de forêt dégradée et trois en zone de savane. Ces quatre axes sont constitués par des zones à deux saisons de faible transmission (Ouidah, Pobè, Adjohoun et Allada : zone de forêt dégradée), des zones à une saison de transmission (Dassa et Kandi : zone de savane), des zones à

transmission continue de moyenne intensité (Parakou: zone de savane) et des zones à transmission continue de forte intensité (Malanville: zone de savane). La classification de ces zones en groupes de différentes saisonnalités de transmission du paludisme fournit des indications importantes pour les interventions de lutte contre le paludisme telles que la pulvérisation intradomiciliaire (PID) et les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (Adja *et al.*, 2006). Elle indique les périodes de pic de transmission qui sont des repères pour la mise en place de ces interventions.

La stratification qui est une classification des zones en fonction du risque de paludisme est donc une étape importante pour la mise en œuvre des méthodes de lutte antivectorielle. Elle permet d'établir les priorités et de cibler les efforts de prévention dans les zones qui remplissent les meilleures conditions. Cette stratification du risque de transmission du paludisme doit se faire en prenant en compte non seulement les données de transmission entomologique mais également les données d'incidence parasitaire, des données de l'environnement, des données climatiques ainsi que la sensibilité des vecteurs aux insecticides.

2- Sensibilité des vecteurs aux insecticides

Cette étude a mis en évidence la diversité des phénotypes de résistance aux insecticides chez les populations de *Anopheles gambiae s.l* au Bénin. Actuellement, cette espèce est entièrement sensible aux organophosphorés (pirimiphos méthyl et fénitrothion). En revanche, on note une baisse de sensibilité de ce moustique aux carbamates (Bendiocarb) dans la partie septentrionale du Bénin et une résistance confirmée aux pyréthrinoides (deltaméthrine) dans la plupart des localités prospectées. Les investigations moléculaires et biochimiques ont révélé en outre une présence des mécanismes moléculaires et métaboliques de la résistance. La mutation Kdr qui assure la résistance à l'effet knock down des pyréthrinoides et du DDT (Martinez-Torres *et al.*, 1998) a été retrouvée dans toutes les localités alors que la mutation Ace-1R assurant la résistance aux carbamates et aux organophosphorés est rare. Les monooxygénases à cytochrome P450, les glutathion S-transférases et les carboxylestérases, représentant les trois grandes familles d'enzymes de détoxification, ont été identifiés dans les différentes populations de *An. gambiae s.l* testées. Ils confèrent à ces populations vectrices une résistance enzymatique qui se traduit par une diminution de la quantité d'insecticide atteignant la cible de l'insecticide et donc à une augmentation de la tolérance chez les vecteurs (Hemingway *et al.*, 2004). La présence simultanée de ces mécanismes moléculaires et

métaboliques de résistance confère aux populations de vecteurs une meilleure survie à des doses plus élevées d'insecticides (Apperson & Georghiou 1975; Ingham *et al.*, 2014).

A l'heure actuelle, les programmes de lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique s'appuient fortement sur les méthodes chimiques, avec des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD) et la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide à effet rémanent (PID). Cependant, l'augmentation alarmante de la résistance à la plupart des insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle, comme les pyréthroïdes, les carbamates, pose un problème très grave (Ayad & Georghiou 1975 ; Mitchell *et al.*, 2012). Les tests de sensibilité réalisés dans cette étude ont clairement montré que les populations de *An. gambiae s.l* sont très résistantes aux pyréthroïdes et on commence par noter une baisse de sensibilité aux carbamates qui sont les deux catégories d'insecticide actuellement utilisées pour les MIILD et la PID au Bénin. L'élaboration d'une stratégie rigoureuse de gestion de la résistance devient donc une urgence. Le fait que les vecteurs aient montré une sensibilité complète seulement aux organophosphorés met plus de contraintes sur les programmes de lutte antivectorielle qui ne pourront opérer seulement qu'avec cette catégorie d'insecticides. L'acquisition de nouveaux outils supplémentaires pour la lutte antivectorielle ainsi que l'élaboration d'une stratégie de gestion rigoureuse de la résistance deviennent plus que jamais une urgence.

Afin de limiter la propagation de la résistance, plusieurs approches pourraient être mises en œuvre. La rotation chaque année de différentes classes d'insecticides utilisés dans les PID et l'utilisation des PID périodiques à base d'organophosphorés ou de carbamates tous les 2 ou 3 ans intercalées par des campagnes de masse de distribution des MIILD sont des options qui pourraient faire éviter d'exposer les moustiques aux mêmes insecticides sur plusieurs années. La combinaison d'interventions à base de différents insecticides ou d'insecticides à mode d'action différent comme par exemple les MIILD (à base de pyrethrinoides) associées à la PID (à base de carbamates ou organophosphorés) ou le mélange de différentes classes d'insecticides dans le même pulvérisateur pour la PID constituent d'autres options à envisager. L'utilisation limitée des outils de lutte antivectorielle à base d'insecticides constitue également une alternative potentielle.

Le but de ces outils de lutte antivectorielle basés sur des insecticides étant d'éliminer la totalité ou la majorité de la population vectorielle, plus la pression de sélection est forte, plus rapidement la sensibilité peut être perdue (Corbel & N'Guessan 2013). L'immigration des individus possédant des gènes sensibles à partir des zones non traitées peut avantageusement diluer et rivaliser avec les gènes de résistance dans la population globale. Une première étape

dans un programme de lutte contre les vecteurs du paludisme devrait donc être l'estimation de l'état de la sensibilité des populations de vecteurs. C'est l'une des préoccupations de notre thèse. La prochaine étape serait d'estimer l'immigration potentielle des insectes non-résistants provenant des zones sans pression de sélection. Ceci peut être réalisé en utilisant des marqueurs génétiques pour estimer le flux de gènes (des migrants) et la structure génétique entre les populations. Par exemple, un endroit isolé (comme une île) où toute la zone est traitée aurait un risque plus élevé de développer une résistance car quelques génotypes "sensibles" seulement pourraient se joindre à la population résistante. Le risque de développement de la résistance aux insecticides devrait être donc considéré lors de la planification d'une stratégie de gestion de la résistance. La sensibilisation et la coordination avec les programmes de lutte antivectorielle voisins et les activités agricoles devraient être encouragés, de sorte que l' "effet secondaire" régional potentiel sur la population cible soit considéré. Des outils de gestion de la résistance basés sur l'application en mosaïque des insecticides, la rotation des insecticides, le mélange de plusieurs insecticides et la combinaison de différents insecticides pourraient être aussi mis en place.

3. Durabilité des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD)

La durabilité des MIILD varie selon le contexte. Selon nos résultats, deux ans après la campagne de distribution des moustiquaires, 56% des MIILD ont disparu des ménages. Cette perte de la couverture est due à trois causes majeures :

- Des moustiquaires jetées ou détruites parce qu'elles sont complètement usées ou déchirées (perte-1) : ce phénomène est inquiétant si l'on sait l'importance des MIILD dans la réduction du contact homme-vecteur et si l'on considère l'enthousiasme avec lequel les populations réclament les moustiquaires. La perte de type 1 est élevée dans les zones proches des cours d'eau où les populations ont besoin de se protéger contre les piqûres de moustiques à cause de la forte nuisance culicidienne généralement observée dans ces zones.
- Des moustiquaires déplacées ou non disponibles dans les ménages (perte-2): cette observation a été plus élevée dans les zones à faible pression de lavage que dans les zones à forte pression de lavage. Ceci se justifie par une contrainte moins élevée à dormir sous moustiquaire due à la faible agressivité des moustiques dans les communautés éloignées des cours d'eau. Ces moustiquaires sont souvent données à ceux qui n'en disposent pas ou déplacées vers d'autres endroits pour raison de déménagement.

- Des moustiquaires utilisées à d'autres fins (perte-3): Ce phénomène est un exemple d'incohérence entre la fonction théorique (protection de vie humaine) de la moustiquaire et sa fonction pratique (protection de culture ou pêche). La perte-3 a été particulièrement recensée à Kessounou où les moustiquaires sont parfois utilisées pour la pêche et le jardinage. La même observation a été signalée au Kenya et en Tanzanie où les villageois utilisaient leurs moustiquaires pour la pêche plutôt que pour se protéger contre le paludisme (Minakawa *et al.*, 2008; McLean *et al.*, 2014). Ce phénomène qui prend de plus en plus d'ampleur a conduit Niakaté (2015) a titré dans le journal Jeune Afrique l'Intelligent dans sa parution du 03 Février 2015 « La pêche à la moustiquaire est ouverte en Afrique ». D'après cet auteur, dans plusieurs villages lacustre du Burundi, de la République Démocratique du Congo, de la Zambie et de la Tanzanie, 87,2 % des villageois utilisaient leurs moustiquaires pour la pêche. Les moustiquaires vont directement de leurs emballages à la mer, a récemment expliqué au New York Times Isabel Marques da Silva, chercheuse en biologie marine de l'université Lúrio, au Mozambique. Les gens n'utilisent pas les moustiquaires pour lutter contre les moustiques, mais pour pêcher (New York Times 2015). Très légères, avec des mailles plus fines et plus résistantes, les MIILD sont aussi très efficaces lorsqu'il s'agit d'attraper les petits poissons, crevettes et autres crustacés. Elles sont également utilisées pour fabriquer des cages de football, des linceuls, ou des voiles de mariée (Niakaté 2015).

Dans la présente étude, la probabilité pour les MIILD de survivre dans les ménages a varié significativement entre les sites et dépend de la géo-localisation de la communauté. Cependant, il pourrait avoir un biais potentiel en utilisant le taux de survie observé pour estimer la couverture en MIILD d'un village entier, car les MIILD déplacées dans le même village n'affectent pas la couverture en MIILD de ce dernier. Dans certains ménages, le nombre de moustiquaires disponibles était supérieur au nombre nécessaire et l'excédent est donné à d'autres personnes.

L'un des rôles majeurs des MIILD est la réduction du contact homme-vecteur (Lengeler 2004; Smithuis *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2014). Elles doivent alors conserver leur intégrité physique pour constituer une barrière physique entre le dormeur et le vecteur. Six mois après distribution, 50% des MIILD Olyset portaient déjà au moins un trou. Après deux ans, ce taux a dépassé 80%. Des études menées en Ouganda ont montré des proportions similaires (45-78%) (Kilian *et al.*, 2008, Kilian *et al.*, 2011). Dans les localités à forte pression de lavage, le taux de moustiquaires trouées était plus élevé que dans les localités à faible pression de lavage. Ce résultat suggère que la vitesse à laquelle les trous apparaissent (perte d'intégrité du tissu) dans les moustiquaires est plus rapide dans les zones proches des cours d'eau. Etant

donné que les facteurs qui influent la durabilité des MIILD varient entre les régions, il n'est pas surprenant que l'utilisation des messages standard de sensibilisation sur la façon d'entretenir et de laver les moustiquaires dans toutes les régions n'ait pas permis d'avoir les mêmes durées de vie sur tous les sites d'étude. Il convient donc d'adapter ses messages aux particularités locales.

Théoriquement, la perte de l'intégrité physique devrait être comblée par l'activité de l'insecticide utilisé pour imprégner les moustiquaires. Mais, l'évaluation de l'activité insecticide de ces moustiquaires a malheureusement révélé que la plupart d'entre elles ont perdu leur bio-efficacité. Cette perte d'efficacité des MIILD serait due à une forte fréquence de lavage qui a entraîné une élimination très rapide de l'insecticide à la surface de la moustiquaire. Ceci a été démontré par Norris et Norris (2011) qui ont observé que les fréquences de lavage font diminuer la quantité d'insecticide disponible à la surface des moustiquaires. Elle est également liée à une lenteur dans la migration à la surface de l'insecticide incorporé dans les fibres.

Sur la base de ces résultats, on peut admettre que la durée de vie des Olyset distribuées en 2011 ne dépasse pas deux ans. L'entretien des MIILD et les stratégies de réparation doivent être mis en œuvre pour augmenter leur durée de vie opérationnelle. Le renforcement par le PNLP des stratégies de communication sur l'entretien des MIILD serait un atout pour augmenter la durée de vie des moustiquaires.

Conclusion et Perspectives

Cette étude a révélé quatre grands faciès entomologiques de transmission du paludisme dans les zones de savanes et de forêts dégradées au Bénin. Ces faciès sont représentés par des zones à une saison de transmission, des zones à deux saisons de transmission, des zones à transmission continue d'intensité moyenne et des zones à transmission continue de forte intensité. Elle a également montré une variation spatio-temporelle de la distribution des vecteurs du paludisme et de l'exposition humaine aux piqûres infectieuses des vecteurs surtout dans les zones rurales. Ces données représentent une source d'informations qui pourrait être utilisée comme un guide à la mise en œuvre des stratégies de contrôle des vecteurs au Bénin. Ces informations pourraient aussi aider à l'extension de la pulvérisation intradomiciliaire (PID) en tenant compte des faciès décrits et de la durée de l'effet de l'insecticide après pulvérisation. La mise en place d'une étude plus approfondie, prenant en compte la variabilité de la transmission à l'échelle village, les paramètres environnementaux

et les données parasitaires, permettra de mieux définir les stratégies de réduction de l'intensité de la transmission du paludisme.

Cette thèse a aussi révélé une large distribution de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes dans tout le Bénin, une émergence de la résistance aux carbamates dans la partie septentrionale du pays et une sensibilité des vecteurs aux organophosphorés. Elle a montré la présence simultanée de plusieurs mécanismes de résistance chez les populations de *An. gambiae s. l.* du Bénin. La co-implication des mécanismes de résistance Kdr, Ace-1R et métabolique chez *An. gambiae s.l* est une menace sérieuse pour l'efficacité des opérations de lutte antivectorielle basées sur les MIILD et la PID. L'utilisation combinée des insecticides avec des agents synergiques pourrait atténuer la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme. Cependant, les recherches sur d'autres outils de lutte antivectorielle sont nécessaires pour compléter les stratégies actuelles.

Une observation embarrassante est la courte durée de vie effective des moustiquaires Olyset distribuées en 2011 : deux ans au lieu de trois. Dans les communautés, la détérioration physique de ces moustiquaires ainsi que la chute de leur bio-efficacité ont été plus rapides que prévues et soulèvent des doutes sur leur utilité au cours de la troisième année. Cette situation est due à plusieurs facteurs décrits dans cette thèse et dont la prise en compte pourrait améliorer les performances des MIILD. Les stratégies de communication pour un changement de comportement (CCC) sur l'entretien et la réparation des MIILD devraient être mises en place pour augmenter leur durabilité. Les systèmes de distribution de routine devraient être renforcés pour remplacer les moustiquaires complètement usées.

Références Bibliographiques

1. Adja, A.M., K.R. Assare, S.B. Assi, L. N'Dri, A. Yapi, and K.E. Ngoran. 2015. Etude du comportement au repos et des preferences trophiques de *Anopheles gambiae* dans la ville d'adzope, cote d'ivoire. *European Scientific Journal* 11: 5.
2. Adja, A.M., K.E. N'goran, P. Kengne, G.B. Koudou, M. Toure, A.A. Koffi, E. Tia, *et al.* 2006. Transmission vectorielle du paludisme en savane arborée à gansé en Cote D'ivoire. *Médecine tropicale* 66: 449–455.
3. Agossa, F.R., R. Aikpon, R. Azondekon, R. Govoetchan, G.G. Padonou, O. Oussou, F. Oke-Agbo, M.C. Akogbeto. 2014. Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108: 84–91.
4. Ahoyo Adjovi, N., E. GUIDIBI. 2006a. Monographie de la commune kandi. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
5. Ahoyo Adjovi, N., E. GUIDIBI. 2006b. Monographie de la commune de malanville. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
6. Aikpon, R., F. Agossa, R. Ossè, O. Oussou, N. Aïzoun, F. Oké-Agbo, M. Akogbéto. 2013a. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasites & Vectors* 6: 192.
7. Aikpon, R., F. Agossa, R. Ossè, O. Oussou, N. Aïzoun, F. Oké-Agbo, M. Akogbéto. 2013b. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasites & Vectors* 6: 192.
8. Aïzoun, N., R. Ossè, R. Azondekon, R. Alia, O. Oussou, V. Gnanguenon, R. Aikpon, *et al.* 2013. Comparison of the standard WHO susceptibility tests and the CDC bottle bioassay for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors and their correlation with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 6: 1–10.
9. Akogbeto Codjo, M., M. Coluzzi. 1992. Etude des aspects epidemiologiques du paludisme cotier lagunaire au benin. Thèse de doctorat. Paris 11, Paris.
10. Akogbeto, M., J.-P. Chippaux, M. Coluzzi. 1992. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (République du Bénin) : étude entomologique. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 40: 233–239.
11. Akogbeto, M., M. Di Deco. 1995. Répartition des membres du complexe *Anopheles gambiae* et de leurs variants chromosomiques au Bénin et au Togo, Afrique Occidentale. *J Afr Zool* 109: 443–454.
12. Akogbeto, M., G.G. Padonou, H.S. Bankole, D.K. Gazard, G.L. Gbedjissi. 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. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 85: 586–593.
13. Akogbeto, M., S. Yakoubou. 1999. Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. Bull Soc Pathol Exot 92: 123 – 130.
 14. Akomagni, L., E. Guidibi. 2006. Monographie de la commune de dangbo. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
 15. Anon. 2012. Histoire du paludisme - Sir Ronald Ross. Thoracotomie. Disponible à: <http://thoracotomie.com/2012/08/04/histoire-du-paludisme-sir-ronald-ross/> [Accédé le 9 Février 2015].
 16. Anthony, N.M., E.A. Benner, J.J. Rauh, D.B. Sattelle. 1991. GABA receptors of insects susceptible and resistant to cyclodiene insecticides. Pesticide Science 33: 223–230.
 17. Apperson, C.S., G.P. Georgiou. 1975. Inheritance of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis* Coquillett. Bulletin of the World Health Organization 52: 97–100.
 18. Atieli, F.K., S.O. Munga, A.V. Ofulla, J.M. Vulule. 2010. The effect of repeated washing of long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) on the feeding success and survival rates of *Anopheles gambiae*. Malaria Journal 9: 304.
 19. Awolola, T.S., O.A. Oduola, C. Strode, L.L. Koekemoer, B. Brooke, H. Ranson. 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 103: 1139–1145.
 20. Ayad, H., P. Georgiou. 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* Based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Journal of Economic Entomology 68: 295–297.
 21. Azondekon, R., V. Gnanguenon, F. Oke-Agbo, S. Houevoessa, M. Green, M. Akogbeto. 2014. A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin. Parasites & Vectors 7: 6.
 22. Baudoin, A., A.C. Sanchez, B. Fandohan. 2013. Small scale farmers' vulnerability to climatic changes in southern Benin: the importance of farmers' perceptions of existing institutions. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 1–13.
 23. Berticat, C., J. Bonnet, S. Duchon, P. Agnew, M. Weill, V. Corbel. 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. BMC Evolutionary Biology 8: 104.
 24. Bisset, J.A., C. Díaz, M. Rodríguez, M.C. Marquetti. 1990. Mode of inheritance of malathion resistance in *Culex (C.) quinquefasciatus* Say, 1923 (Diptera: Culicidae). Revista Cubana De Medicina Tropical 42: 84–89.

25. Bloomquist, J.R., D.M. Soderlund. 1988. Pyrethroid insecticides and DDT modify alkaloid-dependent sodium channel activation and its enhancement by sea anemone toxin. *Molecular pharmacology* 33: 543–550.
26. Bonneville, J., C. Defrance, T. Miklaveč. 2006. Guide pratique de lutte contre le paludisme en entreprise. Disponible sur:
<http://www.total.com/sites/default/files/atoms/file/total-lutte-contre-le-paludisme> [Consulté le 5 Mars 2013].
27. Bonning, B.C., and J. Hemingway. 1991. Identification of reduced fitness associated with an insecticide resistance gene in *Culex pipiens* by microtitre plate tests. *Medical and Veterinary Entomology* 5: 377–379.
28. Boyer, S. 2011. Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides: Conséquences Environnementales. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier. Paris.
29. Braly, J.-P. 2012. Bientôt un vaccin contre le paludisme. *Sciences Santé* 100–104.
30. Brooke, B.D., R.H. Hunt, L.L. Koekemoer, J. Doussou-Yovo, M. Coetzee. 1999. Evaluation of PCR assay for detection of pyrethroid insecticide resistance in the malaria vector species of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 15: 565 – 568.
31. Brooke, B.D., R.H. Hunt, T.S. Matambo, L.L. Koekemoer, P. Van Wyk, M. Coetzee. 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 294–299.
32. Bruce-Chwatt, L.J. 1987. Malaria and its Control: Present Situation and Future Prospects. *Annual Review of Public Health* 8: 75–110.
33. Capo-Chichi, Y., E. Guidibi. 2006a. Monographie de la commune de Dassa. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
34. Capo-Chichi, Y., E. Guidibi. 2006b. Monographie de la commune de Ouidah. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
35. Carnevale, P., V. Robert. 2009. Les anophèles biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD, Marseille.
36. Carnevale, P., V. Robert, C. Boudin, J.N. Halna, L. Pazart, P. Gazin, A. Richard, J. Mouchet. 1988. Parasitologie. La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyrèthrinoïdes au Burkina Faso. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 81: 832–846.
37. Coetzee, M., R.H. Hunt, R. Wilkerson, A. Della Torre, M.B. Coulibaly, N.J. Besansky. 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619: 246–274.
38. Coluzzi, M. 1993. Advances in the study of Afrotropical malaria vectors. *Parassitologia* 35 Suppl: 23–29.

39. Coluzzi, M., A. Sabatini, V. Petrarca, M.A. Di Deco. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73: 483–497.
40. Coluzzi, M., A. Sabatini, A. della Torre, M.A. Di Deco, and V. Petrarca. 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* (New York, N.Y.) 298: 1415–1418.
41. French-Constant, R.H., B. Pittendrigh, A. Vaughan, N. Anthony. 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1685–1693.
42. Corbel, V., and R. N’Guessan. 2013. Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. In S. Manguin [ed.], *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*, InTech. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/distribution-mechanisms-impact-and-management-of-insecticide-resistance-in-malaria-vectors-a-pragmat> [Consulté le 13 Janvier 2015].
43. Corbel, V., R. N’Guessan, C. Brengues, F. Chandre, L. Djogbenou, T. Martin, M. Akogbéto, *et al.* 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta tropica* 101: 207–216.
44. CREC. 2012. Photo Plaque ELISA.
45. Dabiré, K.R., A. Diabaté, M. Namountougou, K.H. Toé, A. Ouari, P. Kengne, C. Bass, and T. Baldet. 2009. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 1113–1120.
46. Van Dam, A.R., W.E. Walton. 2007. Comparison of mosquito control provided by the arroyo chub (*Gila orcutti*) and the mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Journal of the American Mosquito Control Association* 23: 430–441.
47. Damien, G.B., A. Djènontin, C. Rogier, V. Corbel, S.B. Bangana, F. Chandre, M. Akogbéto, *et al.* 2010. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malaria Journal* 9: 380.
48. Danis, M., P. Ambroise-Thomas, J. Mouchet. 1991. *Paludisme*. Ellipses-Marketing, Paris.
49. Darriet, F. 1991. Field trial of the efficacy of 3 pyrethroids in the control of malaria vectors. *Parassitologia* 33: 111–119.
50. Darriet, F. 2007. *Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides*. Paris.
51. Darriet, F., P. Guillet, R. N’Guessan, J.M. Doannio, A. Koffi, L.Y. Konan, and P. Carnevale. 1998. Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. *Médecine Tropicale: Revue Du Corps De Santé Colonial* 58: 349–354.

52. Das, M.K., R.N. Prasad. 1991. Evaluation of mosquito fish *Gambusia affinis* in the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian Journal of Malariology* 28: 171–177.
53. Diabate, A., T. Baldet, F. Chandre, M. Akoobeto, T.R. Guiguemde, F. Darriet, C. Brengues, *et al.* 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 617–622.
54. Diagne, N., D. Fontenille, L. Konate, O. Faye, M. Traore Lamizana, F. Legros, J.-F. Molez, J.-F. Trape. 1994. Les anophèles du Sénégal : liste commentée et illustrée. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 87: 267–277.
55. Dixit, R.S., N.L. Sachdeva, and B.D. Varma. 1981. Larvivorous efficiency of *Gambusia affinis* Baird and Girard. *The Indian Journal of Medical Research* 73 Suppl: 155–159.
56. Djègbè, I., O. Boussari, A. Sidick, T. Martin, H. Ranson, F. Chandre, M. Akogbéto, V. Corbel. 2011. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal* 10: 261.
57. Djènontin, A., S. Bio-Bangana, N. Moiroux, M.-C. Henry, O. Bousari, J. Chabi, R. Ossè, *et al.* 2010. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasites & Vectors* 3: 83.
58. Djogbénou, L., R. Dabiré, A. Diabaté, P. Kengne, M. Akogbéto, J.M. Hougard, F. Chandre. 2008. Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 78: 298.
59. Djogbénou, L., N. Pasteur, S. Bio-Bangana, T. Baldet, S.R. Irish, M. Akogbeto, M. Weill, F. Chandre. 2010. Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Tropica* 114: 116–122.
60. Djouaka, R.F., A.A. Bakare, H.S. Bankole, J.M. Doannio, O.N. Coulibaly, H. Kossou, M. Tamo, *et al.* 2007. Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance? *Malaria Journal* 6: 159.
61. Djouaka, R.F., A.A. Bakare, O.N. Coulibaly, M.C. Akogbeto, H. Ranson, J. Hemingway, C. Strode. 2008. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9: 538.
62. Dukeen, M.Y.H., S.M. Omer. 1986. Ecology of the malaria vector *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) by the Nile in northern Sudan. *Bulletin of Entomological Research* 76: 451–467.
63. FAO. 2002. The State of Food Insecurity in the World. Food and Agriculture Organization, Roma.

64. Favia, G., A. Lanfrancotti, L. Spanos, I. Sidén-Kiamos, C. Louis. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 10: 19–23.
65. Felix, R., H. Silveira. 2012. The Role of *Anopheles gambiae* P450 Cytochrome in Insecticide Resistance and Infection. In F. Perveen [ed.], *Insecticides - Pest Engineering*, InTech. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-pest-engineering/the-role-of-anopheles-gambiae-p450-cytochrome-in-insecticide-resistance-and-infection> [Consulté le 22 Avril 2015].
66. Ffrench-Constant, R.H., P.J. Daborn, G. Le Goff. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in genetics: TIG* 20: 163–170.
67. Ffrench-Constant, R.H., T.A. Rocheleau, J.C. Steichen, A.E. Chalmers. 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363: 449–451.
68. Fontenille, D., A. Cohuet, P. Awono-Ambene, C. Antonio-Nkondjio, C. Wondji, P. Kengne, I. Dia, *et al.* 2003. Systématique et biologie des *Anopheles* vecteurs de *Plasmodium* en Afrique. *Médecine Tropicale* 63: 247–253.
69. Fontenille, D., A. Cohuet, P. Awono-Ambene, P. Kengne, C. Antonio-Nkondjio, C. Wondji, F. Simard. 2005. Vecteurs de paludisme : du terrain à la génétique moléculaire Recherches en Afrique. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 53: 283–290.
70. Fox, J., S. Weisberg. 2011. *An R Companion to Applied Regression*. SAGE.
71. Futura-Sciences. 2013. Chromatographie en phase gazeuse. Futura-Sciences. Disponible sur: <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/biologie-chromatographie-phase-gazeuse-11186/> [Consulté le 24 Avril 2015].
72. Gamble, C., P.J. Ekwaru, P. Garner, F.O. ter Kuile. 2007. Insecticide-Treated Nets for the Prevention of Malaria in Pregnancy: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *PLoS Med* 4: e107.
73. Gassi, B., E. Guidibi. 2006. Monographie de la commune de pobe. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
74. Gatton, M.L., N. Chitnis, T. Churcher, M.J. Donnelly, A.C. Ghani, H.C.J. Godfray, F. Gould, *et al.* 2013. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in africa. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 67: 1218–1230.
75. Gentilini, M., E. Caumes, M. Danis, J.-E. Touze. 2012. *Médecine tropicale*. 6e édition. Médecine Sciences Publications, Paris.
76. Ghosh, S.K., S.N. Tiwari, T.S. Sathyanarayan, T.R.R. Sampath, V.P. Sharma, N. Nanda, H. Joshi, *et al.* 2005. Larvivorous fish in wells target the malaria vector sibling species of the *Anopheles culicifacies* complex in villages in Karnataka, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99: 101–105.

77. Gillies, M., M. Coetzee. 1987. A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara. Publ South Afri Inst Med Res 55: 143.
78. Gillies, M.T., B. de Meillon. 1968. The anophelinae of Africa South of the Sahara. South African Institute for Medical Research.
79. Gimnig, J.E., K.A. Lindblade, D.L. Mount, F.K. Atieli, S. Crawford, A. Wolkon, W.A. Hawley, E.M. Dotson. 2005. Laboratory wash resistance of long-lasting insecticidal nets. Tropical Medicine and International Health 10: 1022–1029.
80. Gnanguenon, V., R. Azondekon, F. Oke-Agbo, A. Sovi, R. Ossè, G. Padonou, R. Aïkpon, M.C. Akogbeto. 2013. Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets. BMC Public Health 13: 751.
81. Govoetchan, R., V. Gnanguenon, E. Ogouwalé, F. Oké-Agbo, R. Azondékon, A. Sovi, R. Attolou, *et al.* 2014. Dry season refugia for anopheline larvae and mapping of the seasonal distribution in mosquito larval habitats in Kandi, northeastern Benin. Parasites & Vectors 7: 137.
82. Green, C.A., R.F. Gass, L.E. Munstermann, V. Baimai. 1990. Population-genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. Medical and Veterinary Entomology 4: 25–34.
83. Green, M.D., F. Atieli, M. Akogbeto. 2009. Rapid colorimetric field test to determine levels of deltamethrin on PermaNet® surfaces: association with mosquito bioactivity. Tropical Medicine & International Health 14: 381–388.
84. Haji, K.A., B.O. Khatib, S. Smith, A.S. Ali, G.J. Devine, M. Coetzee, S. Majambere. 2013. Challenges for malaria elimination in Zanzibar: pyrethroid resistance in malaria vectors and poor performance of long-lasting insecticide nets. Parasites & Vectors 6: 82.
85. Hall, T.F. 1972. The influence of plants on anopheline breeding. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 21: 787–794.
86. Hamon, J. 1963. L'importance des changements de comportement chez les insectes. Bulletin of the World Health Organization 29 Suppl: 115–120.
87. Hamon, J., J. Mouchet. 1961. Secondary vectors of human malaria in Africa. Médecine Tropicale: Revue Du Corps De Santé Colonial 21(Special): 643–660.
88. Hayes, J.D., C.R. Wolf. 1990. Molecular mechanisms of drug resistance. The Biochemical Journal 272: 281–295.
89. Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll, and H. Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 34: 653 – 665.
90. Hemingway, J., N. Hawkes, L. Prapanthadara, K.G.I. Jayawardenal, H. Ranson. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 353: 1695–1699.

91. Hemingway, J., H. Ranson. 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371–391.
92. Hosie, A.M., K. Aronstein, D.B. Sattelle, R.H. ffrench-Constant. 1997. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neurosciences* 20: 578–583.
93. Ingham, V.A., C.M. Jones, P. Pignatelli, V. Balabanidou, J. Vontas, S.C. Wagstaff, J.D. Moore, H. Ranson. 2014. Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in *Anopheles gambiae*: known and novel candidate genes. *BMC Genomics* 15. Disponible sur:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4256904/> [Consulté le 16 Février 2015].
94. INSAE. 2013. Résultats provisoires du rgph4. INSAE, Cotonou. Disponible sur:
http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.insae-bj.org%2Frecensement-population.html%3Ffile%3Dfiles%2Fenquetes-recensements%2Frgph%2FResultats_provisoires_RGPH4_2103.pdf&ei=uj4RVcL9K5DZaoOvgpgD&usg=AFQjCNENmPqEDE1rbPW793FwH9acn1e9YA&sig2=-XjaOHXvNEYVza_o9DfbPg&bvm=bv.89184060,d.d2s [Consulté le 21 Janvier 2015].
95. IRAC. 2011. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance. 2nd ed. IRAC.
96. Jamroz, R.C., F.D. Guerrero, D.M. Kammlah, S.E. Kunz. 1998. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 1031–1037.
97. Jewell, N.P. 2003. Statistics for Epidemiology. CRC Press, Danvers.
98. Kilian, A. 2012. Textile Testing Methods for Nets. Disponible sur:
http://www.rbm.who.int/partnership/wg/wg_itn/ppt/ws4/wsMeeting2_AKilian.pdf [Consulté le 10 Septembre 2012].
99. Kilian, A., W. Byamukama, O. Pigeon, F. Atieli, S. Duchon, C. Phan. 2008. Long-term field performance of a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in rural Uganda. *Malaria Journal* 7: 49.
100. Kilian, A., W. Byamukama, O. Pigeon, J. Gimnig, F. Atieli, L. Koekemoer, N. Protopopoff. 2011. Evidence for a useful life of more than three years for a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in Western Uganda. *Malaria Journal* 10: 299.
101. Knox, T.B., E.O. Juma, E.O. Ochomo, H.P. Jamet, L. Ndungo, P. Chege, N.M. Bayoh, *et al.* 2014. An online tool for mapping insecticide resistance in major *Anopheles* vectors of human malaria parasites and review of resistance status for the Afrotropical region. *Parasites & Vectors* 7: 76.
102. Koldenkova, L., I. García Avila, J. Garcés Fonseca, R. González Broche. 1988. The predatory capacity of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* (Peters, 1985)

- (Cyprinodontiformes: Poecillidae) in a natural breeding-ground for the mosquito *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. *Revista Cubana De Medicina Tropical* 40: 21–26.
103. Kora, O., E. Guidibi. 2006. Monographie de la commune de parakou. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
 104. Koudou, B.G., A.M. Adja, B. Matthys, M. Doumbia, G. Cisse, M. Kone, M. Tanner, J. Utzinger. 2007. Pratiques agricoles et transmission du paludisme dans deux zones éco-épidémiologiques au centre de la Côte d'Ivoire. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 100: 124–126.
 105. Lambert, D. 1992. Zero-Inflated Poisson Regression, with an Application to Defects in Manufacturing. *Technometrics* 34: 1–14.
 106. Larivière, M., H. Beauvais, F. Derouin, P. Traore. 1987. *Parasitologie médicale*. Ellipses-Marketing, Paris.
 107. Laxminarayan, R., J. Chow, S.A. Shahid-Salles. 2006. Intervention Cost-Effectiveness: Overview of Main Messages. In D. T. Jamison, J. G. Breman, A. R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D. B. Evans, P. Jha, *et al.* [eds.], *Disease Control Priorities in Developing Countries*, World Bank, Washington (DC). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11784/> [Consulté le 13 Janvier 2015].
 108. Lengeler, C. 2004. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane database of systematic reviews*. *Cochrane Database Syst Rev Online* 2:CD000363.
 109. Lindsay, S.W., M.E. Gibson. 1988. Bednets revisited— old idea, new angle. *Parasitology Today* 4: 270–272.
 110. Lindsay, S.W., L. Parson, C.J. Thomas. 1998. Mapping the range and relative abundance of the two principal African malaria vectors, *Anopheles gambiae* sensu stricto and *An. arabiensis*, using climate data. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 265: 847–854.
 111. Lingenfelser, A., K. Rydzanicz, A. Kaiser, N. Becker. 2010. Mosquito fauna and perspectives for integrated control of urban Vector-mosquito populations in southern benin (west africa). *Annals of agricultural and environmental medicine* 17: 49–57.
 112. Liu, Z., S.M. Valles, K. Dong. 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 991–997.
 113. Macdonald, G. 1955. The Measurement of Malaria Transmission. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 48: 295–302.
 114. Malaria Policy Advisory Committee. 2013. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and recommendations of September 2013 meeting. *Malaria Journal* 12: 456.

115. Martens, W.J., L.W. Niessen, J. Rotmans, T.H. Jetten, A.J. McMichael. 1995. Potential impact of global climate change on malaria risk. *Environmental Health Perspectives* 103: 458–464.
116. Martinez-Torres, D., F. Chandre, M.S. Williamson, F. Darriet, J.B. Berge, A.L. Devonshire, P. Guillet, *et al.* 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7: 179 – 184.
117. Martinez-Torres, D., C. Chevillon, A. Brun-Barale, J.B. Berge, D. Pasteur, N Pauron. 1999. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pesticide Science* 55: 1012 – 1020.
118. Masum, H., R. Shah, K. Schroeder, A. Daar, P. Singer. 2010. Africa’s largest long-lasting insecticide-treated net producer: lessons from A to Z Textiles. *BMC International Health and Human Rights* 10: S6.
119. McCullagh, P., J.A. Nelder. 1989. *Generalized Linear Models*. Chapman and Hall.
120. McLean, K.A., A. Byanaku, A. Kubikonse, V. Tshowe, S. Katensi, A.G. Lehman. 2014. Fishing with bed nets on Lake Tanganyika: a randomized survey. *Malaria Journal* 13: 395.
121. Mejia, P., H. Teklehaimanot, Y. Tesfaye, A. Teklehaimanot. 2013. Physical condition of Olyset(R) nets after five years of utilization in rural western Kenya. *Malaria Journal* 12: 158.
122. Minakawa, N., G.O. Dida, G.O. Sonye, K. Futami, S. Kaneko. 2008. Unforeseen misuses of bed nets in fishing villages along Lake Victoria. *Malar J* 7: 165.
123. Mitchell, S.N., B.J. Stevenson, P. Müller, C.S. Wilding, A. Egyir-Yawson, S.G. Field, J. Hemingway, *et al.* 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6147–6152.
124. Mouchet, J., P. Carnevale, M. Coosemans, D. Fontenille, C. Ravaonjanahary, A. Richard, V. Robert. 1993. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers d’études et de recherches francophones / Santé* 3: 220–238.
125. Mouchet, J., P. Carnevale, M. Coosemans, J. Julvez, S. Manguin, D. Richard-Lenoble, J. Sircoulon. 2004. *Biodiversité du paludisme dans le monde*. John Libbey Eurotext, Paris.
126. MR4. 2014. *Methods in Anopheles Research*.
127. Mutuku, F.M., M. Khambira, D. Bisanzio, P. Mungai, I. Mwanzo, E.M. Muchiri, C.H. King, U. Kitron. 2013. Physical condition and maintenance of mosquito bed nets in Kwale County, coastal Kenya. *Malaria Journal* 12: 46.
128. Muturi, E.J., J.M. Mwangangi, J.C. Beier, M. Blackshear, J. Wauna, R. Sang, W.R. Mukabana. 2013. Ecology and behavior of *Anopheles arabiensis* in relation to

- agricultural practices in central Kenya. *Journal of the American Mosquito Control Association* 29: 222–230.
129. Nangbe, F., E. Guidibi. 2006. Monographie de la commune d'allada. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
 130. Ndiath, M.O., S. Sougoufara, A. Gaye, C. Mazenot, L. Konate, O. Faye, C. Sokhna, J-F. Trape. 2012. Resistance to DDT and Pyrethroids and Increased kdr Mutation Frequency in *An. gambiae* after the Implementation of Permethrin-Treated Nets in Senegal. *PLoS ONE* 7: e31943.
 131. New York Times. 2015. New York Times Examines Use Of Mosquito Nets For Fishing In Africa, Possible Unintended Consequences. Disponible sur: <http://kff.org/news-summary/some-africans-using-insecticide-treated-nets-for-fishing-possibly-harming-ecosystems/> [Consulté le 3 Juillet 2015].
 132. N'Guessan, R., F. Darriet, J.M.C. Doannio, F. Chandre, P. Carnevale. 2001. Olyset NetR efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Cote d'Ivoire. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 97–104.
 133. Niakaté, H. 2015. La pêche à la moustiquaire est ouverte en Afrique ! Disponible sur: <http://www.jeuneafrique.com/Article/JA2821p017.xml0/> [Consulté le 24 Avril 2015].
 134. Norris, L.C., D.E. Norris. 2011. Efficacy of long-lasting insecticidal nets in use in Macha, Zambia, against the local *Anopheles arabiensis* population. *Malaria Journal* 10: 254.
 135. Ochomo, E.O., N.M. Bayoh, E.D. Walker, B.O. Abongo, M.O. Ombok, C. Ouma, A.K. Githeko, *et al.* 2013. The efficacy of long-lasting nets with declining physical integrity may be compromised in areas with high levels of pyrethroid resistance. *Malaria Journal* 12: 368.
 136. Oddoux, O., A. Debourgogne, A. Kantele, C.H. Kocken, T.S. Jokiranta, S. Vedy, J.M. Puyhardy, M. Machouart. 2011. Identification of the five human *Plasmodium* species including *P. knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30: 597–601.
 137. Omukunda, E., A. Githeko, M.F. Ndong'a, E. Mushinzimana, H. Atieli, P. Wamae. 2013. Malaria vector population dynamics in highland and lowland regions of western Kenya. *Journal of Vector Borne Diseases* 50: 85–92.
 138. Onyabe, D.Y., J.E. Conn. 2001. The distribution of two major malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*, in Nigeria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 1081–1084.
 139. Oshaghi, M.A., A.R. Chavshin, H. Vatandoost, F. Yaaghoobi, F. Mohtarami, N. Noorjah. 2006. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Experimental Parasitology* 112: 232–236.

140. Ossè, R.A., R. Aïkpon, G.L. Gbédjissi, V. Gnanguenon, M. Sèzonlin, R. Govoétchan, A. Sovi, *et al.* 2013. A shift from Indoor Residual Spraying (IRS) with bendiocarb to Long-Lasting Insecticidal (mosquito) Nets (LLINs) associated with changes in malaria transmission indicators in pyrethroid resistance areas in Benin. *Parasites & Vectors* 6: 73.
141. Ossè, R., R. Aikpon, G.G. Padonou, O. Oussou, A. Yadouléon, M. Akogbéto. 2012. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasites & Vectors* 5: 163.
142. Patz, J.A. 1998. Predicting key malaria transmission factors, biting and entomological inoculation rates, using modelled soil moisture in Kenya. *Tropical Medicine & International Health* 3: 818–827.
143. Pierrat, C. 2012. Risque palustre : appréhender la vulnérabilité des individus à l'échelle locale (Sud du Bénin). *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement*. Disponible sur: <http://vertigo.revues.org/11549> [Consulté le 21 Avril 2015].
144. Pluess, B., F.C. Tanser, C. Lengeler, B.L. Sharp. 1996. Indoor residual spraying for preventing malaria. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006657.pub2/> [Consulté le 11 Mars 2014].
145. PNLP. 2011. Evaluation post campagne de la distribution gratuite de miild en 2011 au benin. Cotonou. Ministère de la Santé.
146. PNLP. 2006. Plan stratégique de lutte contre le paludisme au Bénin 2006-2010. Disponible sur: <http://www.rollbackmalaria.org/countryaction/nsp/benin.pdf> [Consulté le 7 Avril 2014].
147. Prasad, H., R.N. Prasad, S. Haq. 1993. Control of mosquito breeding through *Gambusia affinis* in rice fields. *Indian Journal of Malariology* 30: 57–65.
148. Ramphul, U., T. Boase, C. Bass, L.M. Okedi, M.J. Donnelly, P. Müller. 2009. Insecticide resistance and its association with target-site mutations in natural populations of *Anopheles gambiae* from eastern Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 1121–1126.
149. Ranson, H., H. Abdallah, A. Badolo, W.M. Guelbeogo, C. Kerah-Hinzoumbé, E. Yangalbé-Kalnoné, N. Sagnon, *et al.* 2009. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malaria Journal* 8: 299.
150. Ranson, H., R. N'Guessan, J. Lines, N. Moiroux, Z. Nkuni, V. Corbel. 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology* 27: 91–98.

151. Raymond, M., D. Fournier, J. Berge, A. Cuany, J.M. Bride, N. Pasteur. 1985. Single-mosquito test to determine genotypes with an acetylcholinesterase insensitive to inhibition to propoxur insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1: 425–427.
152. Raymond, M., D. Fournier, J.M. Bride, A. Cuany, J. Berge, M. Magnin, N. Pasteur. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* 79: 1452–1458.
153. Robert, V. 1989. La transmission du paludisme humain: la zone des savanes d’Afrique de l’Ouest. Université Paris 6. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/doc34-01/26165.pdf [Consulté le 9 Avril 2014].
154. Rodhain, F., and C. Pérez-Eid. 1985. Précis d’entomologie médicale et vétérinaire. Maloine, Paris.
155. Roll Back Malaria. 2005. World Malaria report. World Health Organization, Geneva. Disponible sur: www.rollbackmalaria.org/forumV/.../gsp_en.pdf [Consulté le 8 Mars 2014].
156. Rothman, K.J. 2012. Epidemiology: An Introduction. Oxford University Press.
157. Rouy, P. 2010. Mise en place des Moustiquaires Imprégnées d’Insecticide Longue Durée (MIILD) à Mayotte : Premiers éléments relatifs à la pertinence et à la faisabilité locale. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique. Disponible sur: <http://ressources.ensp.fr/memoires/2010/igs/rouy.pdf> [Consulté le 12 Juillet 2012].
158. Rush, M.C., and R.W. Schneider. 1990. Chemical Control of Seedling Diseases of Rice in Louisiana. In B. T. Grayson, M. B. Green, L. G. Copping [eds.], *Pest Management in Rice*, 53–70. Springer Netherlands. Disponible sur: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-0775-1_4 [Consulté le 13 Janvier 2015].
159. Sangaré, L.R., N.S. Weiss, P.E. Brentlinger, B.A. Richardson, S.G. Staedke, M.S. Kiwuka, A. Stergachis. 2012. Determinants of Use of Insecticide Treated Nets for the Prevention of Malaria in Pregnancy: Jinja, Uganda. *PLoS ONE* 7: e39712.
160. Organisation Mondiale de la Santé. 1964. Terminologie du paludisme et de l’éradication du paludisme. Organisation mondiale de la santé.
161. Schuler, T.H., D. Martinez-Torres, A.J. Thompson, I. Denholm, A.L. Devonshire, I.R. Duce, M.S. Williamson. 1998. Toxicological, Electrophysiological, and Molecular Characterisation of Knockdown Resistance to Pyrethroid Insecticides in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59: 169–182.
162. Scott, J.A., W.G. Brogdon, F.H. Collins. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 520–529.

163. Service, M.W. 1997. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal--the long and short of it. *Journal of Medical Entomology* 34: 579–588.
164. Sexton, A.R. 2011. Best practices for an insecticide-treated bed net distribution programme in sub-Saharan eastern Africa. *Malaria Journal* 10: 157.
165. Shargie, E., T. Gebre, J. Ngondi, P. Graves, A. Mosher, P. Emerson, Y. Ejigsemahu, *et al.* 2008. Malaria prevalence and mosquito net coverage in Oromia and SNNPR regions of Ethiopia. *BMC Public Health* 8: 321.
166. Simpson, E.H. 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688–688.
167. Sinka, M., M. Bangs, S. Manguin, Y. Rubio-Palis, T. Chareonviriyaphap, M. Coetzee, C. Mbogo, *et al.* 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* 5: 69.
168. Smithuis, F.M., M.K. Kyaw, U.O. Phe, I. van der Broek, N. Katterman, C. Rogers, P. Almeida, *et al.* 2013. The effect of insecticide-treated bed nets on the incidence and prevalence of malaria in children in an area of unstable seasonal transmission in western Myanmar. *Malaria Journal* 12: 363.
169. Sogoba, N., P. Vounatsou, S. Doumbia, M. Bagayoko, M.B. Touré, I.M. Sissoko, S.F. Traore, *et al.* 2007. Spatial analysis of malaria transmission parameters in the rice cultivation area of Office du Niger, Mali. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 1009–1015.
170. Sovi, A., R. Azondékon, R.Y. Aïkpon, R. Govoétchan, F. Tokponnon, F. Agossa, A.S. Salako, *et al.* 2013. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasites & Vectors* 6: 319.
171. Sumitomo chemical. 2012. L’histoire De La Moustiquaire Olyset. Disponible sur: <http://fr.olyset.net/olysetnet/story/> [Consulté le 23 Juin 2012].
172. Swaroop, S. 1949. Forecasting of epidemic malaria in the Punjab, India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* s1-29: 1–17.
173. Tableman, M., J.S. Kim. 2003. *Survival Analysis Using S: Analysis of Time-to-Event Data*. Chapman and Hall/CRC.
174. Takahashi, M., K. Yasutomi. 1987. Insecticidal resistance of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in Japan: genetics and mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides. *Journal of Medical Entomology* 24: 595–603.
175. Tchegnon, P., E. Guidibi. 2006. *Monographie de la commune d’Adjohoun*. Cabinet Afrique Conseil, Cotonou.
176. Terlouw, D.J., K. Morgah, A. Wolkon, A. Dare, A. Dorkenoo, M.J. Eliades, J.V. Eng, *et al.* 2010. Impact of mass distribution of free long-lasting insecticidal nets on childhood malaria morbidity: The Togo National Integrated Child Health Campaign. *Malaria journal* 9: 199–199.

177. Thompson, M., F. Shotkoski, R. French-Constant. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. FEBS letters 325: 187–190.
178. Tia, E., M. Akogbeto, A. Koffi, M. Toure, A.M. Adja, K. Moussa, T. Yao, *et al.* 2006. [Pyrethroid and DDT resistance of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) in five agricultural ecosystems from Côte-d'Ivoire]. Bulletin De La Société De Pathologie Exotique (1990) 99: 278–282.
179. Tilak, R., J. Dutta, K.K.D. Gupta. 2007. Prospects for the use of ornamental fishes for mosquito control: a laboratory investigation. Indian Journal of Public Health 51: 54–55.
179. Della Torre, A., C. Fanello, M. Akogbeto, J. Dossou-yovo, G. Favia, V. Petrarca, M. Coluzzi. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. Insect Molecular Biology 10: 9–18.
180. Della Torre, A., Z. Tu, V. Petrarca. 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35: 755–769.
181. Trape, J.F. 2001. Contre: Les limites des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale. Bull Soc Pathol Exot 94: 174–179.
182. Vontas, J.G., M.J. Hejazi, N.J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas, J. Hemingway. 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Molecular Biology 11: 329–336.
183. Weill, M., G. Lutfalla, K. Mogensen, F. Chandre, A. Berthomieu, C. Berticat, N. Pasteur, *et al.* 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. Nature 423: 136–137.
184. WHO. 2014. Paludisme: informations aux voyageurs. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/travellers/fr/> [Consulté le 29 Mai 2015].
185. WHO. 2006. Paludisme : lutte antivectorielle et protection individuelle : rapport d'un Groupe d'étude de l'OMS. Organisation mondiale de la Santé, Genève.
186. WHO. 2008. Report of the twelfth WHOPES working group meeting. World Health Organization, Geneva. Disponible sur: http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_HTM_NTD_WHOPES_2009_1_eng.pdf [Consulté le 02 Août 2014].
187. WHO. 2012. World Malaria Report 2012. Disponible sur: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/ [Consulté le 13 Février 2015].

189. WHO. 2013a. World Malaria Report 2013. WHO. Disponible sur: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/ [Consulté le 7 Avril 2014].
190. WHO. 2010. World Malaria Report 2010. World Health Organization, Geneva.
191. WHOPEP. 2014. WHO recommended insecticide products for treatment of mosquito nets for malaria vector control. World Health Organization, Geneva.
192. WHOPEP. 2015. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. World Health Organization, Geneva.
193. 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].
194. WHO 2013b. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. World Health Organization, Geneva.
195. Wilson, A.L., R.C. Dhiman, U. Kitron, T.W. Scott, H. van den Berg, S.W. Lindsay. 2014. Benefit of Insecticide-Treated Nets, Curtains and Screening on Vector Borne Diseases, Excluding Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis 8: e3228.
196. Wirtz, R.A., W.R. Ballou, I. Schneider, L. Chedid, M.J. Gross, J.F. Young, M. Hollingdale, *et al.* 1987. *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in Escherichia coli. Experimental Parasitology 63: 166–172.
197. Wood, O., S. Hanrahan, M. Coetzee, L. Koekemoer, B. Brooke. 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Parasites & Vectors 3: 67.
198. Yadouleton, A., A. Asidi, R. Djouaka, J. Braïma, C. Agossou, M. Akogbeto. 2009. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. Malaria Journal 8: 103.
199. Yadouleton, A., T. Martin, G. Padonou, F. Chandre, A. Asidi, L. Djogbenou, R. Dabiré, *et al.* 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. Parasites & Vectors 4: 60.
200. Yadouleton, A.W., G. Padonou, A. Asidi, N. Moiroux, S. Bio-Banganna, V. Corbel, R. N'guessan, *et al.* 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. Malaria Journal 9: 83.

Annexe 1

Articles publiés

RESEARCH

Open Access

Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin

Virgile Gnanguenon^{1,2*}, Renaud Govoetchan^{1,2}, Fiacre R Agossa^{1,2}, Razaki Ossè^{1,3}, Frédéric Oke-Agbo¹, Roseric Azondekon¹, Arthur Sovi^{1,2}, Roseline Attolou^{1,2}, Kefilath Badirou^{1,2}, Filémon T Tokponnon^{1,2,4}, Gil G Padonou^{1,2} and Martin C Akogbeto^{1,2}

Abstract

Background: To better control malaria, the clear and urgent need is for improved data to inform decision makers, but in several African countries, there is a lack of baseline data on vectors and variation in the intensity of malaria transmission. This has resulted in the implementation of vector control efforts that ignore variation in vector behaviour and intensity of transmission, an approach that is most often not cost-effective. This study presents a detailed entomological description of mosquito distribution and variation in potentially transmissible contacts of *Plasmodium falciparum* following a south to north transect in Benin.

Method: The study was conducted in five locations where environmental parameters were different and malaria prevalence ranged between 14 and 51%. The locations represent the main eco-epidemiological malaria areas in Benin. Mosquitoes were collected using human landing catches, pyrethrum spray catches and windows traps. They were taxonomically and molecularly identified. Head-thoraces of *Anopheles gambiae* s.l. were tested by enzyme-linked immunosorbent assay. Entomological indicators were estimated following WHO guidelines.

Results: The results showed variation between location and period in distribution of *Anopheles coluzzii*, *An. gambiae*, and *Anopheles arabiensis* ($p < 0.05$). An extension of the reported range of *An. arabiensis* was also observed. Densities of malaria vectors varied significantly between rural and urban sites, however, indoor/outdoor biting ratios remained constant. Proportions of malaria vectors with circumsporozoite protein of *P. falciparum* were similar between locations. The entomological inoculation rates ranged between zero and eight bites/man/night with significant variations between areas.

Four profiles of human exposure to infectious malaria vector bites were observed and included location with one season of high transmission (June - August), two seasons of lower transmission (March-August; October-November), moderate continuous transmission season, and high continuous transmission season of *P. falciparum*.

Conclusion: The study revealed several entomological patterns in transmission of *P. falciparum* in Benin. The data could be used for purposes of planning a more cost-effective vector control strategy, by stratifying the country into higher and lower transmission zones. The information could also be used to guide extension of indoor residual spray based on a targeted use of IRS at sites where the duration of insecticidal effect following spraying coincides with the peak transmission period.

Keywords: Malaria transmission, *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae*, Vector control, Benin

* Correspondence: amerusangel@yahoo.fr

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

²Faculté 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

Background

Malaria vector control strategies have demonstrated their effectiveness through several studies [1-4]. In endemic areas, the result is a significant reduction in malaria morbidity and overall mortality [5-7]. The number of deaths due to malaria decreased from one million in 2000 to 627,000 in 2012 [7]. Several African countries have reported a decline in the number of confirmed malaria cases and the number of malaria-related hospitalizations and deaths. This significant progress in reducing malaria mortality and morbidity was mainly due to the Roll Back Malaria (RBM) initiative, which aimed to reduce at least by 50% the number of malaria deaths in 2010 and 75% by 2015 [8].

However, the development of malaria vector resistance to insecticides is an important threat to the effectiveness of vector control strategies [7]. At the same time, lack of information on vector population dynamics, before and after the application of vector control measures, makes the job of ongoing evaluation and planning of vector control interventions difficult [9].

The priority in terms of malaria control is for improved data to guide policy making [10]. But in most regions of Africa, there is a lack of baseline and monitoring information on vectors and variation in the intensity of malaria transmission, forcing program to use indoor residual spraying (IRS) and long-lasting insecticidal nets (LLINs) in uninformed ways, such as timing IRS such that it misses the peak transmission season. The implementation of these vectors control strategies requires detailed information on malaria transmission and distribution of vector populations. In addition, mosquito density and distribution varies between areas and periods and such variation can change the level of malaria transmission [11]. Assessment of the impact of vector control interventions on malaria transmission requires that study sites be identified and described, with baseline data gathered before the implementation of vector control strategies.

In Benin, current vector control strategies are based on the use of insecticide-based interventions (IRS and LLINs) [1,12], but the use of these tools could not lead to the elimination of malaria vectors when the deployment of intervention does not account for variability associated with abundance of vectors and intensity of malaria transmission. Existing data on these two

indicators are specific, located in a few geographical areas and are not representative of an entire territory.

This study presents a detailed entomological description of the distribution of mosquitoes and the variation in the rate of potentially transmissible contacts of *Plasmodium falciparum* throughout malaria eco-epidemiological areas in Benin. This will help the National Malaria Control Programme to make evidence-based decisions on vector control.

Methods

Study design

The study was conducted in five eco-epidemiological locations following a south-to-north transect in Benin where malaria prevalence [13] or geography was different (Table 1). LLIN intervention was ongoing in all selected locations since a universal-coverage national distribution campaign in July 2011. In each location, two representative areas (urban and rural) were selected. The entomological surveys were conducted bimonthly at each area from March to November 2012 during the malaria transmission season, especially when vector density was likely to change due to climatic conditions.

Three classical methods were used to monitor vector population dynamics: human landing catches (HLCs) to evaluate man-vector contact, pyrethrum spray collections (PSCs) to assess indoor-resting behavior of vectors, and window exit traps (WETs) to estimate exophilic behaviour. Blood-feeding rates were estimated from mosquitoes collected using PSCs and WETs. Each survey consisted of two-day collections in each of the study sites.

Study sites

Allada

Allada is located in the north of Atlantique Province. The climate is subequatorial with two rainy seasons (March-July and September-November) and two dry seasons (July-September and November-March). The annual average rainfall is between 800 and 1,000 mm. The soil is mainly characterized by earth bar and a marshy depression; it is well suited to food crops of vegetables and fruit and coffee growing. Most lands in Allada are less fertile. The selected areas were:

Allomey: an urban area of Allada located 6°40'14.71"N latitude and 2°9'2.99"E longitude.

Table 1 Characteristics of each study site

Location	Geography	Malaria prevalence (%) [13]
Allada	Upland, Climate: Coastal-guinean, Cereal area	14.70-26.10
Dassa	Upland, Climate: Guinean, Rice area	
Parakou	Lowland, Climate: South-Sudanian, Vegetable farms area	26.10-31.10
Kandi	Upland, Climate: Sudanian, Cotton area	43.60-51.10
Malanville	Lowland, Climate: Sudano-sahelian, Rice area	

Niaouli: a rural village located 6°44'37.01"N latitude and 2°8'13.32"E longitude.

Dassa

Dassa-Zoume is one of six districts of Collines Province. The climate is Guinean with four seasons: two rainy seasons and two dry seasons. The highest rainfall is recorded between July and September. The vegetation is forests and open savannahs. The two selected areas were:

Amangassa: an urban area of Dassa city, located 7°46'31.74"N latitude and 2°11'43.11"E longitude.

Lema: a rural village of Dassa, located 7°49'58.83"N latitude and 2°13'37.60"E longitude.

Parakou

Parakou is located in the centre of Borgou Province. The climate is South Sudanian. It is characterized by a rainy season (May to October) and a dry season (November-April). The lowest temperatures are recorded between December and January. The average annual rainfall is 1,200 mm. Parakou is watered by tributaries of the Okpara. These rivers remain dry from January to May. The main vegetation is savannah. The selected areas were:

Zongo zeno: an urban area of Parakou, located 7°49'58.83"N latitude and 2°13'37.60"E longitude.

Kpassa: a rural village of Parakou, located 7°49'58.83"N latitude and 2°13'37.60"E longitude.

Kandi

Kandi is located in the centre of Alibori Province in the agro-ecological zone of the cotton area. The climate of Kandi is Sudanese and characterized by two distinct seasons, a rainy season from April to October and a dry season from November to March. December, January and February are characterized by an absolute drought with harmattan. The annual average rainfall varies considerably between 700 and 1,400 mm. The soil is very rugged with predominance of plateau. It is watered by the tributaries of Alibori and Sota. The selected areas were:

Kossarou: an urban area of Kandi I, located 11°7'29.32"N latitude and 2°56'9.57"E longitude.

Sonsoro: a rural village of Kandi, located 11°4'58.91"N latitude and 2°13'37.60"E longitude.

Malanville

Malanville is located in the far north of the Republic of Benin. The climate is Sudano-Sahelian type and characterized by a dry season from November to April. The average rainfall is 750 mm. Malanville is watered from east to west by the Niger River and its tributaries Alibori, Mekrou and Sota, which are in flood during August and September. The main vegetation is savannah with grassland. The

principal agricultural occupation is rice cultivation. The included areas were:

Arobanda: an urban area, located 11°51'5.12"N latitude and 3°23'45.06"E longitude.

Bodjecali: a rural village, located 11°48'49.06"N latitude and 3°22'58.08"E longitude.

Mosquito sampling and field processing

Human Landing Catches (HLCs) were conducted in two houses in each area from 21.00 to 06.00 hours. At each house, mosquito collectors, one outside and one inside, with a flashlight and a mouth aspirator, collected all landing mosquitoes on their feet. Assuming that there is a risk of malaria transmission, collectors received an antimalarial prophylaxis as prevention against malaria. Malaria symptoms were also monitored and treatment was provided when necessary.

A team of two people estimated indoor-resting and outdoor-exiting density using PSCs and WETs in two other houses between 06.45 and 08.00 hours. PSCs consisted of covering all exposed surfaces with white sheets, spraying the rooms and collecting all fallen specimens.

After collection, mosquitoes were counted and morphologically identified [14,15]. A proportion of unfed *Anopheles gambiae s.l.* females from HLCs were dissected to extract ovaries and to determine parous *An. gambiae s.l.* (mosquitoes that have oviposited at least once) by observing the coiling degree of ovarian tracheoles [16]. Collected females from PSCs and WETs were classified by abdominal status to estimate blood-feeding rate. Collected *An. gambiae s.l.* were stored individually in labelled Eppendorf tubes with desiccant until laboratory processing.

Laboratory processing

Around 100–150 *An. gambiae s.l.* were randomly selected (from urban and rural areas and proportionally to the number collected in each area) during each collection period for detection of *P. falciparum* circumsporozoite protein (CSP). The heads and thoraces of the *An. gambiae s.l.* females selected were tested by ELISA for identification of *P. falciparum* CSP according to the method described by Wirtz and colleagues [17]. Additionally, for each survey, a random sample of 48 females of *An. gambiae s.l.* by district was identified to species level by molecular method described by Fanello and colleagues [18]. When the number of *An. gambiae s.l.* collected during an assessment did not reach 48 in a district all the *An. gambiae s.l.* collected were used.

Parameters estimated

Composition of mosquito populations was studied in terms of species diversity, expressed as richness (Taxa S) and species abundance, expressed as evenness [19].

Shannon-Wiener diversity index and Simpson's dominance index was determined at each site.

Human-biting rate (HBR) was defined as the ratio of the total number of mosquito species collected to the total person-nights for the collection period. Endophagy rate represented the proportion of mosquitoes collected indoors against the total of both indoors and outdoors collections from HLC. Exophagy rate was the proportion of mosquitoes collected outdoors against the total of both indoors and outdoors collections from HLC. Endophily was estimated as the percentage of *An. gambiae s.l.* collected by indoor residual (at rest) divided by the total number collected by PSCs and WETs. Exophily rate was determined as the percentage of *An. gambiae s.l.* collected by WETs (exiting) divided by the total number collected by PSCs and WETs. Parity rate was defined as the number of parous *An. gambiae s.l.* divided by the total number dissected. The sporozoite index (SI) was defined as the

proportion of total mosquitoes collected found to contain the *P. falciparum* CSP. EIR represented the product of HBR and the SI of night caught mosquitoes.

Data analysis

Mosquito diversities were compared using Student's t test. The diversity data were analysed using PAST 2.07. Poisson's confidence intervals method [20] was used to estimate confidence intervals of densities, HBR, EIR, endophagy rates and frequencies of different species of *An. gambiae s.l.* Binomial confidence intervals method [20] was used to estimate confidence intervals of parity rates. Unconditional maximum likelihood estimation method (Wald), or median unbiased estimation (mid-p) of the risk ratio (RR) followed by their confidence intervals obtained using the normal approximation or the exact method mid-p and p-values obtained by Khi2 or midp.exact [21], were used to compare endophagy and

Table 2 Computations for species diversity and dominance index for mosquitoes sampled in sentinel sites

Species	Allada		Dassa		Parakou		Kandi		Malanville	
	ni	Pi	ni	Pi	Ni	pi	Ni	pi	ni	Pi
<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	143	0.42	219	0.28	1239	0.59	653	0.69	3912	0.87
<i>Anopheles funestus</i>	18	0.05	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Anopheles nili</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	5	0
<i>Anopheles pharoensis</i>	11	0.03	0	0	20	0.01	2	0	71	0.02
<i>Anopheles ziemanni</i>	2	0.01	0	0	5	0	0	0	12	0
<i>Anopheles broheri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Anopheles coustani</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
<i>Anopheles fuscicolor</i>	0	0	0	0	16	0.01	0	0	0	0
<i>Aedes aegypti</i>	6	0.02	0	0	0	0	3	0	10	0
<i>Aedes vitatus</i>	6	0.02	0	0	0	0	0	0	40	0.01
<i>Aedes luteocephalus</i>	1	0	0	0	2	0	2	0	1	0
<i>Aedes gr. palpalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0.01
<i>Aedes gr. tarsalis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Aedes spp.</i>	0	0	0	0	0	0	13	0.01	4	0
<i>Culex quinquefasciatus</i>	43	0.13	546	0.71	455	0.22	250	0.27	293	0.06
<i>Culex gr decens</i>	4	0.01	0	0	3	0	0	0	2	0
<i>Culex nebulosus</i>	12	0.04	6	0.01	9	0	4	0	10	0
<i>Culex annulioris</i>	1	0	0	0	14	0.01	1	0	25	0.01
<i>Culex fatigans</i>	3	0.01	0	0	5	0	5	0.01	0	0
<i>Culex thalassius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0
<i>Mansonia africana</i>	88	0.26	1	0	320	0.15	3	0	0	0
<i>Coquilletidia cristata</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	97	0.02
Total	338	1	774	1	2,089	1	940	1	4,522	1
Taxas_S	13		6		12		12		17	
Shannon diversity index	1.66		0.65		1.12		0.78		0.63	
Simpson's dominance	0.27		0.59		0.42		0.56		0.75	

gr = group; ni = number of species i; Pi = fraction of the entire population made up of species i.

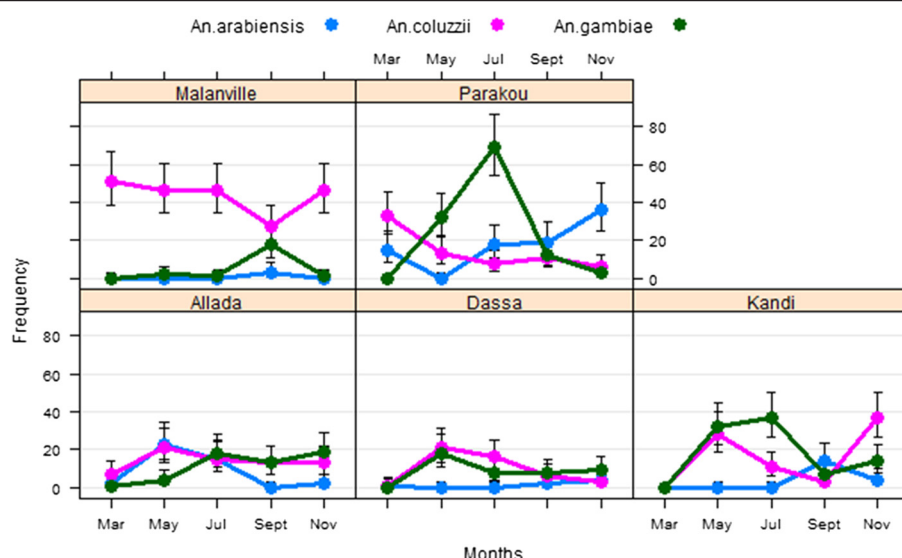


Figure 1 Distribution of species of the complex *Anopheles gambiae*.

exophagy rates and EIR. Principal component analysis was used to reveal the structure of the EIR data to determine the profiles of malaria transmission. Factor 1, 2, and 3 represented principal component 1, 2, and 3.

Zero-inflated regression models [22] were used to predict entomological inoculation rates of unevaluated months due to the important number of zero in the dataset. This model used the EIR as the dependent variable and covariates as: locations and months of collection. This model is the best among the Poisson family models for the data based on the log likelihood. All these parameters were computed and analysed using the free software R version 2.15.1.

Ethical consideration

This study received ethical approval from the Ministry of Health in Benin. Informed consent was obtained from

mosquito collectors who were vaccinated against yellow fever. Mosquito collectors received preventive treatments for malaria and were also subject to regular medical check-ups. Authorization to conduct the study was also obtained from district authorities and from individuals before entering their houses.

Results

Mosquito diversity

A total of 8,663 man-biting mosquitoes belonging to five genera (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Coquilletidia*) and 21 species were collected in the study sites (Table 2). Two major malaria vectors were found: *An. gambiae* s.l. (found everywhere, and representing 71.1% of the total mosquitoes: 6,166/8,663) and *Anopheles funestus* found in Allada (0.05%) and Dassa (0.1%). *Anopheles nili*, a local

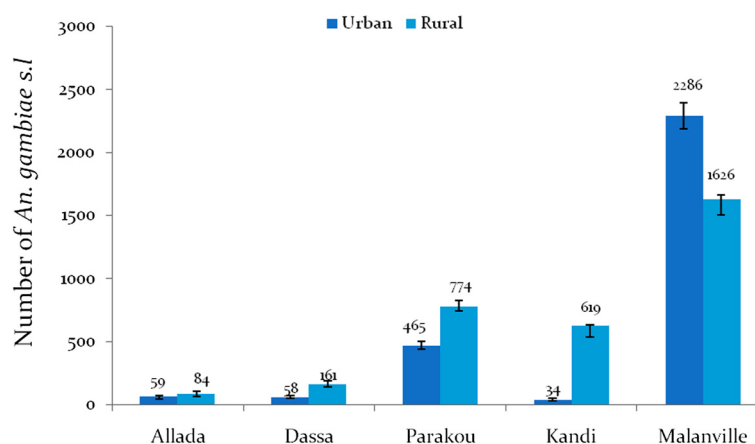


Figure 2 Aggressive densities of *Anopheles gambiae* s.l. in urban and rural areas.

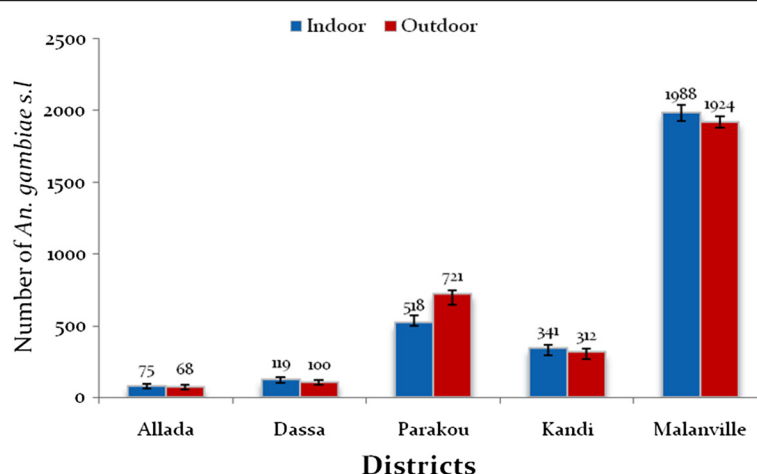


Figure 3 Aggressive densities of *Anopheles gambiae* s.l. indoors and outdoors.

vector, was collected but at very low numbers in Parakou (0.04%) and Malanville (0.1%). Other Anophelines collected and identified to species included: *Anopheles pharoensis*, *Anopheles ziemanni*, *Anopheles broheri*, *Anopheles fuscicolor*, and *Anopheles coustani*.

Culex quinquefasciatus and other *Culex* species were also found at low densities (Table 2). *Culex quinquefasciatus* was the main man-biting mosquitoes collected in Dassa (72%) and the most common non-anopheline man-biting mosquito species in Parakou (22%) and Kandi (27%), but *Mansonia africana* was the second most common man-biting mosquito species found in Allada (26%) and Parakou (15%). *Coquilletidia cristata* was only found in Malanville and Dassa (Table 2).

Allada recorded Shannon-Wiener diversity and Simpson's dominance index of 1.66 and 0.27, respectively, while

Dassa, Parakou, Kandi, and Malanville recorded diversity and dominance values of 0.65 and 0.59, 1.12 and 0.42, 0.78 and 0.56, 0.63 and 0.75, respectively. When the frequencies of diversity and dominance indices of mosquitoes were compared between sites, Allada recorded the highest Shannon-Wiener diversity index and the lowest Simpson's dominance index, while Malanville recorded the highest Simpson's dominance index but the lowest Shannon-Wiener diversity index regardless of the number of collected species in this area was high. In Allada, many species were collected but at very low densities. There was no significant difference in mosquito diversity between Allada, Parakou, Kandi, and Malanville ($p > 0.05$), but in the district of Dassa a significant difference ($p < 0.001$) in mosquito diversity was observed compared to other districts.

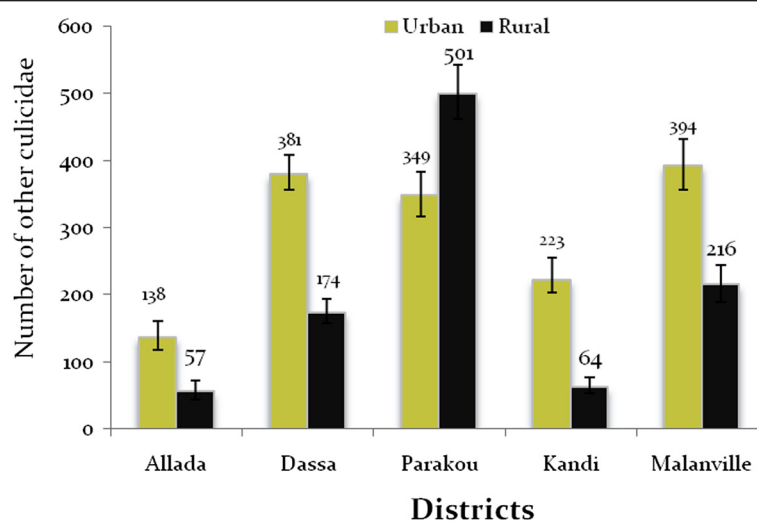


Figure 4 Aggressive densities of other mosquito species.

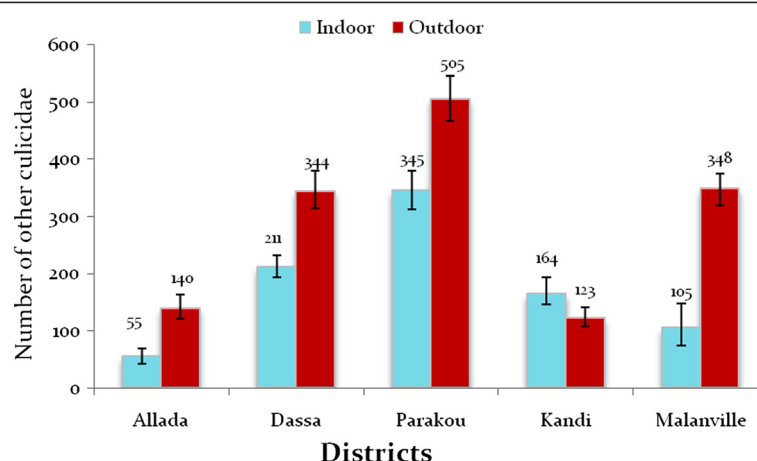


Figure 5 Aggressive densities of other Culicidae indoors and outdoors per district.

Distribution of *Anopheles gambiae* species complex

In total, 966 *An. gambiae s.l.* were analysed by PCR for species identification. Three species of the complex *An. gambiae* were identified: *Anopheles coluzzii*, *An. gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Anopheles coluzzii* represented 50% ($n = 482$) of mosquitoes tested against 16% ($n = 158$) of *An. arabiensis*, and 34% ($n = 326$) of *An. gambiae*. The three species were found at five sites but at different times during the transmission season (Figure 1). *Anopheles arabiensis* previously limited in Parakou was identified in Dassa and Allada. *Anopheles arabiensis* (43%) and *An. coluzzii* (48%) predominated between March and May at Allada. From July to November, density of *An. arabiensis* decreased to 16% while density of *An. gambiae* increased from 9 to 46%. From March to July, *An. coluzzii* and *An. gambiae* were the most represented species in Dassa (58 and 40%, respectively) and Kandi (36 and 64%). *Anopheles arabiensis* were found in a sizeable proportion (19-23%) at these two areas between September and November (Figure 1). *Anopheles coluzzii* was highly predominant ($p < 0.05$) in Malanville. In Parakou, *An. gambiae* predominated between May and July, while *An. arabiensis* was mostly found between September and November, and *An. coluzzii* in March (Figure 1).

Table 3 Parity rates of *Anopheles gambiae s.l.*

Localities	Total	N parous	Parity rate (%)	P
Allada	143	126	88.11	0.2878
Dassa	134	103	76.87	
Parakou	579	513	88.60	
Kandi	465	420	90.32	
Malanville	489	432	88.34	
Total	1,810	1,594	88.06	

N = Number; P = P-value.

Aggressive density of *Anopheles gambiae s.l.*

A total of 143 (117.74-165.34) *An. gambiae s.l.* were collected in Allada, 219 (194.59-246.39) in Dassa, and 1,239 (1,184.32-1,296.88) in Parakou. Respectively, 653 and 3,912 *An. gambiae s.l.* were collected in Kandi and Malanville. The number of *An. gambiae s.l.* was generally higher in rural areas than in urban areas except in Malanville where the opposite was observed (Figure 2).

In Malanville the average HBR was 49 bites/man/night. The aggressive density of *An. gambiae s.l.* observed in Malanville was significantly higher than in Parakou (15 bites/man/night), Kandi (eight bites/man/night), Dassa (three bites/man/night), and Allada (two bites/man/night). Endophagy rates and exophagy rate were similar in Malanville, Kandi Dassa, and Allada ($p > 0.05$). Exophagy rate of *An. gambiae s.l.* was significantly higher than the endophagy rate ($p < 0.001$) at Parakou (Figure 3).

Aggressive density of other Culicidae

The abundance of other mosquito species was significantly lower compared to that of *An. gambiae s.l.* ($p < 0.05$) but also varied from one site to another. Unlike *An. gambiae s.l.*, other Culicidae were more abundant in urban than in peripheral environment in all districts except Parakou where other Culicidae were significantly higher (501 (462.50-542.303)) in peripheral areas (349 (317.19-383.87)) (Figure 4). The number of other Culicidae ranged from 138 (118.31-160.66) to 394 (356.34-432.57) in urban areas in Allada, Dassa, Kandi, and Malanville. In rural areas of these districts, the number of other Culicidae was between 57 (44.80-72.25) and 216 (189.13-244.85). Fifty-five (41.94-69.09) to 345 (313.26-379.78) human-biting other Culicidae were collected indoors (Figure 5). The number of other mosquito species collected outdoors varied from 123 (108.78-140.80) to 348 (318.65-375.24) (Figure 5). The endophagy rates of other Culicidae were significantly lower than exophagy rates in all districts ($p < 0.05$) except in

Table 4 Observed exophily rates of mosquitoes collected by study site

Area	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>				<i>Mansonia and Culex spp</i>			
	SPCs	WETs	Exophily (%)	P	SPC	WETs	Exophily (%)	P
Allada	24	5	17.24	-	14	19	57.58	-
Dassa	11	12	52.17	0.03	122	80	39.60	0.14
Parakou	42	9	17.65	0.96	86	38	30.65	0.02
Kandi	199	54	21.34	0.33	183	118	39.20	0.17
Malanville	787	24	2.95	<0.0001	838	12	1.41	<0.0001
Total	1,063	104	8.91		1,243	267	17.67	

PSCs = Pyrethrum Spray Collections; WETs = Window Exit Traps.

Kandi where endophagy rate was significantly higher than exophagy rate ($p < 0.05$).

Longevity of *Anopheles gambiae s.l.*

Some 1,810 ovaries of *An. gambiae s.l.* were dissected. The majority of *An. gambiae s.l.* dissected were old with an average parity rate of 88.06%. The parity rate was 88.11% in Allada and 76.87% in Dassa (Table 3). In Parakou, Kandi and Malanville, the observed parity rates were 88.60, 90.32 and 88.34%, respectively. No significant variation was observed between sites ($p > 0.05$).

Exophily of *Anopheles gambiae s.l.*, *Mansonia spp.* and *Culex spp.*

A total of 2,677 mosquitoes were collected in morning PSCs and WETs (Table 4). They belonged to three genera (*Anopheles* including *An. gambiae s.l.* only, *Mansonia* and *Culex*). 1,167 *An. gambiae s.l.* were collected versus 1,510 *Mansonia* and *Culex spp* (Table 4). Observed exophily of *An. gambiae s.l.* was generally low (Table 4). Exophily rates for *An. gambiae s.l.* in Allada, Parakou, and Kandi were similar ($p > 0.05$) with respective exophily rates of 17.24, 17.65, and 21.34 (Table 4). The highest exophily rate was observed in Dassa (52.17%, $p = 0.03$). The lowest exophily rate was observed in Malanville (2.95%, $p < 0.0001$). Observed exophily rates in *Mansonia* and *Culex spp* in Parakou (30.65%) and Malanville (1.41%) was significantly lower than that observed in other districts ($p < 0.05$). Exophily rates in Allada, Dassa and Kandi were 57.58, 39.60, and 39.20%, respectively.

Mosquito blood-feeding rates

The observed blood-feeding rates of mosquitoes collected from indoor residual and WETs in different study sites were high (Table 5). *Anopheles gambiae s.l.* had a higher blood-feeding rate in Allada (100%) and Malanville (93.65%) than in Dassa (56.52%) and Kandi (73.87%). In Parakou, *An. gambiae s.l.* had a similar blood-feeding rate (80.39%) to all other districts (Table 5). A significant variation in blood-feeding behaviour of *An. gambiae s.l.* was observed between sites ($p < 0.05$).

Mansonia spp and *Culex spp* also had high blood-feeding rates (Table 5). The observed blood-feeding rates among these species varied between sites ($p < 0.05$) and ranged from 48 to 93%.

Infectivity of *Anopheles gambiae s.l.*

A total of 1,652 head-thoraces of *An. gambiae s.l.* collected were assessed with CSP-ELISA assays. The mean SI was 4.46%. SI was similar ($p > 0.05$) in urban (4.3%: 24 head-thoraces+/556 head-thoraces) and rural areas (4.5%: 50 head-thoraces +/1,102 head-thoraces). The average SI was 5.8% (31 head-thoraces +/531 head-thoraces) in Parakou, 5.6% (12 head-thoraces +/214 head-thoraces) in Dassa, 2.5% (seven head-thoraces +/280 head-thoraces) in Kandi, 4.4% (eight head-thoraces +/182 head-thoraces) in Allada, and 3.5% (16 head-thoraces+/451 head-thoraces) in Malanville. The highest infection rate was observed in urban Dassa, and the lowest was observed in rural Kandi (Table 6). In urban Kandi, no positive head-thorax was found. *Plasmodium falciparum* infection was observed in *An. gambiae s.l.* from March to November in

Table 5 Blood-feeding rates of *Anopheles gambiae s.l.*, *Mansonia* and *Culex spp*

Areas	<i>Anopheles gambiae s.l.</i>				<i>Mansonia and Culex spp</i>			
	Total	Fed	Blood-feeding rate (%)	P	Total	Fed	Blood-feeding rate (%)	P
Allada	29	29	100.0 ^a	0.0004	33	29	87.87 ^a	0.0009
Dassa	23	13	56.52 ^b		202	97	48.01 ^b	
Parakou	51	41	80.39 ^{ab}		124	90	72.58 ^a	
Kandi	253	187	73.91 ^b		301	230	76.41 ^a	
Malanville	811	759	93.58 ^a		850	790	92.94 ^a	

Blood-feeding rates which carry same letters in exposant were not significantly different ($p > 0.05$); P = P-value.

Table 6 *Plasmodium falciparum* infection rates observed in *Anopheles gambiae* s.l.

Localities		March	May	July	September	November	SI/Period	RR	95% CI	P
Allada urban	Thorax	4	33	23	13	14	5.75	1.00	—	0.49
	Thorax+	0	2	1	1	1				
	SI	0	6.06	4.35	7.69	7.14				
Allada rural	Thorax	7	24	24	20	16	3.30	0.97	0.91-1.04	
	Thorax+	0	1	0	0	2				
	SI	0	4.17	0	0	12.5				
Dassa urban	Thorax	0	18	23	5	7	6.86	1.00	—	0.73
	Thorax+	0	0	0	1	1				
	SI	0	0	0	20	14.29				
Dassa rural	Thorax	2	60	77	13	9	5.38	1.03	0.96-1.10	
	Thorax+	0	3	5	2	0				
	SI	0	5	6.49	15.38	0				
Parakou urban	Thorax	19	40	44	29	50	5.39	1.00	—	0.57
	Thorax+	1	0	5	3	0				
	SI	5.26	0	11.36	10.34	0				
Parakou rural	Thorax	125	50	46	78	50	4.71	1.01	0.97-1.06	
	Thorax+	16	3	1	2	0				
	SI	12.8	6	2.17	2.56	0				
Kandi urban	Thorax	0	9	3	24	4	0	1.00	—	0.60
	Thorax+	0	0	0	0	0				
	SI	0	0	0	0	0				
Kandi rural	Thorax	0	87	90	60	1	1.8	-	—	
	Thorax+	0	3	2	2	0				
	SI	0	3.45	2.22	3.33	0				
Malanville urban	Thorax	11	41	48	40	50	4.84	1.00	—	0.61
	Thorax+	1	1	2	1	3				
	SI	9.09	2.44	4.17	2.5	6				
Malanville rural	Thorax	67	59	47	38	50	2.72	0.99	0.95-1.03	
	Thorax+	4	2	2	0	0				
	SI	5.97	3.39	4.26	0	0				

SI = Sporozoite Index; RR = Rate Ratio; CI = Confidence Interval; P = P-value.

urban Malanville and rural Parakou. In the other locations *P. falciparum* infection rate was found variable over time.

Entomological inoculation rate of *Anopheles gambiae* s.l.

Table 7 shows the distribution of EIR by site. The EIR of *An. gambiae* s.l. was high in Malanville, with an average range of four to eight infected bites/man/night during the study period. Infected bites were recorded each month from March to November at this location. Parakou was also characterized by a high malaria transmission with two to five infected bites/man/night in rural and urban areas. The lowest EIR was observed in urban Kandi with no infected bites/man/night. Globally, observed EIRs were significantly higher in rural areas than in urban areas ($p < 0.05$), except in Allada where EIRs were similar

(Table 7). EIR was generally higher in July than in other months (Table 7).

Principal component analysis identified three significant factors that accounted for around 90% of the variation in EIR (Table 8). Observed human exposure to infectious bites in Kandi, Dassa and Allada significantly contributed to the formation of factor 1, transmission risk in Parakou essentially contributed to the formation of factor 2, and those of Malanville were decisive in factor 3 (Table 8).

Figures 6, 7 and 8 describe the relationship between observed EIRs and these factors. The results suggest four profiles of malaria transmission. The first profile includes Kandi and Dassa where variations in EIRs were similar (Figure 6). In contrast, Allada had a different profile suggesting that variation in entomological inoculation rates

Table 7 Observed entomological inoculation rates (EIR) by study site

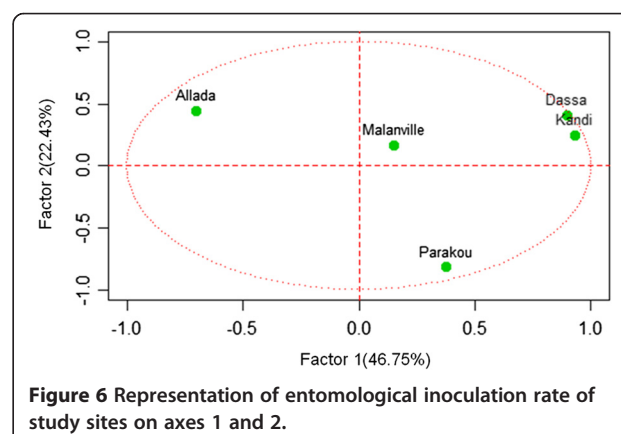
Localities	March	May	July	September	November	EIR/Night	EIR/Month	EIR/Year	RR/IC95	P
Allada urban	4.00	22.00	18.00	10.00	14.00	0.48	14.37	174.82	1.00	0.45
HBR/night	0.50	2.75	2.25	1.25	1.75					
EIR/night	0.00	0.16	0.10	0.10	0.12					
Allada rural	7.00	10.00	23.00	19.00	16.00	0.30	9.06	110.27	0.50 (0.09-2.73)	
HBR/night	0.88	1.25	2.87	2.38	2.00					
EIR/night	0.00	0.05	0.00	0.00	0.25					
Dassa urban	0.00	17.00	21.00	5.00	7.00	0.25	7.50	91.26	1.00	0.022
HBR/night	0.00	2.12	2.62	0.63	0.88					
EIR/night	0.00	0.00	0.00	0.13	0.13					
Dassa rural	2.00	50.00	103.00	9.00	5.00	1.32	39.62	482.09	5.00 (1.10-22.81)	
HBR/night	0.25	6.25	12.87	1.13	0.63					
EIR/night	0.00	0.31	0.84	0.17	0.00					
Parakou urban	19.00	278.00	88.00	29.00	51.00	1.75	52.48	638.51	1.00	0.00
HBR/night	2.38	34.75	11.00	3.63	6.38					
EIR/night	0.12	0.00	1.25	0.37	0.00					
Parakou rural	125.00	276.00	161.00	90.00	122.00	4.79	143.84	1,750.03	2.13 (1.30-3.50)	
HBR/night	15.63	34.50	20.12	11.25	15.25					
EIR/night	2.00	2.07	0.44	0.29	0.00					
Kandi urban	0.00	4.00	3.00	23.00	4.00	0	0	0	1.00	<0.0001
HBR/night	0.00	0.50	0.38	2.88	0.50					
EIR/night	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
Kandi rural	0.00	142.00	372.00	104.00	1.00	2.08	62.33	758.31	-	
HBR/night	0.00	17.75	46.50	13.00	0.13					
EIR/night	0.00	0.61	1.03	0.43	0.00					
Malanville urban	11.00	120.00	1042.00	522.00	591.00	8.44	253.20	3,080.64	1.00	0.0012
HBR/night	1.38	15.00	130.25	65.25	73.87					
EIR/night	0.12	0.37	5.43	1.63	4.43					
Malanville rural	67.00	305.00	515.00	159.00	580.00	4.53	136.04	1,655.14	0.52 (0.37-0.73)	
HBR/night	8.38	38.12	64.38	19.87	72.50					
EIR/night	0.50	1.29	2.74	0.00	0.00					

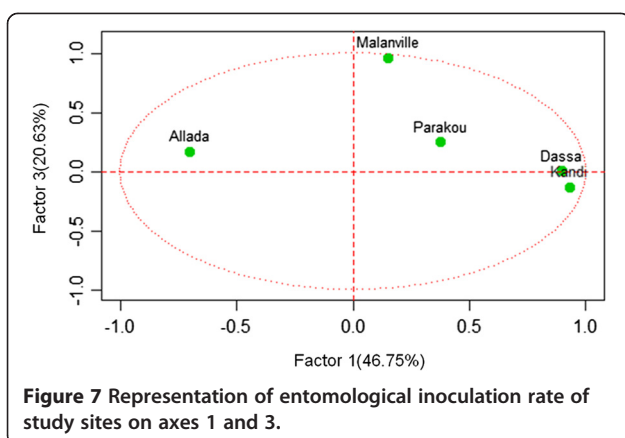
EIR = Entomological Inoculation Rate; RR = Rate Ratio; CI = Confidence Interval; P = P-value.

was significantly different from those observed in Dassa and Kandi (Figure 7). Variations in EIRs in Malanville and Parakou were significantly different, suggesting two different malaria transmission profiles (Figure 8). The existence of such profiles was further confirmed by a monthly EIR

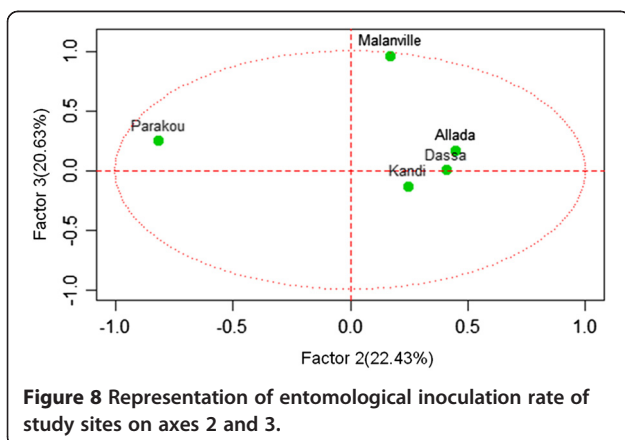
Table 8 Contribution of entomological inoculation rate observed in each location to factors 1-3

Factors	Localities	Correlation	P
Factor 1	Kandi	0.9330095	0.0000812
	Dassa	0.8986404	0.0004079
	Allada	-0.703905	0.0230912
Factor 2	Parakou	-0.816829	0.0039228
Factor 3	Malanville	0.9605642	0.0000101





prediction model in each site (Figure 9). The predicted EIR model showed four trends (profiles) in malaria transmission. The first trend included transmission predicted in Dassa and Kandi that showed one season of high transmission. This season begins in June and ends in August with a maximum of 13 infectious bites/man/month in Dassa *versus* 15 infectious bites in Kandi (Figure 9). The second trend was determined by the transmission predicted in Allada where transmission is lower than in other localities but with two seasons. The first season begins in March and ends in August with a maximum of four infectious bites/man/month. The second transmission season occurs in October and ends in November with a maximum of six infectious bites/man/month. The third transmission trend was determined by EIR predicted in Parakou with three peaks suggesting a continuous malaria transmission in this area. In this area, EIRs varied from nine to 27 infectious bites/man/month (Figure 9). The fourth trend observed in Malanville showed several peaks of EIR ranging from nine to 120 infectious bites/man/month (Figure 9). It also suggests a continuous transmission in this area but with higher value than in Parakou.



Discussion

The majority, seventy one percent, of the vectors collected during this study were *An.gambiae s.l.* Abundance varied according to the degree of urbanization. Estimates of indoors versus outdoors biting were similar. The number of *An. gambiae s.l.* infective bites/human/night varied between locations. Based on these results four *P. falciparum* transmission profiles, across a North-south transect in Benin, are described.

No significant variation in vector bio-diversity was observed between locations, suggesting that similar control intervention would work in each location, thereby reduce higher costs associated with the application of different control methods in different locations [23]. Taxonomic results also demonstrate a spatio- temporal variation in the complex *An. gambiae* as observed in Nigeria, Cameroon and Burkina Faso [24-26].

Anopheles arabiensis, a vector of dry savannah areas and limited in 1980 between the extreme north Benin (Malanville) and Parakou [27,28], was found in Dassa and Allada in 2012. The results suggest an extension of the spatial distribution of this vector associated with destruction of forests and large areas (70,000 ha/yr) for agriculture, hunting, grazing, and wood harvesting in central and southern Benin [29]. Habitat changes, such as these, may contribute to the spread of this malaria vector in southern Benin. In addition, long dry seasons recently observed in Benin, and elsewhere in Africa, due to climate change [30], foster the spread of *An. arabiensis* that has a similar abundance with *An. gambiae* during certain months (May, September and November).

Differences between densities of *An. gambiae s.l.* and other man-biting mosquitoes in each site could be explained by the ecological characteristics of the environment. Many of the study sites, such as Malanville and Parakou, are suitable for vector breeding. They are low-land areas where rice and cotton cultivation, and vegetable farming are the main activities [31,32]. Densities of *An. gambiae s.l.* were similar inside and outside houses. This result was contrary to that observed by Akogbeto and colleagues [1] showing a low endophagy rate in indoor residual spray areas. It highlighted the importance of such strategies on malaria vector control. High densities observed in urban Malanville are due to the existence of rice-growing areas with permanent mosquito breeding sites in the urban area [31].

The EIR estimates human exposure to malaria-infected vectors. It is commonly used to assess malaria endemicity and transmission intensity [33]. In the present study, observed EIRs varied significantly between locations. The highest rates were observed in Parakou and Malanville with more than two infectious bites/man/night suggesting that populations from Malanville and Parakou are more exposed to transmission of *P. falciparum* compared to

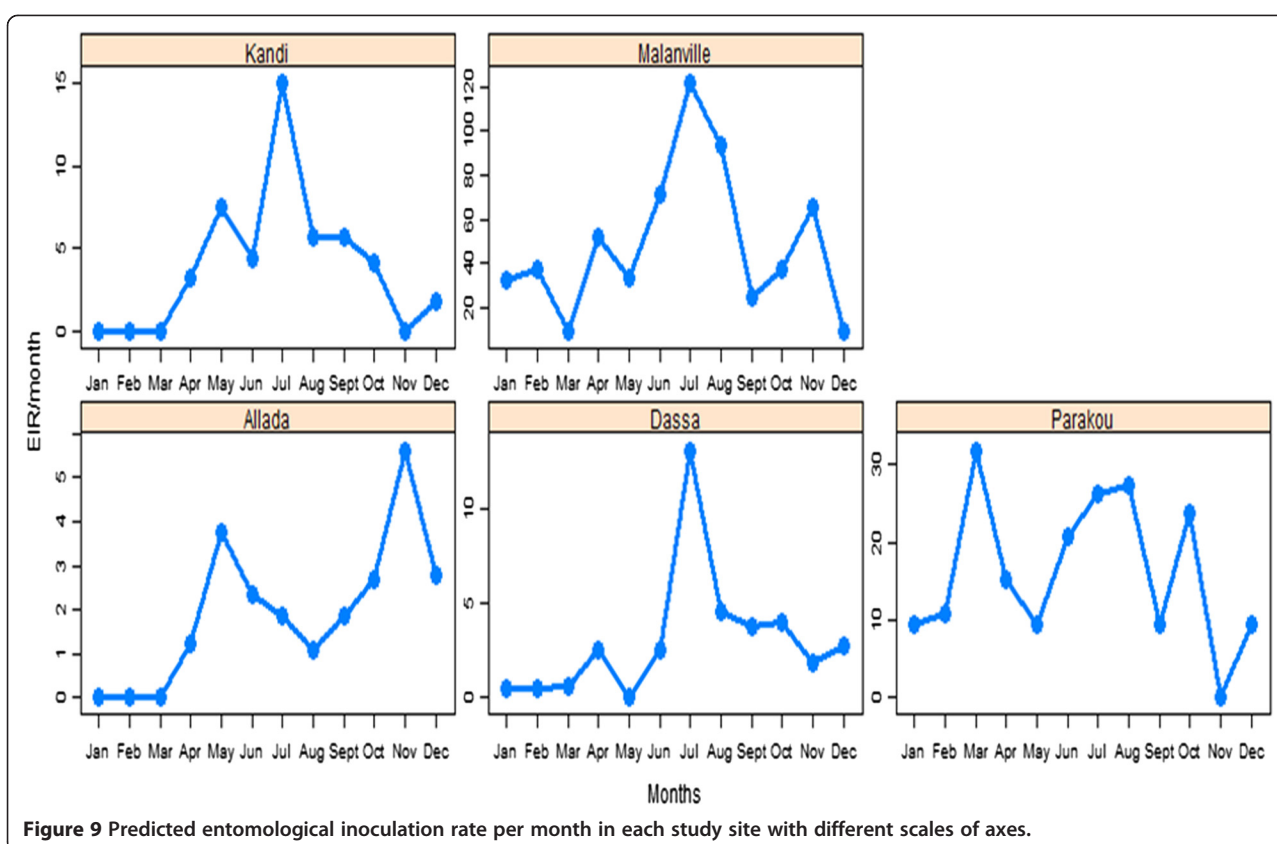


Figure 9 Predicted entomological inoculation rate per month in each study site with different scales of axes.

other locations. Observed malaria transmission risk at each location could be associated with their environmental characteristics. Koudou and colleagues [34] reported an increase EIR from 38 to 295 infective bites/person/year with a return to rice cultivation at Zitta region in Côte d'Ivoire. Permanent exposure to malaria for a community close to vegetable farming was also reported by Yadouleton *et al.* [35]. Such observations suggest that rice cultivation and vegetable farming are key factors associated with high malaria transmission risk and could explain transmission observed in Malanville and Parakou. Rice cultivation could also explain differences in EIR between Dassa and Allada, which are both highlands with similar malaria prevalence, and between Kandi and Malanville which have similar malaria prevalence. In addition, Kandi, Diassa, and Allada are highlands reported to have lower malaria transmission risk than the lowlands (Malanville and Parakou) [36]. The impact of the current LLINs intervention on vector populations may also explain the lower vector densities and lower transmission risks than expected in some areas where case data-based malaria prevalence does not seem to correlate with EIRs [3,37]. But a firm conclusion on correlation between EIRs and prevalence will be drawn if entomological and parasitological data are concurrently collected.

Infectious-vectors bites were higher in rural areas compared to urban areas in a same district suggesting a spatial heterogeneity of EIRs. This shows the importance of local conditions or micro-ecological conditions and environment characteristics in the intensity of malaria transmission.

High EIRs observed in certain locations was particularly due to a high HBR of *An. gambiae*, but not to a high infectious rate of vectors. This observation raises the question: where are we most vulnerable to malaria: between areas with low densities of vectors with high infectious rates or areas with high densities of vectors with low infectious rates?

Observed patterns in transmission of *P. falciparum* included locations with one season of high malaria transmission, locations with two seasons of high transmission and locations with continuous high transmission of malaria. Malanville and Parakou are locations at high risk of transmission where urgent, efficient vector control strategies should be implemented to help populations.

The study demonstrates the role of vector biology in the epidemiology of malaria in Benin. However, the lack of data on malaria prevalence estimated by microscopy or rapid detection in populations of each study site represents an

important limitation. The study could also be improved by increasing the number of surveys and including more locations.

The study of intensity of *P. falciparum* transmission by mosquitoes is very important for implementation of insecticide-based vector control interventions in Benin where several large-scale vector control interventions (LLINs and IRS) are ongoing. It will guide policies in the selection of priority areas for vector control interventions. Knowledge of the number of high transmission season in each area will also help to implement cost-effective IRS interventions.

Conclusion

This study documents at least four vector-biology-associated patterns in transmission of *P. falciparum* from southern to northern Benin. It shows a spatiotemporal variation in the distribution of malaria vectors. It also reveals a spatial heterogeneity in human-biting behaviour as well as variation in human exposure to infectious bites of malaria vectors.

These data represent a source of information that could guide implementation of any cost-effective vector control strategy in Benin by targeting the higher transmission areas, that is by stratifying the country into higher and lower transmission zones. The study could also help extension of indoor residual spray based on a targeted use of IRS at sites where the duration of insecticidal effect following spraying coincides with the peak transmission period.

Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Authors' contributions

VG designed experiments, coordinated field activities, wrote and revised the paper; RG, FRA, RO, RA, NA, RO, and EO participated in field activities, data collection and revised the paper; FO helped with statistical analysis and revised the paper; GGP helped in the study design and revised the paper; MCA designed the study, supervised field activities and revised the manuscript. All authors have read and approved the content of the manuscript.

Acknowledgements

We thank the President's Malaria Initiative via the Bureau for Global Health, US Agency for International Development, Benin National Malaria Control Programme, and the mosquito collectors.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ³Université Agricole de Kétou, Kétou, Benin. ⁴National Malaria Control Programme, Cotonou, Benin.

Received: 31 July 2014 Accepted: 3 November 2014

Published: 21 November 2014

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**:586–593.
2. West PA, Protopopoff N, Rowland MW, Kirby MJ, Oxborough RM, Mosha FW, Malima R, Kleinschmidt I: Evaluation of a national universal coverage campaign of long-lasting insecticidal nets in a rural district in north-west Tanzania. *Malar J* 2012, **11**:273.
3. Sovi A, Azondékon R, Aikpon RY, Govoétchan R, Tokponnon F, Agossa F, Salako AS, Oké-Agbo F, Aholoukpè B, Okè M, Gbénou D, Massougboji A, Akogbeto M: Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasit Vectors* 2013, **6**:319.
4. Tokponnon FT, Aholoukpè B, Denon EY, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Gazard DK, Akogbeto MC: Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. *Parasit Vectors* 2013, **6**:265.
5. Lengeler C: Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, **2**:CD000363.
6. WHO: World Malaria Report 2012. Geneva: World Health Organization; 2012 [http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/].
7. WHO: World Malaria Report 2013. Geneva: World Health Organization; 2013 [http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/].
8. WHO: WHO / World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
9. Killeen GF, Okumu FO, N'Guessan R, Coosemans M, Adeogun A, Awolola S, Etang J, Dabiré RK, Corbel V: The importance of considering community-level effects when selecting insecticidal malaria vector products. *Parasit Vectors* 2011, **4**:160.
10. Marsh K: Research priorities for malaria elimination. *Lancet* 2010, **376**:1626–1627.
11. Munga S, Yakob L, Mushinzimana E, Zhou G, Ouna T, Minakawa N, Githeko A, Yan G: Land use and land cover changes and spatiotemporal dynamics of Anopheline larval habitats during a four-year period in a highland community of Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:1079–1084.
12. Gnanguenon V, Azondékon R, Oke-Agbo F, Beach R, Akogbeto MC: Durability assessment results suggest a serviceable life of two, rather than three, years for the current long-lasting insecticidal (mosquito) net (LLIN) intervention in Benin. *BMC Infect Dis* 2014, **14**:69.
13. MDAEP, INSAE, Bénin ICF International: Enquête Démographique et de Santé (EDS-IV) 2011–2012. Cotonou: Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique (INSAE) - Ministère du Développement, de l'Analyse Économique et de la Prospective, Gouvernement du Bénin; 2013.
14. Gillies MT, De Meillon B: *The Anophelinae of Africa South of the Sahara*. Johannesburg: Publication of the South African Institute for Medical Research; 1968.
15. Gillies MT, Coetzee M: A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara. *Publ South Afri Inst Med Res* 1987, **55**:143.
16. Detinova T, Gillies M: Observations on the determination of the age composition and epidemiological importance of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. *Bull World Health Organ* 1964, **30**:23–28.
17. Wirtz R, Ballou W, Schneider I, Chedid L, Gross M, Young J, Hollingdale M, Diggs C, Hockmeyer W: *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of circumsporozoite protein constructs produced in *Escherichia coli*. *Exp Parasitol* 1987, **63**:166–172.
18. Fanello C, Della TA: Distribution du gène Kdr dans les formes chromosomiques et moléculaires des *Anopheles gambiae* s.s en Afrique Occidentale. Geneva: Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR; 2001.
19. Simpson EH: Measurement of diversity. *Nature* 1949, **163**:688–688.
20. Kenneth R: *Epidemiology An Introduction*. Oxford: Oxford University Press; 2012.
21. Nicolas PJ: *Statistics for Epidemiology*. Danvers: Chapman and Hall/CRC; 2003.
22. Lambert P-W: Zero-inflated Poisson regression, with an application to defects in Manufacturing. *Technometrics* 1992, **34**:1–14.
23. Lingenfelter A, Rydzanicz K, Kaiser A, Becker N: Mosquito fauna and perspectives for integrated control of urban vector-mosquito populations in southern Benin (West Africa). *Ann Agric Environ Med* 2010, **17**:49–57.
24. Onyabe Y, Conn E: Population genetic structure of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* across Nigeria suggests range expansion. *Mol Ecol* 2003, **10**:2577–2591.
25. Wondji C, Simard M, Fontenille D: Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol* 2002, **11**:11–19.

26. Dabiré R, Diabaté A, Namountougou M, Toé K, Ouari A, Kengne P, Bass C, Baldet T: **Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa).** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, **103**:1113–1120.
27. Akogbeto M: *Etude des aspects épidémiologiques du paludisme côtier lagunaire au Bénin*. PhD thesis. Paris: Université de Paris XI; 1992.
28. Akogbeto M: **Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake.** *Ann Société Belge Médecine Trop* 1995, **75**:219–227.
29. FAO: *The State of Food Insecurity in the World*. Roma: Food and Agriculture Organization; 2002.
30. Baudoin M-A, Sanchez AC, Fandohan B: **Small scale farmers' vulnerability to climatic changes in southern Benin: the importance of farmers' perceptions of existing institutions.** *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 2013, **9**:1–13.
31. Yadouleton A, Asidi A, Djouaka R, Braïma J, Agossou C, Akogbeto M: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin.** *Malar J* 2009, **8**:103.
32. Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, Dabiré R, Aikpon R, Boko M, Glitho I, Akogbeto M: **Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:60.
33. Fontenille D, Cohuet A, Awono-Ambene P, Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, Simard F: **Vecteurs de paludisme: du terrain à la génétique moléculaire.** *Rev Epidemiologie Santé Publique* 2005, **53**:283–290.
34. Koudou BG, Adja AM, Matthys B, Doumbia M, Cisse G, Kone M, Tanner M, Utzinger J: **Pratiques agricoles et transmission du paludisme dans deux zones éco-épidémiologiques au centre de la Côte d'Ivoire.** *Bull Société Pathol Exot* 2007, **100**:124–126.
35. Yadouleton A, N'guessan R, Allagbé H, Asidi A, Boko M, Osse R, Padonou G, Kindé G, Akogbeto M: **The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:118.
36. Omukunda E, Githeko A, Ndong'a MF, Mushinzimana E, Atieli H, Wamae P: **Malaria vector population dynamics in highland and lowland regions of western Kenya.** *J Vector Borne Dis* 2013, **50**:85–92.
37. Terlouw DJ, Morgah K, Wolkon A, Dare A, Dorkenoo A, Eliades MJ, Eng JV, Sodahlon YK, Ter Kuile FO, Hawley WA: **Impact of mass distribution of free long-lasting insecticidal nets on childhood malaria morbidity: the Togo national integrated child health campaign.** *Malar J* 2010, **9**:199.

doi:10.1186/1475-2875-13-444

Cite this article as: Gnanguenon et al.: Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malaria Journal* 2014 **13**:444.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

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

Virgile Gnanguenon^{1,2*}, Fiacre R Agossa^{1,2}, Kefilath Badirou^{1,2}, Renaud Govoetchan^{1,2}, Rodrigue Anagonou^{1,2}, Frédéric Oke-Agbo¹, Roseric Azondekon¹, Ramziath AgbanrinYoussof^{1,2}, Roseline Attolou^{1,2}, Filemon T Tokponnon⁴, Rock Aïkpon^{1,2}, Razaki Ossè^{1,3} and Martin C Akogbeto^{1,2}

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

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

²Faculté 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

Background

For malaria vector control intervention, Indoor Residual Spray and Insecticide Treated Net are so far the most effective tools used [1-3]. These two interventions are based on the use of different classes of insecticide.

Pyrethroid insecticides are considered most suitable for mosquito nets treatment due to their high insecticidal potency at low dosages and a relative safety for human contact and domestic handling [2]. They included: Lambda-cyhalothrin, Permethrin, Alpha-cypermethrin, Etofenprox, and Cyfluthrin [2]. They have a quick knock-down and lethal effect on *Anopheles gambiae sensu lato* (*An. gambiae s.l.*) mosquitoes at low concentrations [3]. The majority of long-lasting insecticide-treated nets freely distributed in all localities in Benin through mass-distribution campaigns and routine distributions since 2007 were Deltamethrin and Permethrin based [4-6].

Bendiocarb was previously used for indoor residual spray in Oueme province in Benin from 2008 to 2010 (6 spray cycles) and showed a significant reduction in malaria transmission [7,8]. It is also used for indoor residual spray in Atacora province each year with one spray cycle per year since 2011 [9].

But the use of these vector control tools cannot be efficient if their use does not take into account the environmental factors associated with insecticide resistance before their implementation. Pyrethroids resistance was reported in several localities in southern Benin since 1999 [10-13] and represented also a threat for these interventions. In addition, the lack of baseline data before the implementation of vectors control intervention in an area needs to be addressed. For example, the National Malaria Control Program (NMCP) needs data on the dynamics of insecticide resistance in all the epidemiological patterns of the country, particularly a map on the entomological situation of Benin, to be used as a guide to the choice of vector control strategies. This study was developed in this framework. The study was conducted in eight randomly selected sites. The eight sites were selected in the main malaria eco-epidemiological areas of Benin where geography (climate, land, vegetation and agriculture practices) and malaria prevalence were different [14]. At each site, the level of vector resistance (Pyrethroids, Carbamates, and Organophosphates) and the resistance mechanisms (Kdr-west, Ace-1^R and metabolic resistance) involved were assessed. A mapping of the distribution of vector resistance and vector resistance mechanisms was done. Data gathered in the different malaria eco-epidemiological areas will guide malaria vectors resistance strategies in Benin.

Methods

Study design

The study was conducted in each rainy season (April-July; October-November) in 2012, 2013, and 2014 in

eight districts randomly selected from different geo-epidemiological regions in Benin [14]. The selected districts were:

- Adjohoun, Allada, Pobe, and Ouidah in wet savanna and degraded forest regions, southern Benin [15-18];
- Kandi and Malanville in dry savanna region, northern Benin [19,20];
- Dassa in the central part, and Parakou in the north southern part, are located between the dry and wet savanna region (transition zone) [21,22].

Atacora region, where indoor residual spray was ongoing, was excluded due to the specific vector resistance monitoring system implemented in this area, that was well documented [9,23].

Anopheles gambiae s.l. larvae were collected based on dipping method in four villages randomly selected in each district, then bred to adult phase (They were pooled together to have sufficient adult of the same physiological age by district) and tested with different classes of insecticides (with around 150 mosquitoes tested/insecticide/location) using WHO susceptibility (tube/cylinder) tests guidelines [14]. Mosquitoes tested were subjected to specific polymerase chain reaction treatments for species identification, and determination of resistance mechanism (Kdr-west and Ace-1^R). Geographic information system was then used to show the distribution of phenotypic and genotypic resistances with Arcgis 10.1 software.

Study areas

Adjohoun

Adjohoun (6°43'12.76 "N and 2°29'19.68"E) is located in the center of Oueme County. It is under a subtropical climate with two rainy seasons (a long rainy season from April to July and a short one from September to November) and two dry seasons (a long dry season from December to March and a short from September to August). The annual average rainfall is 1122 mm [18] (Figure 1).

Allada

Allada (6°44'37.01"N and 2°8'13.32"E) is located in the north of Atlantique County. The climate is sub-equatorial with two rainy seasons and two dry seasons similar to those of Adjohoun. The annual average rainfall is about 800–1100 mm [16] (Figure 1).

Pobe

Pobe (7°49'58.83"N and 2°13'37.60"E) located in southeastern Benin in Plateau County and have a boundary with Nigeria. The climate is sub-equatorial with the same two rainy seasons and two dry seasons

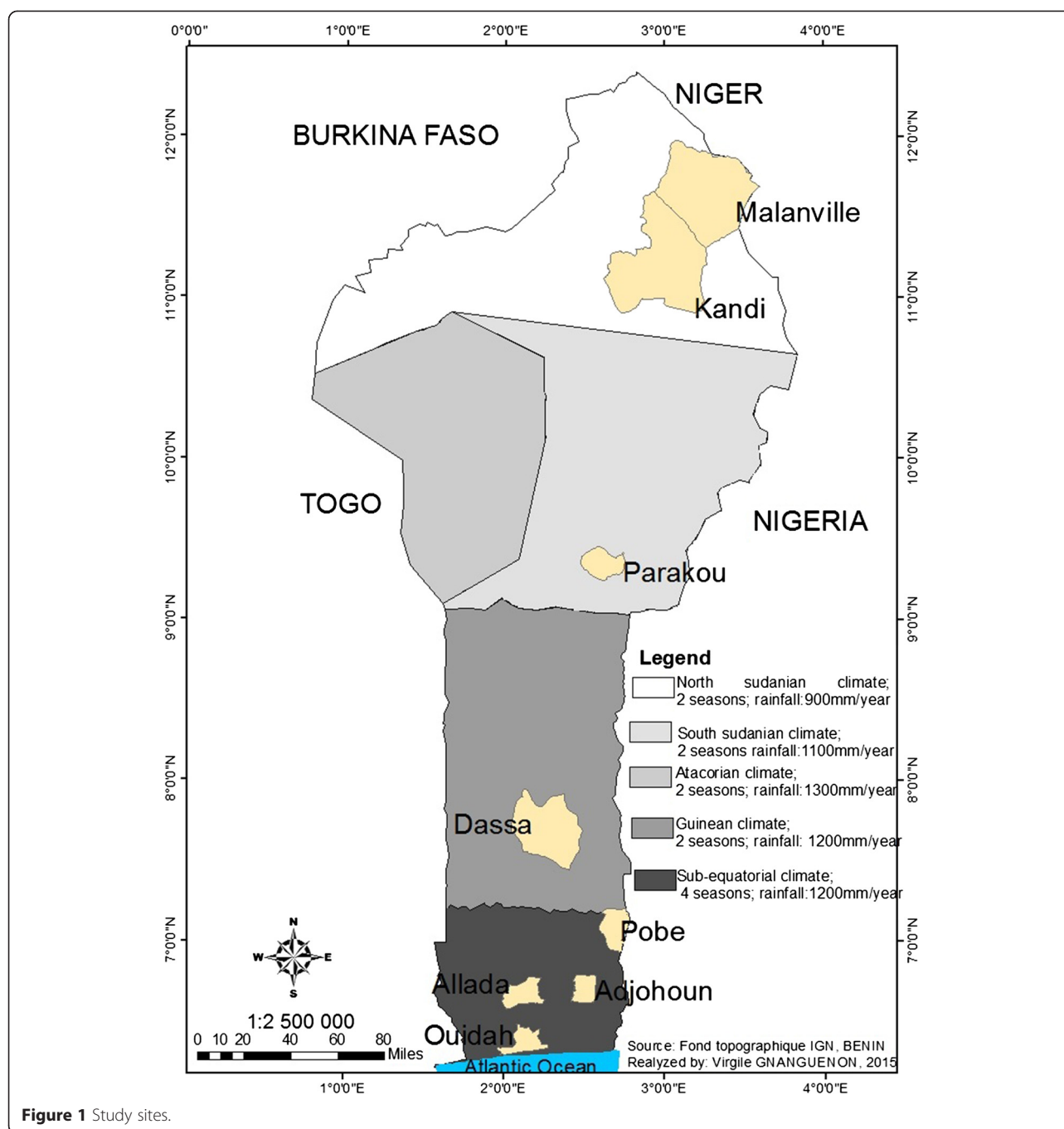


Figure 1 Study sites.

as above (characteristics of south Benin). The rainfall varies from 1100-1200 mm per year [17] (Figure 1).

Ouidah

Ouidah ($6^{\circ}19'14.48''\text{N}$ and $2^{\circ}4'0.25''\text{E}$) belongs to a geographic area called “wet zone”. The climate is sub-equatorial, characterized by two rainy seasons and two dry seasons. The rainfall varies from 950-1150 mm per year [15] (Figure 1).

Dassa

Dassa-Zoume ($7^{\circ}49'58.83''\text{N}$ and $2^{\circ}13'37.60''\text{E}$) is one of the six districts in Collines County. The climate is Guinean with two rainy seasons and two dry seasons. The highest rainfall is recorded between July and September. The average rainfall is around 1100 mm [21] (Figure 1).

Parakou

Regional capital of northern Benin, Parakou ($7^{\circ}49'58.83''\text{N}$ and $2^{\circ}13'37.60''\text{E}$) is located in Borgou County. The

climate is South Sudanian-characterized by a rainy season (May to October) and a dry season (November–April). The average annual rainfall is 1200 mm. The maximum occurs from July to September [22] (Figure 1).

Kandi

Kandi (11°4′58.91″N and 2°13′37.60″E) is located in the center of Alibori County. The climate is North Sudanian characterized by two distinct seasons: a rainy season from April to October and a dry season from November to March. The annual average rainfall varies considerably between 700 and 1400 mm [19] (Figure 1).

Malanville

Malanville (11°48′49.06″N and 3°22′58.08″E) is located in the extreme north of Benin in Alibori County. The climate of Malanville is North Sudanian. The average rainfall turns around 750 mm [20] (Figure 1).

Mosquito collections

Anopheles gambiae sensu lato larvae and pupae were collected from natural breeding sites of each district. Mosquito larvae and pupae collected were kept in separated labeled bottles related to each district, transported to the insectaria and maintained at a relative humidity of $72 \pm 5\%$ and a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$. *An. gambiae s.l.* larvae were identified and separated for rearing. Adults were provided with 10% sugar solution. Unfed *An. gambiae s.l.* adults, female aged from 2 to 5 days from each district were pooled together to have a sizable mosquito sample ($n = 150$).

Insecticide susceptibility tests

Mosquitoes were assessed using World Health Organization discriminating dosages with four insecticides: 0.1% Deltamethrin, 0.1% Bendiocarb, 0.25% Pirimiphos méthyl, and 1% Fenitrothion. 20–25 unfed females were exposed to the diagnostic doses of insecticide treated papers for 60 min at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80% relative humidity. Exposed mosquitoes were introduced into each tube and inspected at different time intervals (10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes), ‘Immediate mortality’ (0.1% Bendiocarb, 0.25% Pirimiphos méthyl, and 1% Fenitrothion) and “knocked-down” (for 0.1% Deltamethrin) were recorded. After exposure, mosquitoes were kept in observation tubes and provided with a 10% honey solution. Mosquitoes exposed to untreated papers were used as control. Mortalities were recorded after 24 hours and susceptibility status of mosquito populations was graded according to the World Health Organization protocol [24]. Dead and surviving mosquitoes from assessments were used for molecular analysis.

Species identification and PCR detection of Knock-down resistance (Kdr) and insensitive acetylcholinesterase-1 (Ace-1^R) mutations

Around 48 mosquitoes by site were randomly selected from live and dead mosquitoes and subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) for species identification [25]. DNA extracted from specimens of *Anopheles gambiae sensu stricto* were subjected to PCR for identification of ‘*Anopheles coluzzii*’ and ‘*Anopheles gambiae*’ [26].

The Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism diagnostic test was used to detect the presence of L1014F mutation (Kdr) according to the method described by Martinez-Torres *et al.* [27] and G119S mutation (Ace-1^R) using the method describe by Weill *et al.* [28].

Biochemical analysis

Biochemical analysis was performed on 50 mosquitoes stored at 280 μC within 24 h from emergence from each district. These mosquito samples were not exposed to any insecticides prior to biochemical assays. Levels of activity of mixed function oxidases (MFO), non-specific esterases (α and β -esterases), and glutathione S-transferases (GST) were compared in susceptible *An. gambiae* Kisumu and the field populations from each district.

Oxydase activity was assessed using heme-peroxidase assay to identify the elevation in the amount of heme according to the method described by Brogdon *et al.* [29]. Non-specific esterase activity was measured using a-naphtol acetate and b-naphtol acetate and final concentrations were determined at 550 nm [30]. Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured in mosquitoes using 200 ml of GSH/CDNB working solution added to each replicate of mosquito homogenate. The kinetic reaction was read at 340 nm immediately for 5 minutes [30].

Data analysis

World Health Organization criteria [24] were used to determine resistance status of mosquito population as follows:

Mortality rate is > 98%: susceptible mosquito population;

Mortality rates ranged between 90 – 98%: suspected resistance in the mosquito population;

Mortality rates < 90%: resistant mosquito population to the insecticide.

Knock-down and Immediate mortality were very low at 10 minutes and were then analyzed from 15 minutes. Mortality rates of *An. gambiae* populations were compared using Fisher’s exact test. Allelic frequencies of L1014F mutation and G119S mutation were analyzed to assess variability of mutation frequencies across

populations. Only Deltamethrin, Knock-down and Ace-1^R resistance data were analyzed for Ouidah due to several unsuccessful mosquito larvae collections at this site.

All statistical analysis was performed using R 2.15 software.

Results

Effect of Deltamethrin on mosquitoes

The knock-down effect of Deltamethrin on mosquitoes tested was very low (Figure 2). After 15 minutes, the proportion of mosquitoes knocked-down was between 0 and 16% versus 86% for the negative control Kisumu. The effect of Deltamethrin on the different populations after 15 minutes of exposure was similar ($p > 0.05$). The knock-down effect after 30 minutes of exposure to Deltamethrin varied from 0 to 60% but with a significantly low effect on populations of mosquitoes Parakou, Kandi and Malanville compared to other sites ($P < 0.05$). At 60 minutes exposure, the knock-down effect of Deltamethrin on mosquito populations tested was less than 80% versus 100% for the susceptible strain Kisumu (control). Parakou and Malanville showed the lowest Knock-down effects (12–19%) after an hour of exposure.

Twenty-four hours post-exposure (Figure 3), the highest mortality rate (100%) was observed with mosquito population from Ouidah (versus 100% for Kisumu), suggesting a full susceptibility of this population to Deltamethrin (Figure 3). A suspected resistance to Deltamethrin of mosquito populations from Pobe and Parakou was observed with respective mortalities of 91 and 97%. In Malanville, Kandi, Dassa, Adjohoun and Allada mortalities ranged between 14 and 87%, showing that vectors from these sites were resistant to Deltamethrin.

Effect of Bendiocarb on mosquitoes

After 15 min, the immediate mortalities induced by Bendiocarb on different population of mosquitoes varied between 0 and 27%. A significant difference was observed

between the immediate mortalities induced by Bendiocarb on mosquitoes from Pobè, Kandi and Malanville and those of Parakou, Allada, Dassa and Adjohoun ($p < 0.05$). The proportion of dead mosquitoes after 30 minutes of exposure to Bendiocarb is from 3 to 93%. After 60 minutes of exposure, approximately 80% of tested mosquitoes are dead except Parakou, Dassa and Adjohoun where the observed mortality is significantly lower (33–77%) (Figure 4).

Mortality rates observed after 24 hours in Pobè, Dassa, Allada, Malanville and Adjohoun exceeded 98% (Figure 5) versus 100% for Kisumu. At Kandi and Parakou the observed mortality rates were respectively 92.93% [86.12 to 96.53] and 89.53% [81.88 to 94.24]. This shows a reduced susceptibility in mosquito of Kandi and resistance in mosquito of Parakou (Figure 5). These results suggest the emergence of resistance to Bendiocarb from the north of Benin (Figure 5).

Effect of Pyrimiphos methyl on mosquitoes

The immediate mortalities induced by Pirimiphosmethyl varied significantly between different mosquito populations tested ($p < 0.05$) (Figure 6). It is after thirteen minutes that the effect of Pirimiphos methyl was more perceptible on mosquitoes (Figure 6). The observed immediate mortalities range from 24–95% in Allada, Parakou, Kandi and Malanville. But, in Pobè, Adjohoun and Allada, the majority of mosquitoes were still alive (Figure 6). After an hour of exposure, immediate mortality increased in all sites (43–100%) except Pobè and Adjohoun where mortality is almost zero (Figure 6).

Mortalities noted after 24 hours of observation were 100% suggesting a complete susceptibility of all mosquito populations tested to Pirimiphos methyl (Figure 7).

Fenitrothion effect on mosquitoes

The effect of Fenitrothion on mosquitoes tested was low and similar between mosquito populations during exposure (Table 1). After 15 and 30 minutes of exposure, the

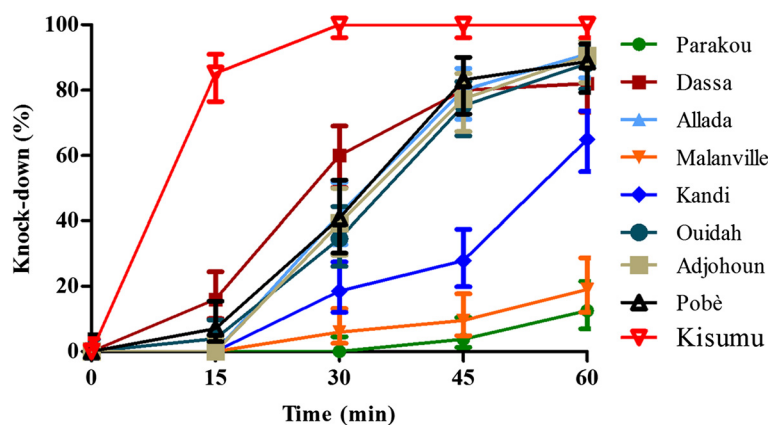


Figure 2 Knock-down rates of mosquitoes due to exposure to Deltamethrin.

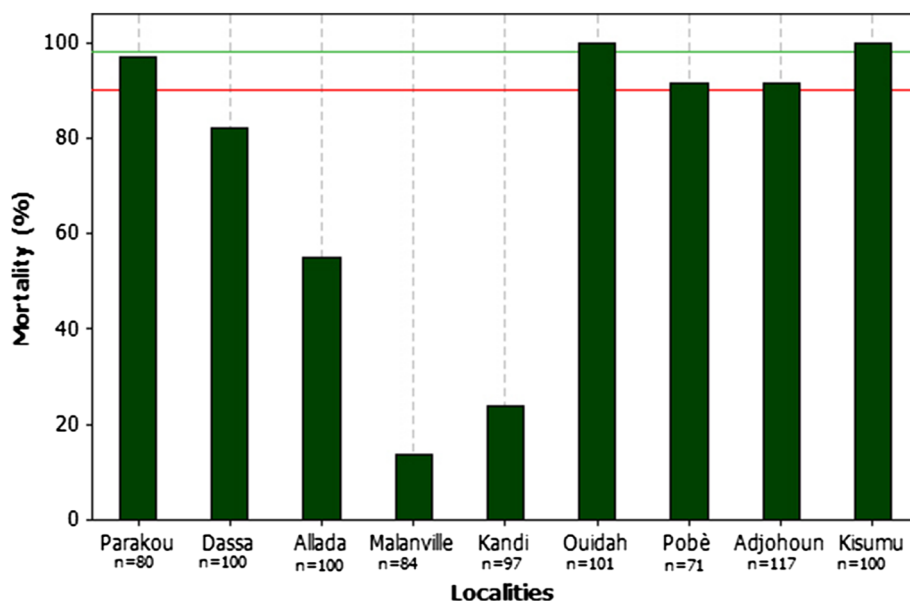


Figure 3 Observed mortalities with Deltamethrin.

observed immediate mortalities were almost null (0 to 2.40%). After 45 minutes, the immediate effect of Fenitrothion was more evident on mosquito population from Malanville (25.61% [17.40 to 36.00]) and Allada (23% [32, 15 to 15.84]) versus 100% from Kisumu. At 60 minutes of exposure, immediate mortalities increased to 75% in Malanville, Kandi, Parakou, and Dassa Allada. But, in Pobè and Adjohoun immediate mortalities remained zero.

After 24 hours of observation, mortalities varied from 98 to 100% suggesting that all vector populations tested were susceptible to Fenitrothion (Table 1).

In summary, Deltamethrin resistance was widely distributed throughout the country (Figure 8). A suspected resistance to Bendiocarb was observed from the northern part of the country while a full susceptibility was observed in the south (Figure 8). A full susceptibility of vector

populations to Pirimiphos methyl and Fenitrothion was also from south to north (Figure 8).

Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae*

Data presented in Table 2 shows the distribution of Knock-down resistance among *An. gambiae* complex species (*An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. coluzzi*, and *An. melas*). *An. gambiae*, *An. arabiensis*, and *An. coluzzi* were identified at Allada, Dassa, Parakou, Malanville, and Kandi but at Ouidah, *An. melas* was found instead of *An. arabiensis* (Table 2). Knock-down resistance frequencies were high (78–93%) in all species and at all sites. No significant difference was observed when comparing Kdr frequency between *An. gambiae*, *An. Arabiensis*, *An. coluzzi*,

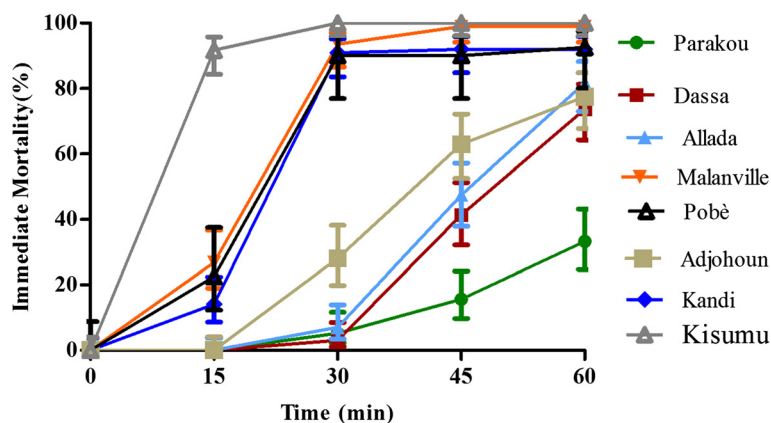


Figure 4 Immediate mortalities observed during mosquitoes exposure to Bendiocarb.

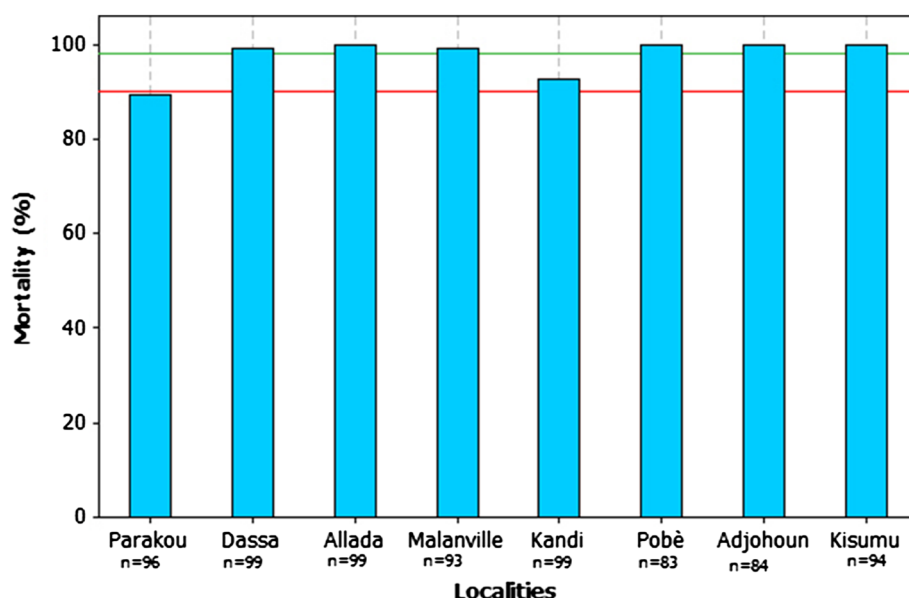


Figure 5 Observed mortalities with Bendiocarb.

and *An. melas* ($p > 0.05$). RR and RS genotypes of Kdr were found in both dead and survivors but no SS was found.

Insensitive acetylcholinesterase-1 mutation (Ace-1^R) was also identified at Kandi and Parakou at very low frequency (1%). At the other localities this mutation was absent with a null frequency (Table 3). It was not detected in *An. coluzzii*, *An. arabiensis* and *An. melas* species but only in heterozygous form in four surviving *An. gambiae* species (three from Parakou and one from Kandi) that were previously identified with Knock-down resistance mutation (Table 3).

Biochemical assays showed significantly high enzymatic activities (MFO, NSE and GST) in some populations of mosquitoes. Figure 9 shows the average level of oxidase activity (MFO) in the different populations tested. The activity of cytochrome P450 was significantly higher

in Allada Parakou compared to Kisumu ($p < 0.05$) (Figure 9).

The activity of non-specific esterase (α and β esterase), was higher in mosquito populations from Kandi, Dassa Allada and Pobè compared to Kisumu ($p < 0.05$) (Figures 10 and 11).

High activities of the Glutathione-S-transferase were observed in the populations of Dassa Allada and Pobè compared to Kisumu ($p < 0.05$) (Figure 12).

The observed molecular and biochemical resistance mechanisms were mapped to show the distribution of these resistances (Figure 13).

Discussion

The present study updated data on vectors resistance to the insecticides currently used in vectors control strategies in

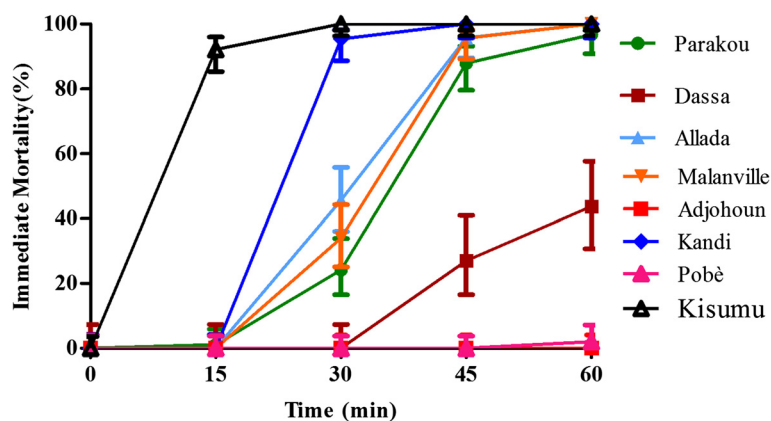


Figure 6 Immediate mortalities observed during mosquitoes exposure to Pyrimiphos methyl.

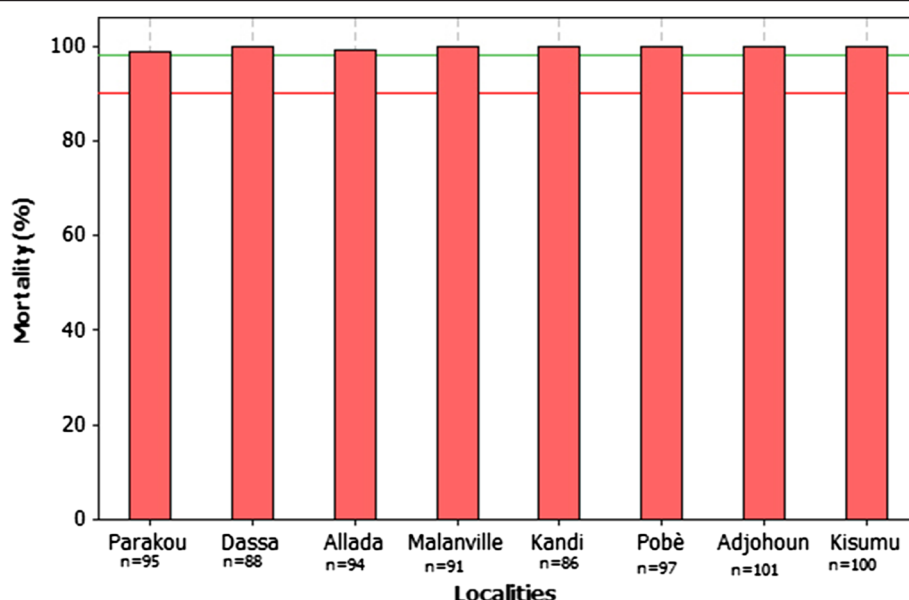


Figure 7 Mortalities observed with Pyrimiphos methyl.

Benin and shows their distribution. It showed a confirmed resistance to Deltamethrin (pyrethroid) throughout the country except in Ouidah, an emerging resistance to Bendiocarb (carbamates) in northern Benin, and a full susceptibility to Pirimiphos methyl and Fenitrothion (organophosphate) with a slow effect of Fenitrothion according to WHO thresholds. These thresholds have no epidemiological meaning because the field performance of the insecticides tested remain high [31-33]. However, they were more likely designed to be the triggers of preventive action by national malaria control program to define efficient strategies to manage insecticide resistance without waiting for indisputable proof of interventions failure [24].

Resistance levels to Deltamethrin varied between localities reflecting variation in resistance selection pressures on different vector populations. Deltamethrin and Permethrin

are the most found insecticides on mass-distributed insecticide-treated nets in Benin (from national campaign and routine distributions) with similar coverage rates between regions (74-94%) [34,35]. This should select resistance in the wild mosquito populations [36] and might explain the similar frequencies of Knock-down resistance (Kdr) between regions. In addition, there are also selection pressures generated by the use of the same class of insecticide in agriculture that represent the main activities of certain districts [37-39] and could explain the observed variations. The observed resistance level to Deltamethrin observed in southern Benin was similar to the results previously reported by Djègbè *et al.* [13] and Sovi *et al.* [40].

The Knock-down resistance gene was the main resistance mechanism found in all assessed mosquito populations. It was found at very high frequencies (0.80 in average) in *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* and

Table 1 Observed Knock-down rate and mortality with Fenitrothion

Localities	Number tested	Knock-down (%)					Mortality (%)
		0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	
Parakou	86	0[0,00-4,28]	0[0,00-4,28]	0[0,00-4,28]	0[0,00-4,28]	24[16,56-34,46]	100
Dassa	99	0[0,00-3,74]	0[0,00-3,74]	1,01[0,18-5,5]	3[1,04-8,53]	23[16,01-32,46]	100
Allada	90	0[0,00-3,70]	1[0,18-5,45]	1[0,18-5,45]	23[15,84-32,15]	61[69,98-51,2]	100
Malanville	82	0[0,00-4,48]	2[0,67-8,46]	2[0,67-8,46]	26[17,4-36]	76[65,31-83,62]	100
Kandi	100	0[0,00-3,70]	0[0,00-3,70]	0[0,00-3,70]	0[0,00-3,70]	44[34,67-53,77]	100
Adjohoun	95	0[0,00-3,89]	0[0,00-3,89]	0[0,00-3,89]	0[0,00-3,89]	0[0,00-03,89]	100
Pobè	93	0[0,00-3,97]	0[0,00-3,97]	0[0,00-3,97]	0[0,00-3,97]	0[0,00-03,97]	100
Kisumu	98	0[0,00-3,77]	82[72,83-88,05]	100[96,23-100]	100[96,23-100]	100[96,23-100]	100

min = minutes.

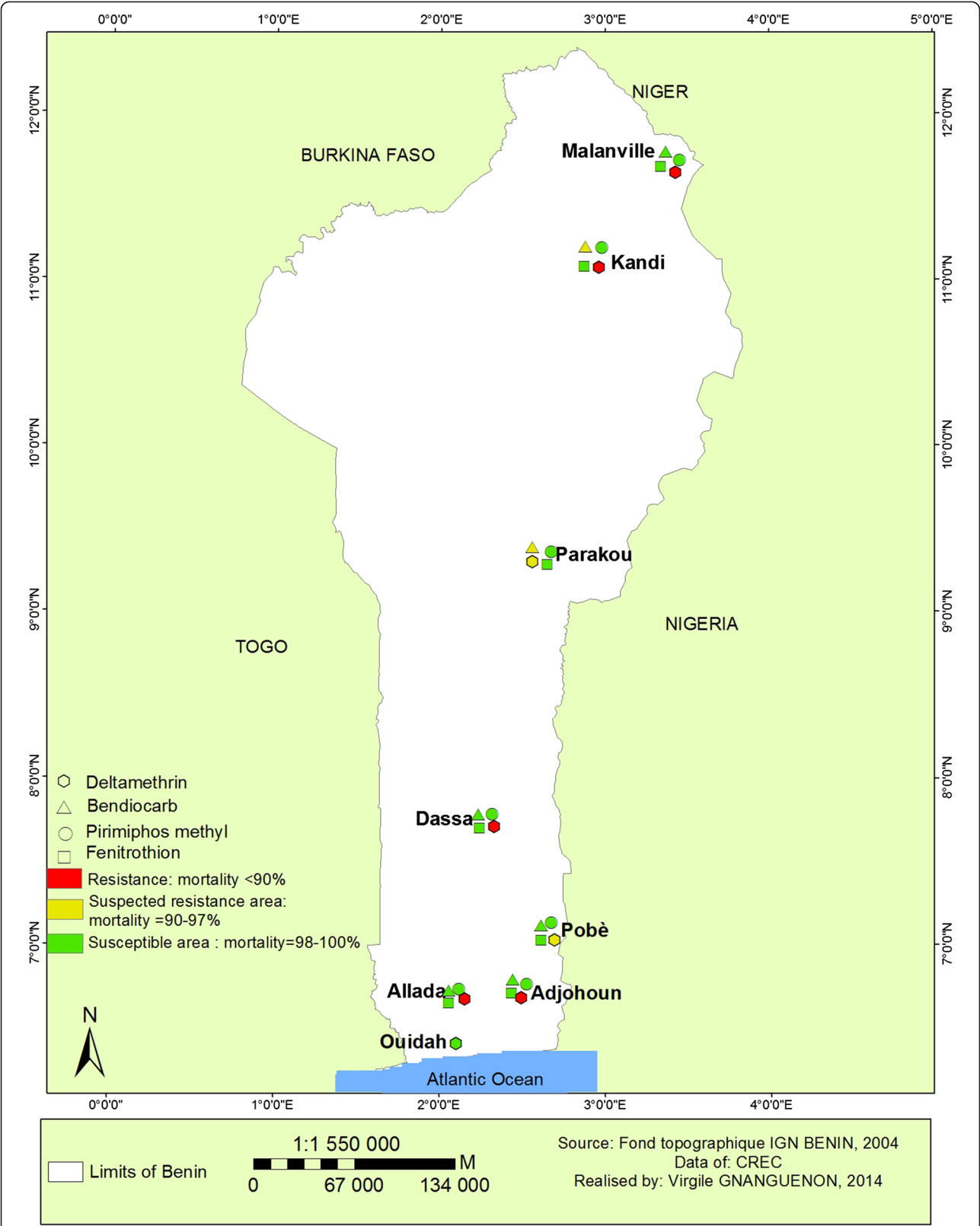


Figure 8 Distribution map of insecticides resistance in Benin.

Table 2 Distribution of Knock-down resistance (Kdr) frequencies between malaria vectors and sites

District	Species	Number	RR	RS	SS	F (Kdr)	OR (95% CI)	p-value
Allada	<i>An. gambiae</i>	14	11	3	0	0,89a	1.00	-
	<i>An. arabiensis</i>	7	5	2	0	0,86a	1.39 [0.20-9.44]	1.000
	<i>An. coluzzi</i>	20	13	7	0	0,83a	1.77 [0.41-7.53]	0.5072
Dassa	<i>An. gambiae</i>	21	17	4	0	0,90a	1.00	-
	<i>An. arabiensis</i>	8	5	3	0	0,81a	2.19 [0.43-11.12]	0.381
	<i>An. coluzzi</i>	18	15	3	0	0,92a	0.86 [0.18-4.14]	1.00
Parakou	<i>An. gambiae</i>	15	13	2	0	0,93a	1.00	-
	<i>An. arabiensis</i>	19	15	4	0	0,89a	1.65 [0.28-9.67]	0.6870
	<i>An. coluzzi</i>	14	10	4	0	0,86a	2.33 [0.39-13.87]	0.4154
Kandi	<i>An. gambiae</i>	22	16	6	0	0,86a	1.00	-
	<i>An. arabiensis</i>	14	12	2	0	0,93a	0.49 [0.09-2.60]	0.4705
	<i>An. coluzzi</i>	12	11	1	0	0,96a	0.27 [0.03-2.43]	0.4073
Malanville	<i>An. gambiae</i>	18	14	4	0	0,89a	1.00	-
	<i>An. arabiensis</i>	3	2	1	0	0,83a	1.6 [0.15-17.38]	0.5568
	<i>An. coluzzi</i>	27	19	7	1	0,83a	1.6 [0.45-5.65]	0.55141
Ouidah	<i>An. gambiae</i>	9	5	4	0	0,78a	1.00	-
	<i>An. melas</i>	27	19	8	0	0,85a	0.61 [0.16-2.33]	0.47922
	<i>An. coluzzi</i>	11	8	3	0	0,86a	0.55 [0.11-2.87]	0.67983

SS = homozygous susceptible; RS = hybrid resistant and susceptible; RR = homozygous resistant, F = Frequency.

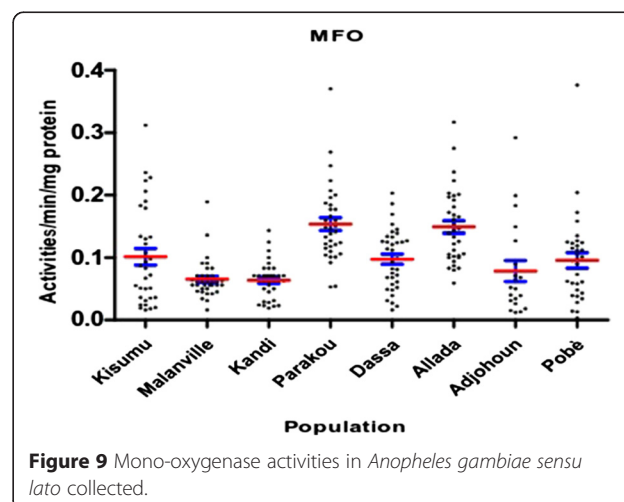
Table 3 Distribution of Ace-1R frequency between species

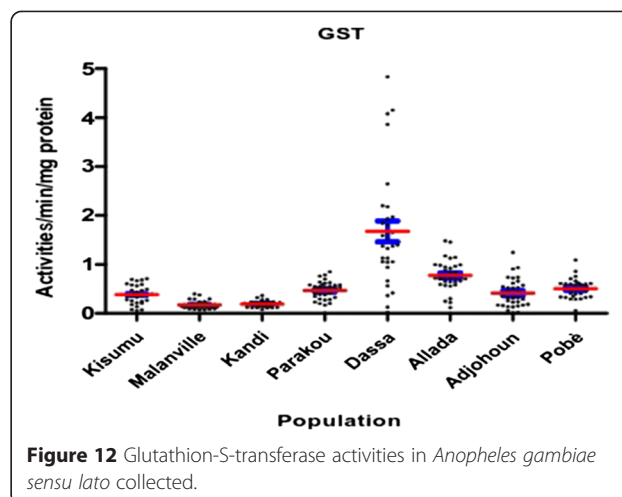
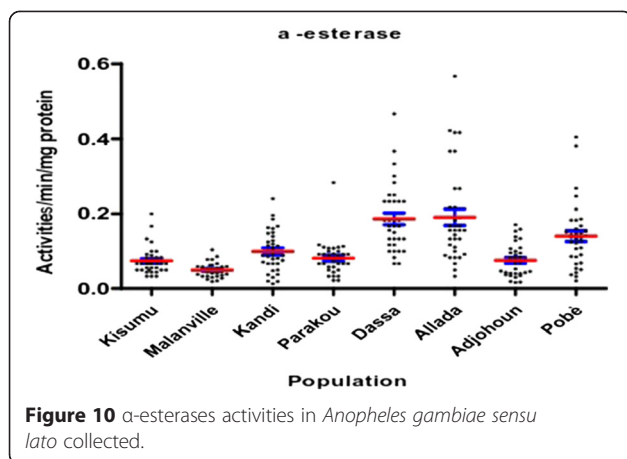
District	Species	Number	RR	RS	SS	Ace-1R	p-value
Allada	<i>An. gambiae</i>	14	0	0	14	0	P > 0.999
	<i>An. arabiensis</i>	7	0	0	7	0	
	<i>An. coluzzi</i>	20	0	0	20	0	
Dassa	<i>An. gambiae</i>	21	0	0	21	0	P > 0.999
	<i>An. arabiensis</i>	8	0	0	8	0	
	<i>An. coluzzi</i>	18	0	0	18	0	
Parakou	<i>An. gambiae</i>	15	0	3	12	0.1	0,22
	<i>An. arabiensis</i>	19	0	0	19	0	
	<i>An. coluzzi</i>	14	0	0	14	0	
Kandi	<i>An. gambiae</i>	22	0	1	21	0.002	P > 0.999
	<i>An. arabiensis</i>	14	0	0	14	0	
	<i>An. coluzzi</i>	12	0	0	12	0	
Malanville	<i>An. gambiae</i>	18	0	0	18	0	P > 0.999
	<i>An. arabiensis</i>	3	0	0	3	0	
	<i>An. coluzzi</i>	27	0	0	0	0	
Ouidah	<i>An. gambiae</i>	9	0	0	9	0	P > 0.999
	<i>An. melas</i>	27	0	0	27	0	
	<i>An. coluzzi</i>	11	0	0	11	0	

SS = homozygous susceptible; RS = hybrid resistant and susceptible; RR = homozygous resistant.

An. melas populations tested, and was widespread in the country. Their spread could be due to both vector bioecology and resistance selection pressure due to the intensive use of public health insecticides in agriculture [41].

In addition to pyrethroid resistance, we observed the emergence of carbamates resistance. This resistance to carbamates was previously reported in Benin by Djogbenou *et al.* [42] and Aikpon *et al.* [9]. It was associated with very low frequency of insensitive Ace-1 gene detected. This mutation was previously reported by Corbel *et al.* [11], Djogbénou *et al.* [43], Djenontin *et al.* [12], Yadouléton *et al.* [44] and by Aikpon *et al.* [9]. This early spread of





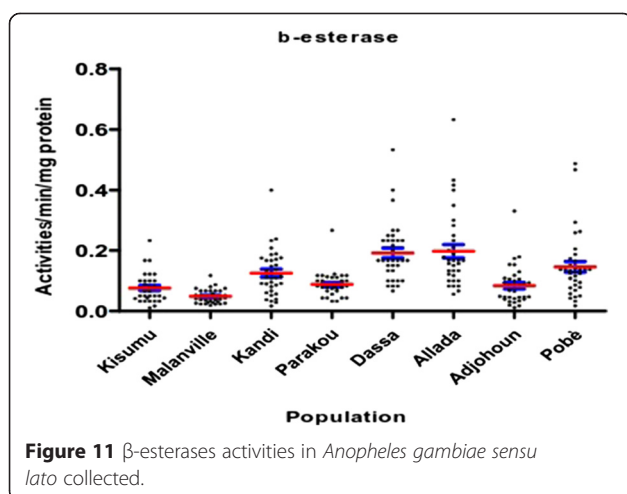
Ace-1^R mutation should be monitored closely. As the use of Bendiocarb in Indoor Residual Spray is part of a National Malaria Control Program strategy it could increase the frequency of the Ace-1^R gene and lead to a widespread of this resistance mutation. It is urgent for this purpose to follow-up monitoring for a better management of this resistance mechanism.

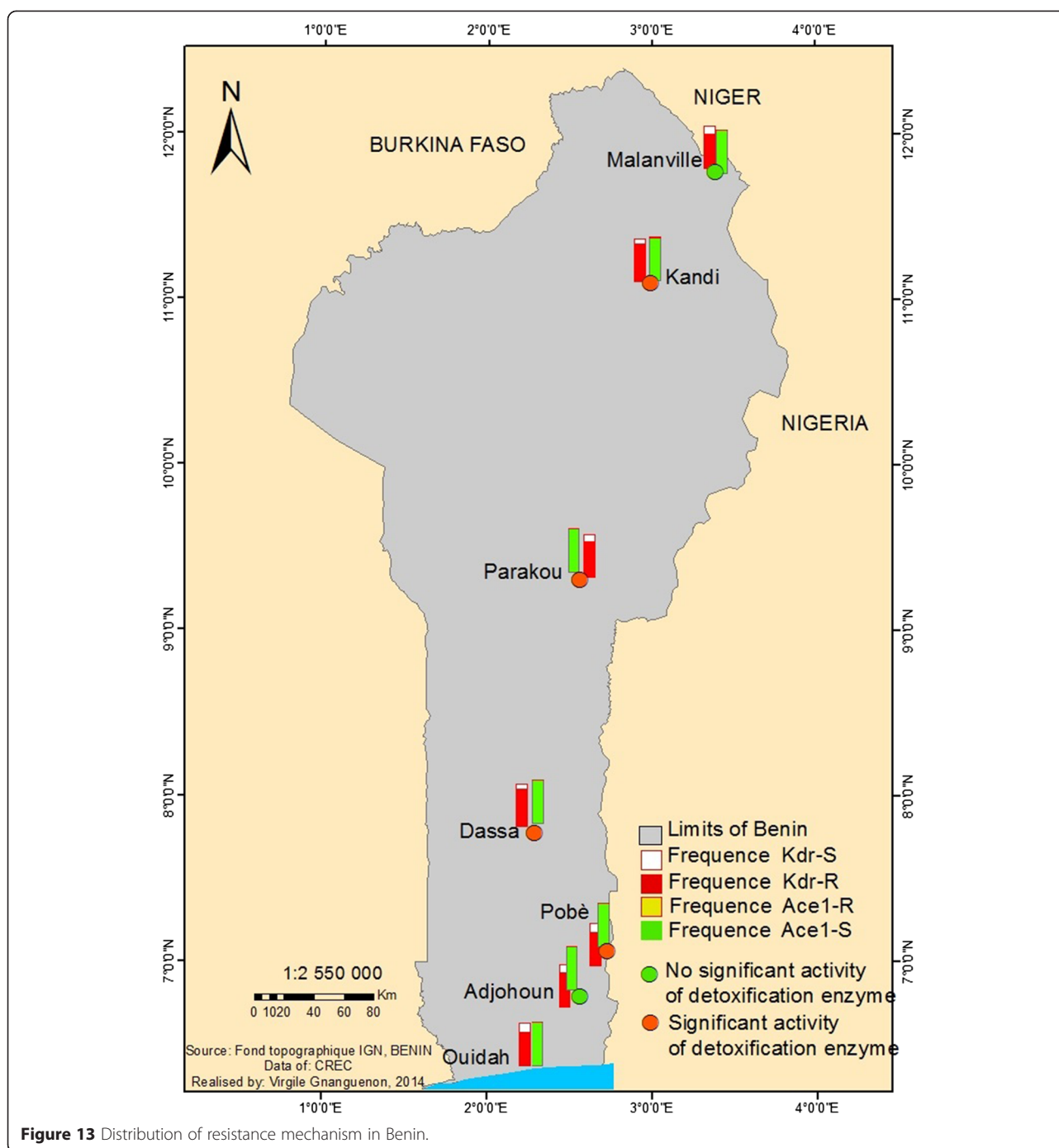
However, even if Kdr and Ace-1R genes confer a significant effect on vector resistance, they do not fully explain the observed vectors resistance level to insecticides because homozygous susceptible subjects (SS) survived to pyrethroids and carbamates exposure suggesting an involvement of other alternative mechanisms such as metabolic resistance mechanisms [45].

To assess the metabolic resistance mechanisms involved in the assessed vector populations, a biochemical approach was used. High activity of glutathione-s-transferase, cytochrome P450 and non-specific esterases were observed in some areas of southern and central Benin. These results were also previously reported in Atacora province [23] and in Cameroon [46]. These enzymes can confer resistance to

organophosphates, organochlorines and pyrethroids [47]. They were found with Kdr mutation in the same vector populations and could confer a cross resistance to pyrethroids. The over expression of these enzymes could also explain the slow effect of some organophosphates like Fenitrothion on mosquito populations in absence of insensitive acetylcholinesterase-1.

Ideally, when the resistance is detected for an insecticide, other insecticide categories must be used as part of a dynamic resistance management. However, very few insecticides are currently available for treatment of mosquito nets and indoor residual spray [48,49]. The insecticide change can also lead to higher costs of intervention programs reducing resistance managing options. For example, the change from Bendiocarb (8 US\$/house) to Fenitrothion (15.40 US\$/house) in indoor residual spray intervention will be 2 times more expensive [50]. In general, the use of insecticides does not create resistance itself, but selects a small proportion of subjects with a genetic mutation that allow them to resist and survive the effects of the insecticide. If this advantage is maintained by a constant use of the same insecticide, the resistant insects will reproduce and the genetic changes that confer resistance are transferred from parents to offspring so that eventually resistant subjects become numerous within the population [51,52]. The spread of resistant subjects will take more time if the resistance gene is rare or present at low frequency. It is also complex and depends on several genetic, biological and operational factors [51]. Biological factors affect the life cycle of the insect (the reproduction rate, the number of generation or offspring, the rate of migration and isolation, etc.), while genetic factors include intrinsic characteristics of the resistance genes (mono function of polygenic resistance, domination, genetic cost and the interaction of genes) [53]. Operational factors concern the insecticide treatment itself, including the method





and frequency of application, dosage and the residual activity of the insecticide and the level of insecticide coverage.

In theory, the resistance management of insecticide resistance should be performed by alternating vector control methods based on the use of insecticides and non-insecticidal methods. In practice, most non-insecticidal methods work well in experimental trials but become difficult when programs intensify their long-term use (operational) [54]. Then, operationally,

the simplest way of resistance management should involve insecticides management. The implementation of management strategies that may delay selection and spread of resistance to insecticides is therefore the main gateway for vector control programs. Another alternative is to find other insecticide formulations that will enhance the choice possibilities of insecticides.

This data will enable the National Malaria control programme to determine what insecticide to use and

where. They should implement a rapid pro-active response to avoid vectors resistance to Pirimiphosmethyl and delay the spread of Bendiocarb resistance. Alternative non-insecticidal methods should be used, wherever possible, to delay insecticide resistance.

Conclusion

This study shows the resistance profile of malaria vectors to different categories of insecticides used for vector control in Benin. A widespread malaria vector resistance to pyrethroid and an early emergence of carbamates resistance in the northern region of the country were observed. However, vectors were fully susceptible to organophosphates including Pirimiphos methyl and Fenitrothion but with a rapid susceptibility to the effect of Pirimiphos methyl.

This useful information could help policy-makers to better plan insecticide resistance management. The most convenient option is based on the appropriate use of insecticides. The moment of insecticide use, method of use (combined or single), the frequency and duration of use need to be planned accordingly to delay the spread of vectors resistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VG designed experiments, coordinated field activities, wrote and revised the paper; FRA, KB, RG, RA, RAZ, RAY, and RA participated in Laboratory activities, data collection and revised the paper; FO helped with statistical analysis and revised the paper; FTT, RA, RO helped in the study design and revised the paper; MA designed the study, supervised field activities and revised the manuscript. All authors have read and approved the content of the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank the President's Malaria Initiative via the Bureau for Global Health, US Agency for International Development, and Benin National Malaria Control Programme.

Author details

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

²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ³Université d'Agriculture de Kétou, Kétou, Benin.

⁴Programme National de Lutte contre le Paludisme, Cotonou, Benin.

Received: 14 January 2015 Accepted: 29 March 2015

Published online: 12 April 2015

References

- Curtis CF, Mnzava AE, Misra S, Rowland M. Malaria control: bednets or spraying? Summary of the presentations and the discussion. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93:460.
- Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol.* 2000;14:1–5.
- Chavasse DC, Yap HH, World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases, WHO Pesticide Evaluation Scheme. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization; 1997.
- PNLP. Campagne de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action aux ménages du Bénin. Cotonou: Ministère de la Santé; 2012. p. 11.
- PNLP-AFRICARE BENIN-CRS BENIN. Evaluation Finale Du Projet D'appui À La Lutte Contre Le Paludisme. Cotonou: Ministère de la Santé; 2011. p. 42.
- Azondekon R, Gnanguenon V, Oke-Agbo F, Houeвоessa S, Green M, Akogbeto M. A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin. *Parasit Vectors.* 2014;7:6.
- 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;85:586–93.
- Padonou GG, Sezonlin M, Ossè R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, et al. Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasit Vectors.* 2012;5:72.
- Aikpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aizoun N, Oké-Agbo F, et al. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors.* 2013;6:192.
- Akogbeto M, Yakoubou S. [Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa](in French). *Bull Soc Pathol Exot.* 1999;92:123–30.
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop.* 2007;101:207–16.
- Djénontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, Chabi J, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): a pre-intervention study. *Parasit Vectors.* 2010;3:83.
- Djègbè I, Bousari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, et al. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J.* 2011;10:261.
- Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Ossè R, Oke-Agbo F, Azondekon R, et al. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar J.* 2014;13:444.
- Capo-Chichi Y, Guidibi E. Monographie De La Commune De Ouidah. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–44.
- Nangbe F, Guidibi E. Monographie De La Commune D'allada. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–37.
- Gassi B, Guidibi E. Monographie De La Commune De Pobe. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–46.
- TCHEGNON P, GUIDIBI E. Monographie De La Commune D'adjohoun. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–60.
- Ahoyo Adjovi N, Guidibi E. Monographie De La Commune Kandi. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–40.
- Ahoyo Adjovi NR, Guidibi E. Monographie De La Commune De Malanville. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–48.
- CAPO-CHICHI Y, GUIDIBI E. Monographie De La Commune De Dassa. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–44.
- KORA O, GUIDIBI E. Monographie De La Commune De Parakou. Cotonou: Cabinet Afrique Conseil; 2006. p. 1–44.
- Aikpon R, Sèzonlin M, Ossè R, Akogbeto M. Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. *Parasit Vectors.* 2014;7:568.
- WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: World Health Organization; 2013.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:520.
- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 2001;10:19–23.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998;7:179–84.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie M, et al. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol.* 2004;13:1–7.
- Brogdon WC, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:605–13.
- WHO. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual) (archived) [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpc_mal_98_6/en/]

31. 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.
32. Sovi A, Azondékou 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.
33. Tokponnon FT, Ogouyèmi AH, Sissintou Y, Sovi A, Gnanguenon V, Cornélie S, et al. Impact of long-lasting, insecticidal nets on anaemia and prevalence of *Plasmodium falciparum* among children under five years in areas with highly resistant malaria vectors. *Malar J*. 2014;13:76.
34. Tokponnon FT, Aholoukpe B, Denon EY, Gnanguenon V, Bokossa A, N'guessan R, et al. Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. *Parasit Vectors*. 2013;6:265.
35. Akogbeto M, Nahum A. Impact des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine sur la transmission du paludisme dans un milieu côtier lagunaire, Bénin. *Bull Soc Pathol Exot*. 1996;89:291–8.
36. Aizoun N, Aikpon R, Akogbeto M. Evidence of increasing L1014F kdr mutation frequency in *Anopheles gambiae* s.l. pyrethroid resistant following a nationwide distribution of LLINs by the Beninese National Malaria Control Programme. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4:239–43.
37. Chouaibou MS, Chabi J, Bingham GV, Knox TB, N'Dri L, Kesse NB, et al. Increase in susceptibility to insecticides with aging of wild *Anopheles gambiae* mosquitoes from Côte d'Ivoire. *BMC Infect Dis*. 2012;12:214.
38. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde TR, Darriet F, et al. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:617–22.
39. Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo WM, Kera-Hinzoumbé C, Yangalbé-Kalnoné E, et al. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malar J*. 2009;8:299.
40. Sovi A, Djègbè I, Soumanou L, Tokponnon F, Gnanguenon V, Azondékou 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.
41. Ndiath MO, Sougoufara S, Gaye A, Mazenot C, Konate L, Faye O, et al. Resistance to DDT and pyrethroids and increased kdr mutation frequency in an. *Gambiae* after the implementation of permethrin-treated nets in Senegal. *PLoS One*. 2012;7:e31943.
42. Djogbénou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol*. 2011;25:256–67.
43. Djogbénou L, Dabiré R, Diabaté A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM, et al. Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:298.
44. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, et al. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J*. 2010;9:83.
45. Tia E, Akogbeto M, Koffi A, Toure M, Adja AM, Moussa K, et al. Pyrethroid and DDT resistance of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) in five agricultural ecosystems from Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*. 2006;99:278–82.
46. Nwane P, Etang J, Chouaibou M, Toto JC, Koffi A, Mimpfoundi R, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasit Vectors*. 2013;6:41.
47. Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Hemingway J. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol*. 2002;11:329–36.
48. WHOPE. WHO recommended insecticide products for treatment of mosquito nets for malaria vector control. Geneva: World Health Organization; 2014.
49. WHOPE. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. Geneva: World Health Organization; 2015.
50. Walker K. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Med Vet Entomol*. 2000;14:345–54.
51. IRAC. Prevention and management of insecticide resistance in vectors of public health importance. London: IRAC; 2011.
52. Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res*. 2002;79:41–7.
53. Corbel V, NGuess R. Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*, InTech. 2013.
54. WHO. Global strategic framework for integrated vector management [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpe_pvc_2004_10/en/]

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin

Roseric Azondekon^{1,2*}, Virgile Gnanguenon^{1,3}, Frederic Oke-Agbo¹, Speraud Houevoessa¹, Michael Green⁴ and Martin Akogbeto^{1,3}

Abstract

Background: Following a mass distribution of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in Benin, we used WHO guidelines to develop an assessment tool which is described in this report. It involved assessment of the three WHO indicators: survivorship, integrity and bio-efficacy.

Methods: To evaluate the assessment tool, we selected four communities, two in the Southern part of the country, and two in the North. One of the two assessment communities in each geographic setting had ready access to water and a higher reported frequency of washing LLINs. It was assumed that nets in communities with greater washing frequencies would show greater loss of durability. If the tool was sensitive enough to detect such differences, the field testing would confirm its suitability for general use in different settings in Benin. While durability indicators of survival and fabric integrity were quantified using standard WHO methodology, bio-efficacy was assessed using a 'new' alternative (to the WHO bioassay test), involving gas chromatography. Additionally, data management used current internet technology for 'real time' analysis at a central monitoring location.

Results: While no difference in survivorship was observed between sites with ready access to water for washing, both in the North and the South, there was a significant difference in integrity. In the South and in the North, nets from sites near water (Kessounou and Malanville) showed greater damage to integrity than did the nets from Allada and Kandi (sites far from water). As expected, LLIN integrity was significantly lower when a community was near water ($p < 0.01$). Bio-efficacy measurements, based on GC, were found to be so variable.

Conclusion: A rapid decrease of the LLINs fabric integrity was observed in areas near water for washing following the first 6 months post-distribution. Due to the way that the insecticide is incorporated into the LLIN fiber and its migration to the surface, confounding results were observed with the GC analysis suggesting that the WHO bio-efficacy method may also be similarly affected. The report of other assessments could help to better understand the durability of the LLINs.

Keywords: LLIN, Monitoring, Survivorship, Fabric integrity, Gas chromatography

* Correspondence: roseric_2000@yahoo.fr

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

²University of Massachusetts Amherst, Amherst, Massachusetts, USA

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

Background

Malaria remains a major health issue in Sub-Saharan Africa. In addition to taking a toll in terms of health, it consumes up to 40% of public health expenditure in poor countries, an estimated cost of US\$ 12 billion in lost Gross Domestic Product (GDP) every year in Africa [1]. In Benin, malaria accounts for 39.7% of health care issues. It is ranked top as one of the major diseases affecting communities [2].

Recently, it has been shown that the use of insecticide-treated materials can reduce malaria morbidity by 50 to 60% and malaria mortality by 20% [3-6]. WHO recommends that countries integrate Long Lasting Insecticide-treated Nets (LLINs) use into national plans against malaria. Among these treated materials, mosquito nets impregnated with pyrethroids are considered to be a powerful prevention tool whose mode of intervention is to break human contact with the vector [7]. LLINs provide both a physical and chemical barrier against malaria vectors [8,9]. Under epidemiological and socio-economic conditions of malaria-endemic countries, LLINs are presently the only usable method for individual and collective protection [10]. In recent years, funds allocated to the fight against malaria have significantly increased allowing considerable progress in the availability of LLINs [11,12]. At the individual level, they protect the user against mosquito bites, and at community level, they kill enough mosquitoes to reduce the number of bites in the community at large. This effect of insecticide treated nets (ITNs) on mosquito vectors may not occur unless the majority (at least 80%) of the targeted community uses them. The lethal effect of the insecticide is then reflected in younger populations of mosquitoes, and a drastic decrease of parasite transmission [13,14]. Therefore, large-scale LLINs have become a good vector control strategy in public health [15-17].

In July 2011, the Government of Benin with the support of the President's Malaria Initiative (PMI) conducted a mass distribution campaign of Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs). This mass distribution campaign comes to reinforce the Indoor Residual Spray (IRS) implemented in Benin since 2008. Overall, more than 4 million of LLINs were distributed across all the 77 communes of Benin. This mass distribution can significantly increase the national coverage and the use of LLINs in Benin. To maintain the impact of this vector control strategy, it is important to replace nets that do not meet WHO standards (low durability) [18,19] in a timely way such that ongoing impact is not affected.

To assess LLIN durability, WHO recommends [20] quantifying three indicators: survivorship, fabric integrity and bio-efficacy. This study describes a monitoring (tracking) tool implemented and field tested in Benin to assess the durability of the LLINs distributed. We

eventually plan to use the observed rate of change in the indicators to better describe the rate at which the impact of the intervention could change. Results are discussed to inform national malaria control policies but also to show the advantages and the limitations of the new methodological approach used in this study to assess LLINs bio-efficacy.

Methods

Study sites

Four arrondissements (sub districts) were selected, two in the South: Kessounou, in Oueme department and Allada, in Atlantic department, and two in the North: Kandil and Malanville, both in Alibori department (Figure 1). Residents of Kessounou, located on the Oueme River, have ready access to water for washing nets. In contrast, residents of Allada must carry water for washing to their homes. Similar criteria (easy access to washing site versus more difficult access) were applied to the selection of tracking sites in the North. Malanville is located near the Niger River, where water for washing nets is easily accessible. In contrast, Kandil, like Allada in the south, has a more remote water source.

To test the hypothesis that conditions on the ground affect indicators of LLIN useful life, tracking sites were intentionally selected because of 'differences' that would, most likely, change loss rates associated with the three indicators: (1) proximity to water for washing LLINs (expected to increase loss associated with durability and bio-efficacy by increasing the frequency of net washing); and (2) mosquito biting density/nuisance level (expected to increase loss associated with durability by increasing the frequency of LLIN use, and in turn LLIN wear and tear). Table 1 summarizes these differences.

Ethical consideration

This tracking study was planned under the Ministry of Health and approved by the National Ethics Committee for Health Research of the Ministry of Health of Benin. Community leaders were informed before the study and all gave consent before initiation. Written consent was also obtained from all participating households.

LLINs used in the study

In July 2011, around four millions of Olyset® nets, a polyethylene 150D LLIN (PE-150D) impregnated with permethrin (2%), were distributed throughout the country. The monitoring tool was used at the four sites to monitor the durability of the LLIN product distributed in order to provide information for future procurement according to WHO guidelines [20].

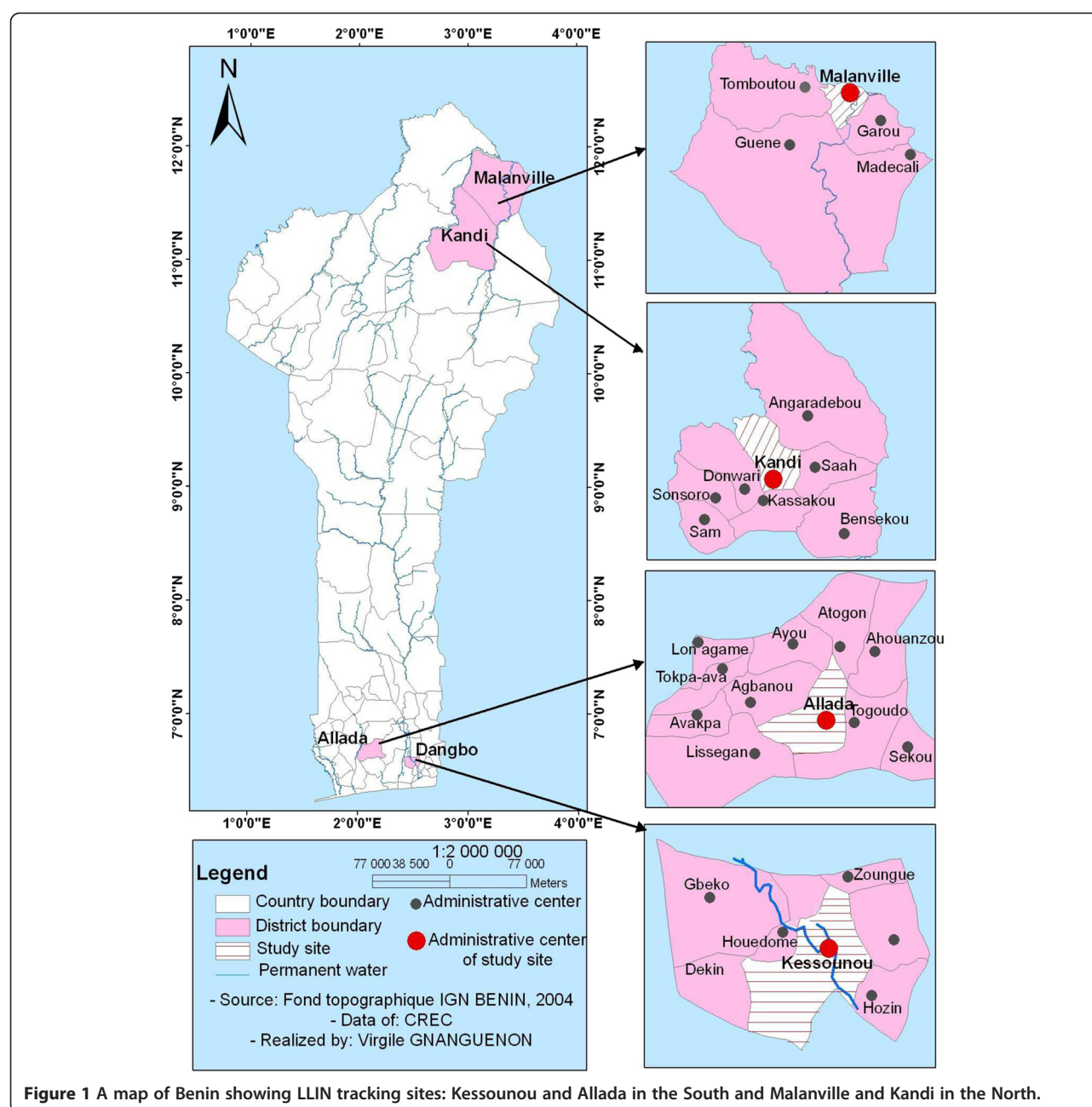


Figure 1 A map of Benin showing LLIN tracking sites: Kessounou and Allada in the South and Malanville and Kandi in the North.

Household census and LLINs distribution

Before the distribution campaign, a census of all households was carried out throughout the country including our study sites. The census and the distribution process was already described by the Ministry of Health [21]. The census recorded the name of the village, the name of the head of household, the household identification number, the number of adults and children living in the house and distributed a coupon, used to obtain the LLINs. The information was recorded in a master list. Net allocation to the household was based on the household size and the ratio one net for two persons (the national

policy for universal coverage). This distribution campaign covered an average of 90% of the households in the country.

LLINs distributed have labels sewn into them at factory that helps to distinguish them from those distributed during other campaigns or received from other sources.

Households sampling and bar coding of LLINs (T0)

WHO suggested estimating sample size on the basis of the attrition of the LLIN product. But in Benin, PE-150D product attrition rate is not known. Sample

Table 1 LLIN tracking sites: geographic location, climate, water for washing LLIN available/not available in the community; estimated frequency of washing*

<i>*Based on questionnaire administered at T₀</i>	
-Water not available; estimated percentage of residents who washed the LLIN > 5 times between T ₀ and T ₆ : ≤ 0.5% (n = 43/871)	Allada
	South Benin
	Climate: Guinean coastal 'upland' away from Oueme River
LLINs washed 'at site'; -estimated percentage of residents who washed the LLIN >5 times between T ₀ and T ₆ : 16% (n = 157/984)	Kandi 1
	North Benin
	Climate: Sudanian 'upland' away from Niger River
	Kessounou
	South Benin
	Climate: Guinean coastal community on Oueme River
	Malanville
	Geography: North Benin
	Climate: Sudanian community on Niger River

Approximately 500 households at each site (one LLIN/household) were tracked
*based on questionnaire administered to households at T₀.

size was then estimated following the WHO guidelines, which reported that a sample of 250 LLINs will allow detection of a 10% point difference if the best-performing product has an attrition rate of 10% and a 12 point difference with an attrition rate of 20% [20]. This sample size was doubled and 500 LLINs were selected by study sites to provide more precision in point difference detection. A subsample of 50 LLINs representing 10% of the total sample was randomly selected to measure insecticidal activity.

One LLIN per household was selected at each study site. Household selection at each of the four sites took into account the number of villages to ensure a representative sampling of the study site. For example, Kessounou is divided in five villages: Kodonou, Kessounou, Glehoue, Hetin-Sota and Glahounsa. Because the assessment was based on information from 500 LLINs, approximately 100 households (LLINs) were selected at random in each of the five villages. Table 2 summarizes the selection process. Households included in each village were randomly selected from the registration list of the distribution.

Two teams composed of two technicians and a local village health worker (VHW) visited each selected household. The head of household or an adult person acting on behalf of the head was interviewed. In certain occasions where no appropriate respondent was found in a particular household, the visit of the next home was scheduled. Approximately 500 households (500–501), where campaign net(s) had been hung (and were in use),

were selected at each tracking site. The teams identified the campaign LLIN (on the basis of the label sewn) in each selected household (or randomly chose one net, if multiple nets were present). They marked the LLIN for tracking assessment using a double marking system, an additional label with a unique study code plus an indelible ink mark. The team also recorded the GPS coordinates of each selected household for follow up visits. Google Earth 6.1 was used to map the study households. Written consent, to return at 6-monthly intervals, was obtained from the head of household or an adult living in the household.

Prospective survey and questionnaire

Households included for follow-ups were located by the name of the head of household and by GPS coordinates. Households that were not opened for inspection after two visits at the 6 months assessment visit were visited at the following assessment visits until they are recorded as unresponsive for three assessment visits and replaced.

A questionnaire was used to collect data from the head of household or an adult living in the household. The collected information included the status of each LLIN, the pattern of LLIN use and handling, observations on fabric integrity and the condition of the LLIN.

GPS coordinates and net codes were entered into the database. In the field, data were recorded on PDAs (Samsung Galaxy Tablets).

Measurement of indicators of LLINs durability

Survivorship

Survivorship at T₀ (enrollment visit) was 100% (attrition was 0%). After six months, each tracking household received a follow-up visit. A visual verification of the presence/absence of the coded LLIN was done and when the coded LLIN was not in the house, the assessment teams determined how it was lost. Households that were not opened for assessment were re-visited and if it was still closed it was targeted for re-visit in the next 6 months assessment visit.

LLINs fabric integrity

At the enrollment visit (T₀), none of the LLINs had holes (loss of fabric integrity was 0%). After 6 months, LLIN fabric integrity was assessed by a visual examination, without removal of coded nets from tracking households. LLIN physical integrity was assessed by verifying if the coded LLINs had holes or not and recorded the major holes category found on the LLINs as follow:

- smaller than a thumb (0.5–2 cm),
- larger than a thumb but smaller than a fist (2–10 cm) and
- larger than a fist but smaller than a head (10–25 cm)

Table 2 Distribution of tracking households by location

District	Sector	Code	Households selected (T ₀)	Households visited (T ₆)	% completion
Kessounou					
	Kodonou	KOD	100	98	98
	Kessounou	KES	100	99	99
	Glehoue	GLH	100	98	98
	Hetin-Sota	HS/HSZ	100	99	99
	Glahounsa	GLA	100	99	99
	Total		500	493	99
Allada					
	Alomey-Ahito	ALO/AHI	100	82	82
	Gbowele-Dodomey	GBO/DOD	100	84	84
	Dogoudo-Gbgamey	DOG/GBE	100	84	84
	Donou-Togoh	DON/TOG	100	80	80
	Tokpota-Zebou	TOK/ZEB	100	90	90
	Total		500	420	84
Kandi 1					
	Damadi	DAM	100	87	87
	Gansosso	GNS	100	85	85
	Keferi	KEF	100	95	95
	Pede	PED	100	86	86
	Gandokossikana	KSK	100	98	98
	Total		500	451	90
Malanville					
	Wouro-yesso	WOY	100	90	90
	Kotchi1	KOT	100	95	95
	Kotchi2	KCH	100	92	92
	Haro-banda	GAL	101	90	90
	Galiel	GLL	100	88	88
	Total		501	455	91
	TOTAL		2000	1819	91

Holes less than 0.5 cm were ignored. The 6 months follow up assessment only recorded the major categories (no holes size-4 were counted) of holes found in the LLINs but did not count them. Their natures, locations, evidence of repairs and the type of repair were also not recorded, and represented an important limitation of the 6 months assessment study.

Bio-efficacy assessment method using gas chromatography (GC)

WHO recommends the use of the cone bio-assay method [20] for monitoring bio-efficacy. However, problems related to rearing the large numbers of colonized, pyrethroid-susceptible vector females, needed to support

the application of this method to a statistically meaningful number of LLINs, hinder its correct use. An alternative method, the colorimetric test was developed for use with deltamethrin-treated LLINs [22,23]. Colorimetric assessment of LLIN bio-efficacy involves a two-step process. In step one, a magnetic sampling device (MSD) is used to sample the insecticide level on the LLIN surface (without removing or damaging the LLIN). The amount of insecticide on the MSD sample, a filter paper disc, is proportional to the amount of insecticide on the LLIN. Because sampling is standardized, results for different LLINs in the sampling frame are comparable. The second colorimetric assessment step uses colorimetric chemistry to estimate the amount of deltamethrin in the sample. Colorimetric results have been validated, by comparing

WHO cone test bio-assay results and colorimetric results for a series of LLINs with different surface levels of deltamethrin. Using the standard curve from this study, it is possible to interpret the colorimetric result in terms of whether or not an LLIN meets the minimum WHO 'threshold' for bio-efficacy (nets causing >80% mortality in a cone bio-assay test).

A conceptually similar 'chemical test' approach was used for tracking the bio-efficacy of the PE-150D LLINs in this assessment. The approach, based on gas chromatography (GC), was developed in order to circumvent the problems previously described that are associated with the WHO cone bio-assay method for bio-efficacy assessment. With PE-150D technology, the insecticide molecules migrate to the surface continuously replacing lost insecticide at the surface, where vectors are exposed to its effects. Based on this theory, the LLIN surface insecticide level sampling tool was modified to enable sampling of PE-150D LLINs without removal or replacement; samples were collected on position B (Figure 2). This was done as a precautionary measure since the owners may put blankets on top of position D of the net which may rub some of the insecticide off. Also, placement on Position A under the mattress may result in the removal of the insecticide. Therefore, the best position to collect the sample is position B in the middle of the net.

The net to be tested is hung and position B is identified and fixed on an embroidery hoop (4 inches diameter). A portion of lens paper is applied to the surface of a cap attached to a 50-mL plastic tube. The lens paper is rubbed along the inside diameter of the hoop for 10 rotations. The lens paper (25 mm diameter) is removed and inserted into a 1-mL syringe and compressed with the plunger. The reverse side of the net is repeated in the same manner (Figure 3). 100 µL of acetone containing 0.05 mg/mL of triphenyl phosphate as an internal standard is added to the syringe containing the 2 compressed portions of the lens paper. The syringe outlet is plugged to allow the paper to soak for 5 minutes. After

removal of the plug, the acetone is eluted via the syringe plunger into a small tube followed by another 100 µL of acetone. 1 µL of the eluant is injected into the GC (SRI 8610C GAS CHROMATOGRAPH) and the permethrin and internal standard is detected using flame ionization detection with hydrogen as the carrier gas. Sample response is compared with the response from a calibration standard and the amount of permethrin adhering to the lens paper is determined.

To estimate a bio-efficacy threshold for the GC method, 37 PED-150 LLINs (11 new nets and 26 nets that were in use in field for 3 to 4 months) were submitted to Cone test bioassay following WHO guidelines [24]. Interpretation of results (how GC test data are used to predict whether or not an LLIN would meet the minimum WHO bio-efficacy threshold) was done based on the comparison approach, outlined for the colorimetric method. A cut off value, established by comparing GC results with WHO cone test bio-assay results for the same LLINs, some of which met or exceeded the WHO minimum threshold for bio-efficacy and some which did not, was used to interpret the GC results. Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis, applied to the two data sets, GC and WHO cone bio-assay, was used to define the cut off value for nets that would be expected to meet the WHO cone test threshold. A minimum GC permethrin concentration was identified and used as a cut off value to estimate the percentage of nets at T0 and T6 that would not meet WHO minimum standards for bio-efficacy.

Quality of the data

The questionnaire form used in the study was created with ODK Collect 1.2.2 which allows easy data collection on Samsung Galaxy Tab 10.1 used as data terminals. At the end of each assessment visit day, data collected were directly uploaded to a cloud server, and retrieved at the end of the assessment for analysis.

Approximately 10% of the households were revisited independently to make sure that the survey was not biased.

Data analysis

Survivorship and attrition

The number of coded LLINs in the location, the proportion of the indicator and 95% confidence interval was reported.

The indicators were estimated as follow:

Survivorship:

$$\frac{\text{Total coded LLINs still present in the households selected}}{\text{Total coded LLINs at the enrollment (T}_0\text{)}} \times 100$$

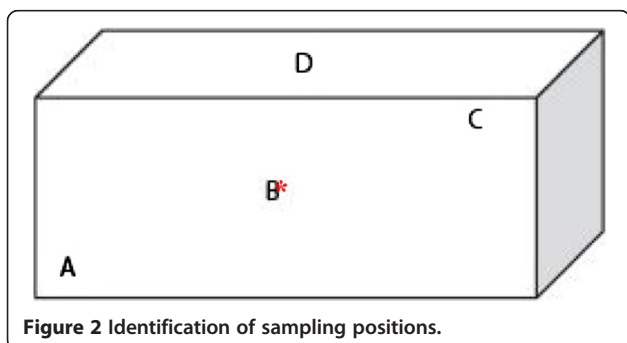


Figure 2 Identification of sampling positions.

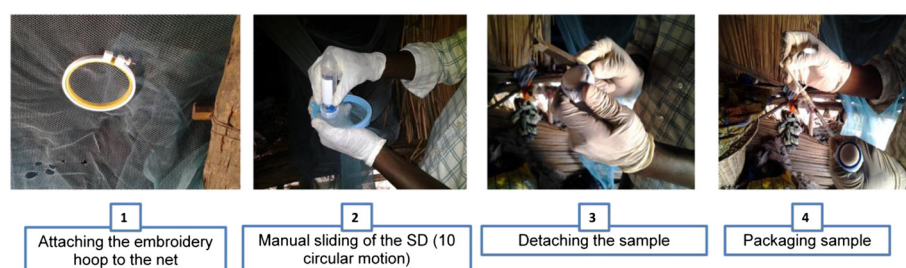


Figure 3 Sampling a mosquito net at Kessounou.

Attrition rate-1 for nets that have been destroyed or disposed of (Physical damage):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN reported as thrown out due to wear and tear in surveyed households}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

Attrition rate-2 for nets not available for sleeping under (Removal):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN reported as given away, stolen, sold or used in another location}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

Attrition rate-3 for nets re-purposed (Re-purposed):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN reported as being used for another purpose in surveyed households}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

The survivorship rate plus attrition rate-1, attrition rate-2 and attrition rate-3 was added up to 100%.

Two locations were reported to show significantly different survivorship at the 6 months assessment visit if the 95% confidence limits for survivorship do not overlap.

Fabric integrity

Physical integrity was analyzed for all the coded LLINs found and assessed in the households (and used for sleeping under). One WHO indicator was calculated at the 6 months assessment visit: the proportion of LLINs with holes.

Proportion of LLINs with any holes (with 95% confidence interval):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN with at least one hole of size 1-3}}{\text{Total number of coded LLINs found and assessed in surveyed household}} \times 100$$

Holes index of the LLINs was not calculated due to the limit of 6 months questionnaire that did not count each category of holes.

Bio-efficacy

For assessment of bio-efficacy, a sub-sample ($n = 50/\text{site}$) of LLINs was randomly selected and tested to determine the amount of insecticide on the surface of the net. The percentage of nets in the sample falling below a cut-off value for LLINs that cause $> 80\%$ mortality in a WHO cone bio-assay test [24] was used to quantify net loss associated with bio-efficacy at T6.

Factors associated with durability of the LLIN

Other factors that contributed to the LLINs durability, as measured by fabric integrity and insecticidal activity, were assessed by multivariate regression analysis. The contributing factors included the house

Table 3 LLIN tracking T₆ results by study sites: survivorship and attrition

		Kessounou	Allada	Kandi	Malanville
Survivorship					
Total coded LLINs (T ₀)	N	501	500	500	501
Visited households (T ₆)	N	493	420	451	455
People covered	N	1518	971	1201	1243
Average people per LLINs	N	3.08	2.31	2.66	2.73
LLINs missing	N	49	46	21	31
Survivorship	%	90	91	96	94
CI 95%		87.30-92.52	87.95-93.03	93.66-97.24	91.35-95.61
Attrition					
(LLINs missing)	N	(49)	(46)	(21)	(31)
'Physical damage' responses	N	10	5	1	3
'Removal' responses	N	35	41	20	28
'Re-purposed' responses	N	4	0	0	0
Attrition rate-1	(%)	2	1	0	1
CI 95%		01.09-03.63	00.43-02.32	00.04-01.12	00.20-01.75
Attrition rate-2	(%)	7	08	4	5
CI 95%		05.07-09.56	06.10-10.94	02.60-06.10	03.89-07.96
Attrition rate-3	(%)	1	0	0	0
CI 95%		00.31-02.03			
Total attrition	(%)	10	9	4	6
CI 95%		07.48-12.70	06.97-12.05	02.76-06.34	04.39-08.65

environment and behaviour related to net use, handling and washing, was derived from answers to the questionnaire used for the sub-sample of 50 LLINs selected for bio- efficacy in each location (around 200 LLINs in total).

Results

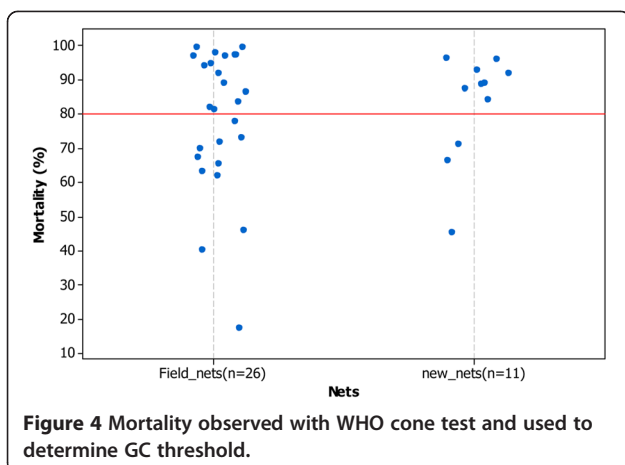
Survivorship and attrition

Table 3 summarizes T₆ results for survivorship and attrition. One hundred forty seven out of 2002 coded LLINs were no longer present in the households where they

Table 4 LLIN found with holes

		Kessounou	Allada	Kandi	Malanville
LLINs found and assessed	N	444	374	430	424
LLINs with any hole(s) (T ₆)	N	230	134	153	271
	%	52*	36	36	64**
	IC95	[45.04-56.54]	[28.96-40.92]	[31.05-40.31]	[59.14-68.49]
LLINs with size 1 holes	N	12	12	24	34
	%	5	9	16	13
	IC95	[2.72-8.94]	[4.71-15.12]	[10.32-22.44]	[08.85-17.09]
LLINs with size 2 holes	N	103	52	55	120
	%	45	39	36	44
	IC95	[38.24-51.46]	[30.51-47.6]	[28.36-44.09]	[38.27-50.42]
LLINs with size 3 holes	N	115	70	74	117
	%	50	52	48	43
	IC95	[43.36-56.65]	[43.44-60.94]	[40.22-56.58]	[37.19-49.30]

*p < 0.05, **p < 0.01.



were located at T0. That is, after 6 months, survivorship had dropped from 100% to between 90 and 96%, giving attrition of 10%, 9%, 4% and 6% percent respectively in Kessounou, Allada, Kandi and Malanville. Attrition rate-2 (LLINs removal) was the principal reason for LLINs lost; ranging from 4-8%. Attrition rate-1 was the second cause of LLINs lost; ranging from 0-2%. Attrition rate-3 was very low and only observed at Kessounou (Table 3). We did not assess factors associated with higher and lower survivorship loss rates, however, differences in survival between locations in the South and the North were significant ($p < 0.05$).

LLINs fabric integrity

At the 6 months assessment visit, LLINs found with holes (Table 4) was 36% at locations with less access to water for washing and 52-64% at locations with ready access to water ($p < 0.01$). The number of LLINs with size 1 holes was relatively low at all sites (when compared with the number of LLINs observed with size 2 and 3 holes).

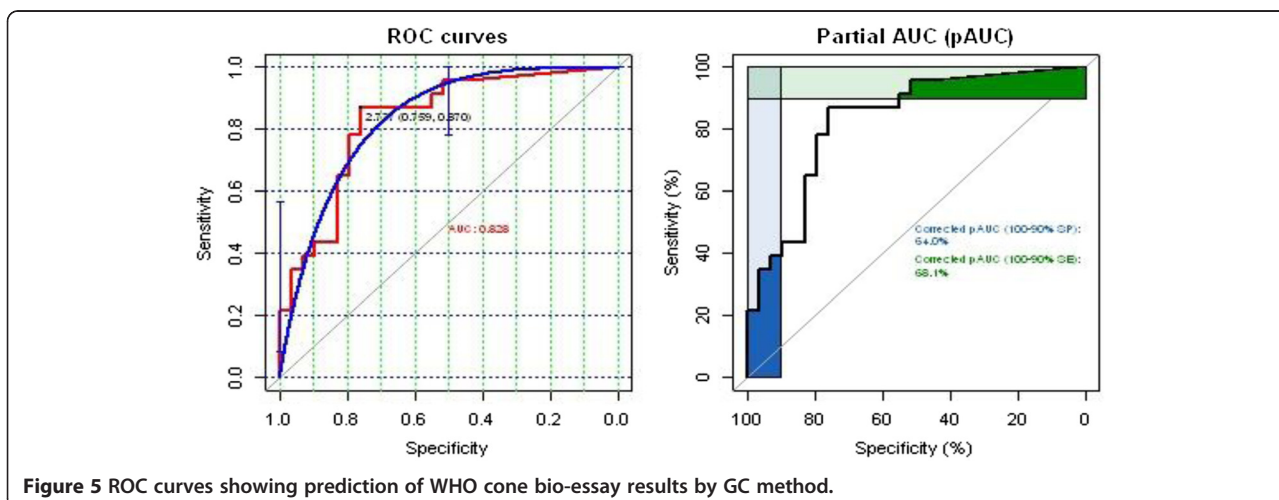
Assessment of bio-efficacy

Determining a GC threshold for LLINs that meet minimum WHO bio-efficacy criteria

Figure 4 showed the mortalities observed with WHO cone test bioassay. On the 37 LLINs, 23 have mortality $>80\%$. The mean mortality observed was 83% for the new nets and 79% for the nets collected from field. The minimum mortality was 18% mortality and the maximum was 100%. The median mortality was 89% for the new nets and 83% for the net selected from the field. Comparing the results with the GC method, we identified a GC value of 2.73 $\mu\text{g}/\text{sample}$ or greater, for identification of LLINs that would be expected to cause $>80\%$ mortality in a WHO cone bio-assay. That is LLINs with permethrin levels high enough to meet the WHO minimum threshold for adequate LLIN bio-efficacy. LLINs giving GC results less than the 2.73 μg cut off were counted as not meeting the minimum WHO threshold for bio-efficacy. Statistical evaluation of the test, using Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis showed that the GC method can predict the WHO result within reasonable margins (specificity = 75.9%, sensitivity = 87.0%, AUC = 0.83 (0.7-0.92)) (Figure 5). The sampling frame for bio-efficacy testing was determined to be 172 assessment LLINs, selected at random (*n.b.* analysis of this many nets by means of the WHO cone bio-assay would be logistically very difficult). Despite the need for additional development work, the GC approach was used in the tracking study.

Bio-efficacy of LLINs 6 months post-distribution

A total of 222 nets were subjected to GC analysis to assess bio-efficacy. Results are summarized in Figures 6 and 7. There was significant loss associated with bio-efficacy at all four sites during the assessment period (T0-T6) ($p = 0.0001$). However, there was no significant difference between locations with more versus less access to water



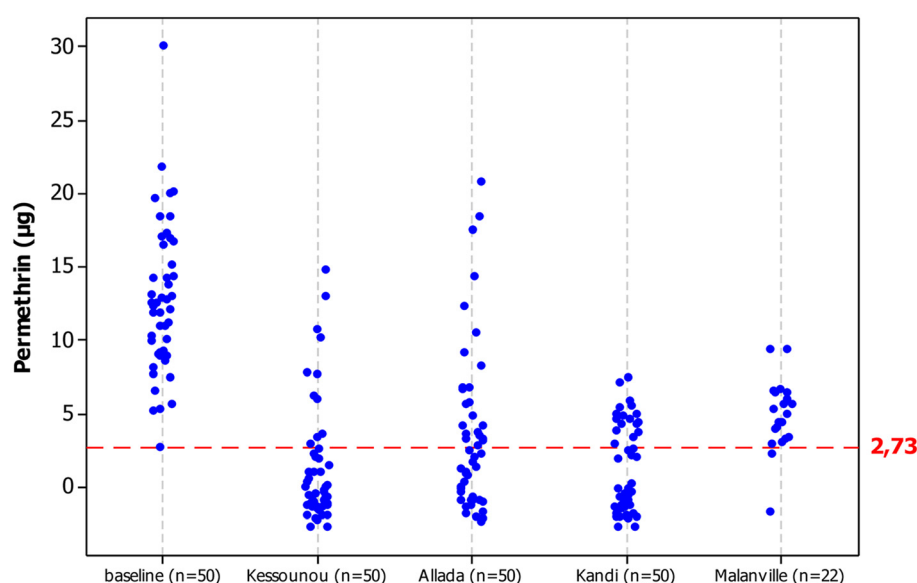


Figure 6 Scatter plot of LLIN surface insecticide (permethrin) levels for 212 LLINs.

for washing. Measurements were based on gas chromatographic analysis of LLIN surface samples collected at randomly selected households in each study at T6. Results are compared with baseline (T0) measurements on recently distributed nets using the same approach. The red dotted line shows the GC cut-off equivalent to a surface insecticide level high enough to give >80% mortality in the WHO cone bio-assay, a minimum threshold for adequate LLIN bio-efficacy set by WHO.

Bio-efficacy at baseline (T0) was high. The results showed that 98% (49/50) had surface insecticide levels that were above the minimum WHO threshold for bio-efficacy

(loss associated with bio-efficacy at T0 was set at 2%). After six months of use, net loss associated with bio-efficacy was 58% in Kessounou, 52% in Kandi, 44% in Allada and 9% in Malanville. At T6 there were 42% LLINs below the GC cut off for WHO minimum bio-efficacy.

Factors associated with LLINs durability

Table 5 indicated responses from a questionnaire used to assess the house environment and behaviour related to net use, handling and washing of the sub-sample selected. At Kessounou and Malanville, most residents indicated that they washed their nets between 2–5 times

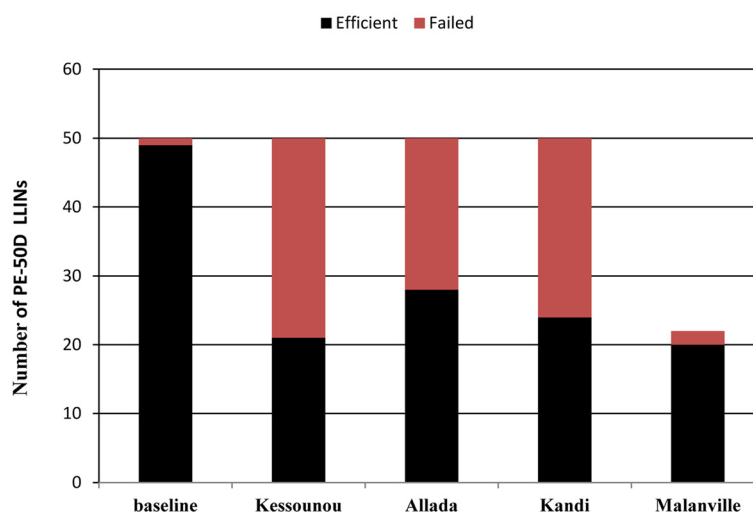


Figure 7 Net loss associated with bio-efficacy. Number of nets with insecticide levels below and above WHO threshold T0 versus T6.

Table 5 Responses from the questionnaire administered to the sub-sample selected in each site

Predictors	Modalities	KESSOUNOU	ALLADA	KANDI	MALANVILLE
Washing frequency	None	7	21	21	10
	1 time	8	21	18	7
	2-5 time	25	7	11	26
	6-10 time	2	0	0	5
	10+	7	1	0	2
Maintenance	Good	18	19	19	17
	Low	31	31	31	33
LLINs use	Don't know	0	1	0	0
	Not use	0	2	0	1
	Often	5	10	7	4
	Every night	44	37	43	45
Roof of the house	Pave stone	2	0	0	3
	Straw	15	0	1	9
	Sheet-metal	31	50	48	38
	Tile	1	0	1	0
LLINs position	Hanged	44	37	41	35
	Stiked	1	7	9	14
	Tidy	4	6	0	1
Location of the kitchen of the house	Outside	35	48	35	46
	Inside	14	2	14	4
Fabric integrity of the LLINs	With holes	14	35	30	13
	Without holes	35	15	20	37
Distance to water for washing	>5 km	0	50	50	0
	< 0.5 km	49	0	0	50

in the preceding 6 months, whereas most residents at Allada and Kandi, stated that washing occurred less frequently <2 times in the preceding 6 months. Modalities with very few responses were aggregated for the multivariate analysis.

In summary (Table 6), the 6 months data showed that frequency of LLINs use, sleeping material, washing frequency and the distance to water for washing were significantly associated with loss of fabric integrity ($p < 0.05$).

Table 7 showed that only factors like frequency of LLIN use and sleeping material were significantly associated with insecticide decay ($p < 0.05$). Factors like washing frequency, LLINs maintenance, location of the kitchen and distance to water for washing did not seem to play a key role in the insecticide decay observed.

Discussion

The National Malaria Control Program of Benin conducted a country-wide distribution of permethrin-treated Olyset® LLINs in July 2011. As early as 6 months into the assessment, we observed that measures of fabric integrity and

bio-efficacy had decreased rapidly bringing into question the assumption that LLIN condition remains “relatively uniform for at least three years”. The report of other assessments will help us to more understand the effective life of the intervention. However, loss associated with bio-efficacy and fabric integrity during the first six months, was great enough to suggest that the impact of the LLIN intervention on malaria transmission could be affected.

After the first 6 months, survivorship has decreased to 93%. The main cause of net loss or missing nets was due to the removal of nets. Net missing due to poor physical condition was low. These findings suggest that LLIN survivorship would drop significantly during years two and three post distribution if the attrition rate observed continue at the same rate and could affect the impact of the LLIN intervention on malaria transmission.

A high-coverage and compliance with nightly use of LLINs, provides a ‘community protection’ benefit. Considering the observed attrition rate, over six months, it may well be that, at best; any ‘community’ protection associated with the intervention would be higher in some areas and could disappear in other areas within two years or less if

Table 6 Factor associated with loss of fabric integrity

Factors	Modalities	LLINs with any holes (N)	Total LLINs	% of LLINs with any holes	OR	OR (95%CI)	P (Wald test)	P (LR-test)
Frequency of LLIN use	Often	7	30	23.33	1.00	-	-	0.004
	Every night	100	169	59.17	4.76	[1.94-11.71]	0.006	
Sleeping material	Bed	34	86	39.53	1.00	-	-	0.016
	Mat	72	111	64.86	2.82	[1.58-5.05]	0.018	
Washing frequency	None	20	59	33.90	1.00	-	-	0.001
	1	21	54	38.89	1.24	[0.58-2.67]	0.860	
	2-5	66	86	76.74	6.43	[3.08-13.43]	0.003	
Location of the Kitchen	Outside	93	176	52.84	1.00	-	-	0.369
	Inside	14	23	60.87	1.39	[0.57-3.37]	0.366	
LLINs maintenance	Good	37	73	50.68	1.00	-	-	0.976
	Low	70	126	55.56	1.22	[0.68-2.17]	0.976	
Distance to water for washing	>5 km	35	100	35.00	1.00	-	-	0.020
	< 0.5 km	72	99	72.73	4.95	[2.71-9.06]	0.020	

the LLINs were removed and used in areas different to their initial locations and net loss associated with poor physical condition increased. Additionally, there was anecdotal evidence that homeowner re-purpose LLINs in ways that increase the attrition rate. In Kessounou, for example, a striking cause of the loss included LLINs that had been converted into fishing nets, as well as covers for protecting crops and animals. Strengthening information and communication activities around future distribution campaigns should be evaluated and incorporated into distribution campaign strategy to increase the value that community members place of correct use of nets [25].

While there were differences in survivorship, associated with geo-climatic variation (South versus North), the

differences in fabric integrity, seen at geo-climatically similar sites where access to water was different, were more pronounced. LLINs found with any holes were greater in areas where water (for washing nets) was easily obtained. Proximity to a LLIN washing site seems to encourage more frequent washing of nets, thereby accelerating loss of fabric integrity. The effect of local differences on LLIN physical integrity loss, such as proximity to water, as well as regional differences, e.g. seasonal rainfall patterns, point out the importance of conducting tracking net interventions in different geographic areas [26]. Frequent washing of nets, >5 times in 6 months, was 3–4 times more common in river sites of Kessounou and Malanville, than in upland sites of Allada and Kandi, where water for washing was

Table 7 Factors associated with loss of insecticide bio-efficacy

Factors	Modalities	N ineffective	Total	% ineffective	OR	OR (95%CI)	P (Wald test)	P (LR-test)
Frequency of LLIN use	Often	11	28	39.29	1.00	-	-	0.028
	Every night	89	144	61.81	2.50	[1.09-5.73]	0.031	
Sleeping material	Bed	65	104	62.50	1.00	-	-	0.0117
	Mat	35	68	51.47	0.64	[0.34-1.17]	0.12	
Washing frequency	None	31	53	58.49	1.00	-	-	0.728
	1	28	50	56.00	0.90	[0.41-1.97]	0.431	
	2-5	41	69	59.42	1.04	[0.50-2.15]	0.751	
Location of the Kitchen	Outside	86	151	56.95	1.00	-	-	0.451
	Inside	14	021	66.67	1.51	[0.58-3.96]	0.455	
LLINs maintenance	Good	33	064	51.56	1.00	-	-	0.489
	Low	67	108	62.04	1.54	[0.82-2.87]	0.489	
Distance to water for washing	>5 km	59	100	59.00	1.00	-	-	0.17
	<0.5 km	41	072	56.94	0.92	[0.5-1.7]	0.174	

transported by community members. This factor as well as the sleeping material and the frequency of LLIN use played a significant role in loss associated with LLIN integrity.

Loss associated with fabric integrity increase the probability of man-mosquito contact and transmission of malaria [27-29]. On the down side, at two assessment sites, Kessounou and Malanville, the fabric integrity of more than half of the LLINs was compromised using the six months following distribution. The problem of physical damage could be addressed through better education [30] for correct hanging, care and repair of nets [31]. Solving the problem may require emphasis on less frequent washing of nets and more care when hanging and using the LLINs to increase the effective life of LLINs under field conditions, a critical modification, since national replacement of LLINs on any schedule less than every three years is, programmatically, highly unlikely.

LLINs are supposed to be effective even if torn [32,33], because of “repellency” associated with the insecticide. In this assessment, we applied a new method, which is faster than the WHO cone, does not require mosquitoes, is not destructive and easier to test statistically meaningful sample size, to capture and quantify insecticide residue on the LLINs surface. The GC method, used to estimate the proportion of nets with a surface insecticide level above the WHO threshold, uses a standardized sampling technique to sample the surface concentration of permethrin, and to compare the results to a GC threshold concentration of 2.73 µg permethrin/GC sample. The threshold concentration was estimated through testing LLINs that were previously evaluated by means of the WHO cone bio-assay test. Nets that exceeded the WHO test threshold value (a surface insecticide levels adequate to cause >80% mortality) as well as nets that were not ($\leq$ 80% mortality) were identified and used to establish a GC cut off value that distinguishes the two groups. ROC analysis was used to compare bioassay and GC results. While potentially offering several advantages, the GC method as described here, was observed to have several limitations. The PE-150D LLINs technology incorporates molecules of permethrin in the nets fibers [34]. In theory the insecticide molecules migrate to the surface continuously replacing insecticide loss at the surface [35]. However, this regeneration process is not necessarily rapid and time (after washing) until completion of regeneration may be up to three weeks, during which the surface insecticide concentration, measured by the GC method, can be low [36]. This implies that the GC method may well have underestimated bio-efficacy. The multivariate analysis performed on the bio-efficacy data confirmed this observation because washing frequency and distance to water for washing were not associated with insecticide

decay and suggested that other factor(s) was responsible of the low insecticide quantity observed in the ineffective LLINs. These results suggested that the GC method needs to be improved to assess the real bio-efficacy of these LLINs.

Our results support a conclusion that LLINs intervention, under field conditions [37], need to be strengthened by communication with community using LLIN to reduce removal practice and assure an effective impact of the distribution strategy. The results raise the question of whether or not greater emphasis on care and repair of nets at the household level could slow this process down. Additionally, LLIN manufacturers are working on the durability characteristics of the mesh used for manufacturing LLINs. A combination of cultural and net-related changes should be implemented and evaluated to improve LLIN effective life.

Conclusion

LLINs were widely distributed by Benin NMCP in July 2011. We developed and tested a tool for monitoring the durability of the nets. After six months of use under field conditions, measures of integrity and bio-efficacy had dropped more quickly than anticipated. At present the WHO cone test appears to be the only reliable measure of net bio-efficacy for polyethylene-permethrin impregnated LLINs. The way in which the insecticide is incorporated into the LLIN fiber, and its migration to the surface during regeneration, may be responsible for confounding the GC results. If so, then the WHO cone test method may also be similarly affected. The results of other assessments could help us to better understand the effective operational life of this intervention.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RA: co-designed the study, designed experiments, coordinated field activities, collected and analyzed data, wrote and revised the paper; VG: mapping, participated in data collection, field activities and revised the paper; SH: participated in field activities and data collection; FO: assisted with the statistical analysis and participated in field activities and data collection; MG: technical assistance of the study and participated in design of the study; AM: designed the study, supervised field activities and revised the paper. All authors have read and approved the content of the submitted manuscript.

Acknowledgements

Our thanks are addressed to the Village Health Workers, Benin NMCP, CDC and USAID. This investigation received financial support from the US President's Malaria Initiative.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ²University of Massachusetts Amherst, Amherst, Massachusetts, USA. ³Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ⁴Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

Received: 23 October 2013 Accepted: 1 January 2014

Published: 4 January 2014

References

- Kitua AY, Ogundahunsi OAT, Lines J, Mgone CS: **Conquering malaria: Enhancing the impact of effective interventions towards elimination in the diverse and changing epidemiology.** *J Glob Infect Dis* 2011, **3**:161.
- NMCP: *Benin's strategic plan against malaria from 2006 to 2010.* Cotonou: Ministry of health; 2006.
- Alonso PL, Lindsay SW, Schellenberg JRMA, Keita K, Gomez P, Shenton FC, Hill AG, David PH, Fegan G, Cham K, Greenwood BM: **A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, West Africa.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **87**:37–44.
- Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong JRM, de Francisco A, Shenton FC, Greenwood BM, Conteh M, Cham K, Hill AG, David PH, Fegan G, Hall AJ: **The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children.** *The Lancet* 1991, **337**:1499–1502.
- D'Alessandro U, Olaleye BO, McGuire W, Thomson MC, Langerock P, Bennett S, Greenwood BM: **A comparison of the efficacy of insecticide-treated and untreated bed nets in preventing malaria in Gambian children.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995, **89**:596–598.
- Binka FN, Kubaje A, Adjuk M, Williams LA, Lengeler C, Maude GH, Armah GE, Kajihara B, Adiamah JH, Smith PG: **Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial.** *Trop Med Int Health* 2007, **1**:147–154.
- Zaim M, Aitio A, Nakashima N: **Safety of pyrethroid-treated mosquito nets.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:1–5.
- Curtis CF, Jana-Kara B, Maxwell CA: **Insecticide treated nets: impact on vector populations and relevance of initial intensity of transmission and pyrethroid resistance.** *J Vector Borne Dis* 2003, **40**:1–8.
- Antonio-Nkondjio C, Demanou M, Etang J, Bouchite B: **Impact of cyfluthrin (Solfac EW050) impregnated bed nets on malaria transmission in the city of Mbandjock: lessons for the nationwide distribution of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in Cameroon.** *Parasites & Vectors*. 2013, **6**:10.
- Lengeler C: *International Development Research Centre (IDRC), World Health Organization (WHO), Net Gain: A New Method for Preventing Malaria Deaths.* Ottawa: IDRC; 1996.
- Thwing J, Perry R, Townes D, Diouf M, Ndiaye S, Thior M: **Success of Senegal's first nationwide distribution of long-lasting insecticide-treated nets to children under five-contribution toward universal coverage.** *Malar J* 2011, **10**:86.
- Shargie E, Gebre T, Ngondi J, Graves P, Mosher A, Emerson P, Ejigsemahu Y, Endeshaw T, Olana D, WeldeMeskel A, others: **Malaria prevalence and mosquito net coverage in Oromia and SNNPR regions of Ethiopia.** *BMC Public Health* 2008, **8**:321.
- Hougard J-M: **Insecticide-treated Nets.** *Pour Sci* 2008, **368**:48–52.
- Okumu F, Kiware S, Moore S, Killeen G: **Mathematical evaluation of community level impact of combining bed nets and indoor residual spraying upon malaria transmission in areas where the main vectors are Anopheles arabiensis mosquitoes.** *Parasites & Vectors* 2013, **6**:17.
- Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L, Gazin P, Richard A, Mouchet J: **Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso.** *Bull Société Pathol Exot Ses Fil* 1988, **81**:832–846.
- Mouchet J, Robert V, Carnevale P, Ravaonjanahary C, Coosemans M, Fontenille D, Lochouart L: **Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale: place et limite de la lutte antivectorielle.** *Cah Détudes Rech Francoph Santé* 1991, **1**:277–288.
- Bermejo A, Veeken H: **Insecticide-impregnated bed nets for malaria control: a review of the field trials.** *Bull World Health Organ* 1992, **70**:293–296.
- WHO: *Report of the Thirteenth WHOPES Working Group Meeting-Review of Olyset® LN, DawaPlus®2.0 LN, Tianjin Yorkool® LN.* Geneva: World Health Organization; 2009.
- Yukich J, Bennett A, Keating J, Yukich R, Lynch M, Eisele T, Kolaczinski K: **Planning long lasting insecticide treated net campaigns: should households' existing nets be taken into account?** *Parasites & Vectors* 2013, **6**:174.
- WHO/HTM/NTD/WHOPES: *Guidelines for Monitoring the Durability of Long-Lasting Insecticidal Mosquito Nets under Operational Conditions.* Geneva: World Health Organization; 2011.
- NMCP: *Free mass-distribution campaign of Long Lasting insecticide-treated Nets in Benin - General Report.* Cotonou: Ministry of Health; 2012.
- Green MD, Mayxay M, Beach R, Pongvongsa T, Phompida S, Hongvanthong B, Vanisaveth V, Newton PN, Vizcaino L, Swamidoss I: **Evaluation of a rapid colorimetric field test to assess the effective life of long-lasting insecticide-treated mosquito nets in the Lao PDR.** *Malar J* 2013, **12**:57.
- Green MD, Atieli F, Akogbeto M: **Rapid colorimetric field test to determine levels of deltamethrin on PermaNet® surfaces: association with mosquito bioactivity.** *Trop Med Int Health* 2009, **14**:381–388.
- WHO: *Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets.* Geneva: World Health Organization; 2005.
- Minakawa N, Dida GO, Sonye GO, Futami K, Kaneko S: **Unforeseen misuses of bed nets in fishing villages along Lake Victoria.** *Malar J* 2008, **7**:165.
- Atieli FK, Munga SO, Ofulla AV, Vulule JM: **The effect of repeated washing of long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) on the feeding success and survival rates of Anopheles gambiae.** *Malar J* 2010, **9**:304.
- Gnanguenon V, Azondekon R, Oke-Agbo F, Sovi A, Ossè R, Padonou G, Aikpon R, Akogbeto MC: **Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets.** *BMC Public Health* 2013, **13**:751.
- Ochomo EO, Bayoh NM, Walker ED, Abongo BO, Ombok MO, Ouma C, Githeko AK, Vulule J, Yan G, Gimnig JE: **The efficacy of long-lasting nets with declining physical integrity may be compromised in areas with high levels of pyrethroid resistance.** *Malar J* 2013, **12**:368.
- Haji K, Khatib B, Smith S, Ali A, Devine G, Coetzee M, Majambere S: **Challenges for malaria elimination in Zanzibar: pyrethroid resistance in malaria vectors and poor performance of long-lasting insecticide nets.** *Parasites & Vectors* 2013, **6**:82.
- Ndjinga J, Minakawa N: **The importance of education to increase the use of bed nets in villages outside of Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.** *Malar J* 2010, **9**:279.
- Toé L, Skovmand O, Dabiré K, Diabaté A, Diallo Y, Guiguemdé T, Doannio J, Akogbeto M, Baldet T, Gruénais M-E: **Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso.** *Malar J* 2009, **8**:175.
- Port GR, Boreham PFL: **The effect of bed nets on feeding by Anopheles gambiae Giles (Diptera: Culicidae).** *Bull Entomol Res* 2009, **72**:483.
- Kweka E, Himeidan Y, Mahande A, Mwang'onde B, Msangi S, Mahande M, Mazigo H, Nyindo M: **Durability associated efficacy of long-lasting insecticidal nets after five years of household use.** *Parasites & Vectors* 2011, **4**:156.
- N'Guessan R, Darriet F, Doannio JMC, Chandre F, Carnevale P: **Olyset NetR efficacy against pyrethroid-resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus after 3 years' field use in Cote d'Ivoire.** *Med Vet Entomol* 2001, **15**:97–104.
- Ito T, Okuno T: **Development of Olyset (R) net' as a Tool for Malaria Control.** *Sumitomo Kagaku Tokushugo (Sumitomo Chemical Review)* 2006, (2):4–11. http://www.sumitomo-chem.co.jp/english/rd/report/theses/docs/20060200_Ini.pdf.
- Gimnig JE, Lindblade KA, Mount DL, Atieli FK, Crawford S, Wolkon A, Hawley WA, Dotson EM: **Laboratory wash resistance of long-lasting insecticidal nets.** *Trop Med Int Health* 2005, **10**:1022–1029.
- Trape JF: **Contre: Les limites des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale.** *Bull Soc Pathol Exot* 2001, **94**:174–179.

doi:10.1186/1756-3305-7-6

Cite this article as: Azondekon et al.: A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:6.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Durability assessment results suggest a serviceable life of two, rather than three, years for the current long-lasting insecticidal (mosquito) net (LLIN) intervention in Benin

Virgile Gnanguenon^{1,2*}, Roseric Azondekon^{1,3}, Frederic Oke-Agbo¹, Raymond Beach⁴ and Martin Akogbeto^{1,2}

Abstract

Background: LLIN distribution, every three years, is a key intervention of Benin's malaria control strategy. However, data from the field indicate that LLIN lifespan appears to vary based on both intrinsic (to the LLIN) and extrinsic factors.

Methods: We monitored two indicators of LLIN durability, survivorship and integrity, to validate the three-year-serviceable-life assumption. Interviews with net owners were used to identify factors associated with loss of integrity.

Results: Observed survivorship, after 18 months, was significantly less ($p < 0.0001$) than predicted, based on the assumption that nets last three years. Instead, it was closer to predicted survivorship based on a two-year LLIN serviceable life assumption ($p = 0.03$). Furthermore, the integrity of nearly one third of 'surviving' nets was so degraded that they were in need of replacement. Five factors: washing frequency, proximity to water for washing, location of kitchen, type of cooking fuel, and low net maintenance were associated with loss of fabric integrity.

Conclusion: A two-year serviceable life for the current LLIN intervention in Benin would be a more realistic program assumption.

Keywords: Long-lasting Insecticidal Net (LLIN), Survivorship, Fabric integrity, LLIN intervention serviceable life, Durability

Background

National distribution of long-lasting insecticidal (mosquito) nets (LLINs) is a proven malaria control intervention [1-3]. However, LLIN interventions have a limited serviceable life, and net replacement must be programmed in a timely way to maintain impact. Programs that wait too long risk operational failure; likewise, premature replacement is to be avoided for cost-effectiveness reasons. The current assumption regarding LLIN serviceable life is three to five years of use under field conditions [4,5]. While this has been incorporated into LLIN intervention

planning, questions have arisen about whether such an approach holds true everywhere nets are in use [6]. Rather than a single LLIN serviceable life everywhere, data from the field indicate that LLIN loss appears to vary based on both intrinsic (to the LLIN) and extrinsic factors [7-10]. We monitored LLIN durability in Benin, during the current national LLIN distribution – replacement cycle, so that the timing of the future replacement campaigns can be informed by Benin-specific net loss data.

Methods

Beginning in July, 2011, approximately four million polyethylene-based LLINs (Olyset® net, Sumitomo Chemical Company) were distributed throughout Benin. Following distribution, a net tracking activity to monitor the durability of the LLINs [11,12] was implemented in four

* Correspondence: amerusangel@yahoo.fr

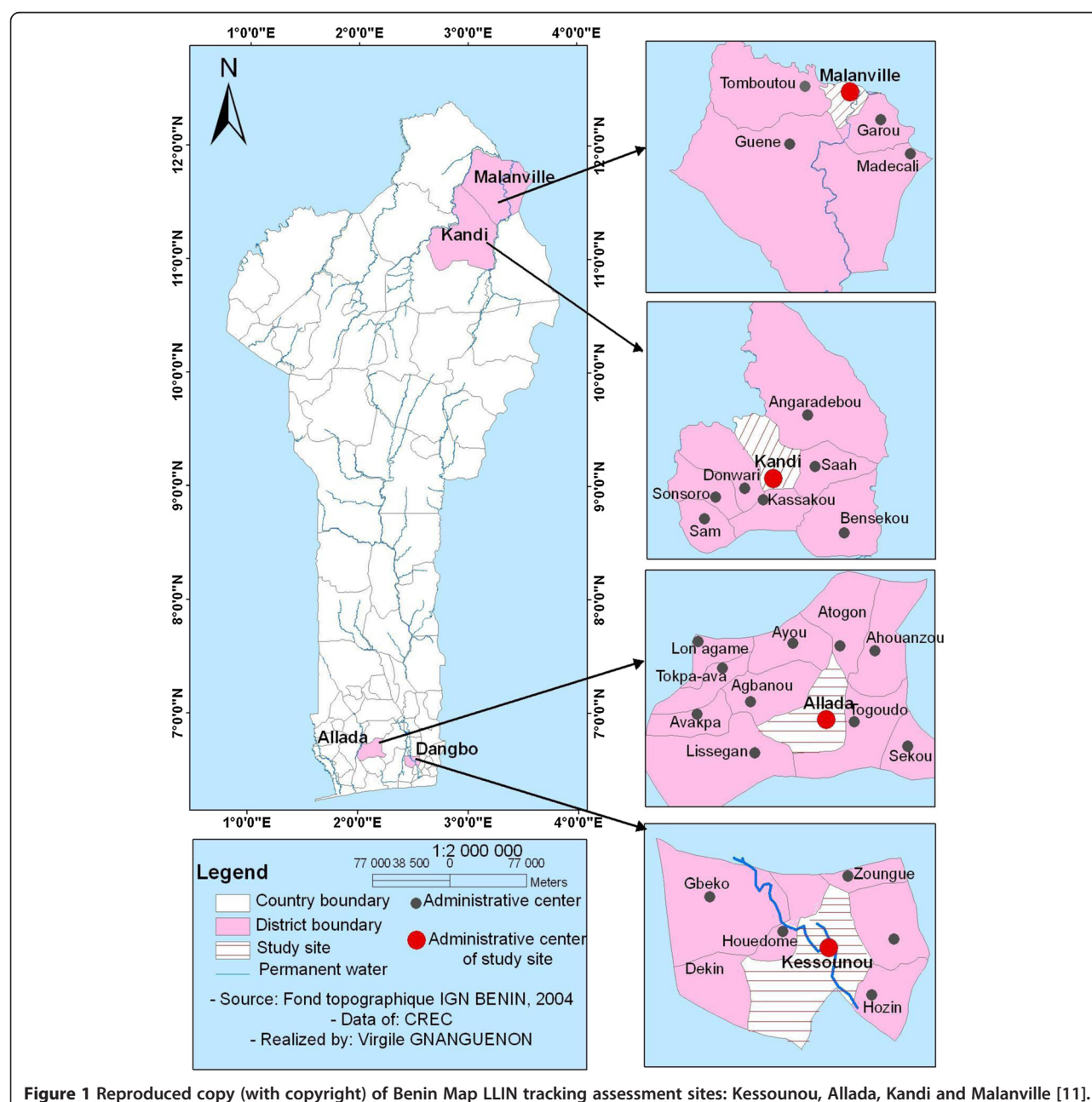
¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin

²Faculte 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

communities. Two of the communities, Kessounou and Allada, were located in Southern Benin (Figure 1), while the other two, Kandi and Malanville, were located approximately 750 km further North. Residents in Kessounou, located on the Oueme River, have ready access to water for washing nets. In contrast, residents of Allada, who want to wash a net, must carry water some five kilometers. Similar criteria (a short distance to water for washing LLINs versus a long distance) applied to the sites in the North. Malanville, located on the Niger River (water for washing nets easily accessible) and Kandi (residents must transport water for washing nets, as at Allada).

As described previously, at the time of the nationwide LLIN distribution in 2011, a sample of 2002 households, approximately 500 per site, was randomly selected [11]. Household selection at each site took into account all villages to ensure representative sampling [11]. Assessment teams identified a 2011-distribution LLIN in each selected household and, if the net was hanging and in use, enrolled it, and the household where it was located, in a LLIN durability monitoring assessment, based on World Health Organization guidelines [13]. Each selected LLIN was double tagged (a bar code, attached to the net, plus an indelible-ink symbol applied to the LLIN



fabric) to ensure correct identification during later visits. The GPS coordinates of the household and the name of the head of household, or an adult person acting on behalf of the head, were also recorded to facilitate follow up. This paper reported the 12 and 18 months assessments.

Monitoring survivorship/Attrition

Due to the way in which households were selected (one enrolled LLIN per household), LLIN survivorship at T_0 , was set at 100%. At 6-month intervals, each selected household received a follow-up visit. If the household was open at the time of the visit, the assessment team visually confirmed the continued presence of the coded LLIN. If the coded LLIN was not in the house, the assessment teams determined how the net went missing by interviewing the owner. Owners were asked to choose one of three reasons for why the net was no longer present in the household. These were: (i) the net was thrown away because it was physically damaged and thought to be of no value, (ii) the net was removed (e.g. given away, stolen, sold etc.), and (iii) the net was re-purposed for an alternative use.

Monitoring integrity

LLIN fabric integrity was assessed by a visual examination, without removal of coded nets from selected households. Observed holes were assigned to one of four size categories:

1. a hole size of 0.5-2.0 cm or '<a thumb-sized opening'
2. a hole size of 2.0-10.0 cm or '>a thumb but<a fist'
3. a 'hole size of 10-25 cm or '>a fist but<a head'
4. a hole size of >25 cm or '>a head'

The most-likely cause of the damage, a rip in the fabric, a rip in the seam, burned burn-related hole or the result of rodent damage was also recorded.

Interview questionnaire

A questionnaire, developed by WHO [13], to identify factors associated with survivorship, was adapted for use in the assessment. Questions were programmed (ODK Collect 1.2.2 software) into Samsung Galaxy Tablets to record responses.

Data analysis

Survivorship

The equation for quantifying overall survivorship, also referred to as attrition, was:

$$\frac{\text{Total coded LLINs still present in the households selected}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

If a household was closed, during an assessment visit, it was treated according to the non-parametric survival

method of Kaplan-Meier [14]. Survivorship, plotted against time (T_6 , T_{12} , T_{18}), was compared with NetCALC net loss model curves based on 2-year and 3-year LLIN serviceable life assumptions (<http://www.networksmalaria.org>). Equations for calculation of LLIN survivorship/attrition associated with three different reasons for why an assessment net had gone missing were:

Attrition rate-1 (reason: physical damage):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN reported as thrown out due to wear and tear in surveyed households}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

Attrition rate-2 (reason: removal):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN reported as given away, stolen, sold or used in another location}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

Attrition rate-3 (reason: re-purposed):

$$\frac{\text{Total number of coded LLIN reported as being used for another purpose in surveyed households}}{\text{Total coded LLINs at enrollment } (T_0)} \times 100$$

Two communities were reported to show significantly different survivorship/attrition if the 95% confidence limits did not overlap.

Integrity was quantified based on two measurements:

- 1) The proportion of LLINs with any hole.

$$\frac{\text{Total number of coded LLINs with at least one hole of size 1-4}}{\text{Total number of coded LLINs found and assessed in surveyed households}} \times 100$$

- 2) The proportionate holes index (pHI) for each net [13]

$1 \times \text{number of size } - 1 \text{ holes} + 23 \times \text{no. of size } - 2 \text{ holes} + 196 \times \text{no. of size } - 3 \text{ holes} + 576 \times \text{no. of size } - 4 \text{ holes}$. The figures, 23, 146, and 576 refer to the estimated mean hole area for the different sized holes. Descriptive statistics were used to compare pHI values at each assessment site (mean, median, interquartile range). Based on the pHI score, LLINs were assigned to one of three condition categories (Roll Back Malaria: Measurement of Net Durability in the Field: Current Recommended Methodology, presented in Lyon, February 2012).

pHI ≤ 64 - **good**

pHI ≤ 768 - **serviceable**

pHI > 768 - **replace**

Factors associated with loss of integrity were identified by multivariate regression analysis of nets in the 'replace'

category and frequency of responses (by owners of the nets). Modalities with very low numbers observed were aggregated with those that have high numbers for the multivariate analysis.

Study clearance

This prospective study was planned with and approved by the Ministry of Health. Community leaders were informed before the study and all gave verbal consent before initiation. Written consent was then obtained on the day of the study from all participating households.

Results

Net survivorship/attrition

There were 2002 nets enrolled (T_0) in the assessment. During the T_6 , T_{12} and T_{18} follow up visits, 1672, 1225, and 973 LLINs, respectively, were found and evaluated (Table 1). There was a significant difference in survivorship associated with community location, but not associated with distance to water for washing nets. After 12 months, the estimated survivorship in the South 65% [CI 95%: 62.54-68.41], was significantly lower than in the North, 78% [CI 95%: 75.04-80.19]. In contrast, when survivorship data were analyzed by ease of access to water for washing nets, no significant differences were observed. After 12 months it was 71% [CI 95%: 67.87-73.49] for the 'distant' (from water) communities and

73% [CI 95%: 70.06-75.56] for the 'near' (to water) ones. The same pattern was observed after 18 months. Estimated mean survivorship was 50% [CI 95%: 46.86-53.04] in the South, significantly lower than in the North, 65% [CI 95%: 61.83-67.73]; and 57% [54.00-60.12] for the 'distant' (from water) communities versus 58% [CI 95%: 54.61-60.73] for the 'near' (to water) ones. In summary, survivorship (all communities) was 93% after 6 months, 72% after 12 months and 57% after 18 months; was variable between southern and northern localities; but did not appear to change based on distance to water for washing (LLINs loss in South was 01.62 [CI 95%: 01.41-01.86] times that in the North, but the same at sites near water versus those located farther away.

Observed survivorship is compared with NetCALC loss predictions (NetCALC loss curves) in Figure 2. NetCALC predicted survivorship at 18 months is 84% for the three year model, and 68% for the 2-year model, whereas observed survivorship in all communities at 18 months, 57%, is significantly less ($P < 0.0001$) than predicted based on the three-year assumption and also less than, but closer to, that predicted by the NetCALC 2-year loss rate model ($p = 0.036$).

Reasons for net loss

There were 313 and 289 interviews, at households where the net was missing, administered during the 12 and 18

Table 1 LLIN survivorship by assessment community

Water for washing nets		Kessounou (South)	Malanville (North)	Allada (South)	Kandi (North)	Total
		Near		Distant		
Distance to water for washing LLINs		<0.05 km	<0.05 km	>5.0 km	>5.0 km	
Baseline (T_0)	Households enrolled	501	501	500	500	2002
	Households eligible	501	501	500	500	2002
	Households visited/opened	493	455	420	451	1819
	Coded LLINs found	444	424	374	430	1672
	(LLINs lost)	(49)	(31)	(46)	(21)	(147)
After 6 months (T_6)	Survivorship (%)	90	94	91	96	93
	Households eligible	452	470	454	479	1855
	Households visited/opened	393	411	396	442	1642
	Coded LLINs found	253	338	286	348	1225
	(LLINs lost)	(140)	(73)	(110)	(94)	(417)
After 12 months (T_{12})	Survivorship (%)	62	79	69	77	72
	95% confidence interval	58.20-66.70	75.80-82.90	64.90-73.00	73.40-80.80	69.90-73.80
	Households eligible	312	397	344	385	1438
	Households visited/opened	293	350	274	345	1262
	Coded LLINs found	227	279	184	283	973
After 18 months (T_{18})	(LLINs lost)	(66)	(71)	(90)	(62)	(289)
	Survivorship (%)	49	65	51	65	57
	95% confidence interval	44.90-53.70	62.90-71.10	46.60-55.40	58.70-67.20	55.30-59.60

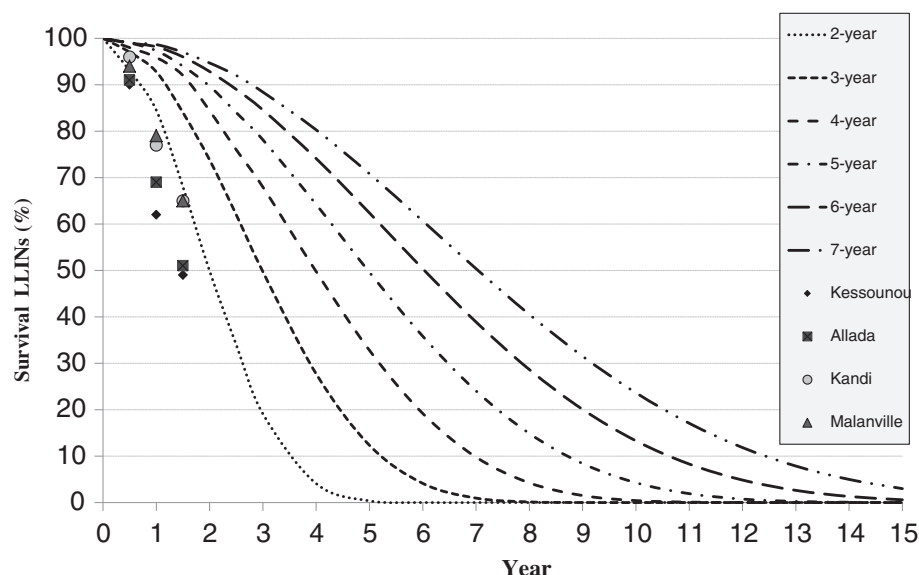


Figure 2 Estimated LLIN survival at 6, 12 and 18 months in four communities compared with NetCALC* 2-year, 3-year, 4-year, 5-year, 6-year and 7-year net loss model curves.

month follows up visits. ‘Removal,’ the most commonly cited reason for a missing net, was mentioned in 240 (range 34–85, by site) and 154 (range 26–59, by site) of the interviews at 12 and 18 months respectively (Table 2). ‘Net thrown away due to physical damage’ was cited 118 (range 7–79, by site) and 132 (range 27–38, by site) times at T12 and T18 respectively. ‘Repurposing’ was mentioned least often, 59 (range 5–27) and 3 (range 0–2) at T12 and T18 respectively. Estimated LLIN attrition, associated with ‘net thrown away’ from T_0 to T_{12} was 7% (range 2–18%) for, for net ‘removed,’ 18% (range 14–25%), and for ‘net re-purposed,’ 3% (1–6%). After 18 months, the estimated attrition rates by reason were 14% (range 7–25%) for ‘net thrown away,’ 26% (range 19–37%) for ‘net removed’ and 3% (1–7%) for ‘net re-purposed’. Physical damage’ was cited more often in the communities where nets were washed more often, e.g. communities located *near* water for washing nets, 19% of responses [CI 95%: 16.18–20.98] in Malanville and Kessounou, versus 9% [CI 95%: 06.84–10.28] in Allada and Kandi. ‘Removal,’ the most common fate of a missing LLIN, was cited more often in the communities distant from water for washing nets 31% [CI 95%: 28.40–34.14] versus 21% [CI 95%: 18.17–23.17].

LLIN fabric integrity

Of the nets remaining in the households to which they were distributed, the percentage with any hole, ranged from 62% at Allada to 87% at Malanville and Kessounou at T12 (Table 3). At T18, the percentage of LLINs with any hole, ranged from 72% at Allada to 93% at

Malanville. Consistent differences in measures of integrity were observed when results for the two communities that were near the source of water for washing nets were compared with the two communities that were farther away from the source of water for washing (Table 3). By the end of one year (T12), the mean proportionate hole indices in the communities located near water for washing (area of greater washing frequency) were 691 and 799, versus 398 to 510 in the communities located farther from washing (lower LLIN washing frequency). Additionally, median pHI values for the communities nearer to the ‘wash water’ source, 290 and 243, were three to six times greater than that observed in communities that were farther away from water for washing nets, 86 and 46. Applying the net condition categories, ‘good,’ ‘serviceable’ and ‘needs replacement,’ 33 and 30 percent of the nets in communities near water for washing were in need of replacement versus 16 and 22 percent in the communities that were farther away from water. Furthermore, the number of LLINs in the ‘good condition’ category was significantly higher ($p < 0.05$) in location with less access to water. At the 18-month assessment visit, the mean proportionate hole indices in the communities located near water for washing (area of greater washing frequency) were 888 and 1479, versus 623 to 447 in the communities located farther from washing (lower LLIN washing frequency). Median pHI values for the communities nearer to a ‘wash water’ source, 706 and 312, were also greater than that observed in communities that were farther away from water for washing nets, (105 and 96). There were 48 and

Table 2 Reasons for net loss (attrition): T₁₂ and T₁₈ questionnaire* response summary

	Kessounou (South)	Malanville (North)	Allada (South)	Kandi (North)	Total
After 6 months (T ₆) (LLINs lost)	(49)	(31)	(46)	(21)	(147)
‘physical damage’ responses	10	3	5	1	19
‘removal’ responses	35	28	41	20	124
‘re-purposed’ responses	4	0	0	0	4
After 12 months (T ₁₂) (LLINs lost)	(140)	(73)	(110)	(94)	(417)
Questionnaires administered	140	73	110	94	417
‘physical damage’ responses	79	19	13	7	118
‘removal’ responses	34	49	85	72	240
‘re-purposed’ responses	27	05	12	15	59
Attrition rate-1 (%)	18	05	04	02	07
95% confidence interval	14.67-21.35	02.92-06.56	02.29-05.62	00.81-03.13	05.82-08.03
Attrition rate-2	14	15	25	18	18
95% confidence interval	11.03-17.07	12.48-18.79	21.59-29.18	15.25-22.03	16.55-19.93
Attrition rate-3	06	01	02	03	03
95% confidence interval	04.-39-08.65	00.43-02.31	01.38-04.15	01.83-04.89	02.47-04.01
% net loss (total attrition)	38	21	31	23	28
After 18 months (T ₁₈) (LLINs lost)	(66)	(71)	(90)	(62)	(289)
Questionnaires administered	66	71	90	62	289
‘physical damage’ responses	38	36	31	27	132
‘removal’ responses	26	34	59	35	154
‘re-purposed’ responses	2	1	0	0	3
Attrition rate-1	25	12	10	07	14
95% confidence interval	21.74-29.34	09.06-14.68	07.49-12.72	05.08-09.58	12.01-15.00
Attrition rate-2	19	22	37	25	26
95% confidence interval	15.77-22.63	18.74-26.00	32.88-41.32	21.78-29.39	24.00-27.84
Attrition rate-3	07	01	02	03	03
95% confidence interval	04.73-09.11	00.55-02.59	01.38-04.15	01.83-04.89	02.60-04.17
% net loss (total attrition)	51	35	49	35	43

*administered to all households if open and missing coded net.

36 percent of the nets in communities near water for washing in need of replacement, versus 24 and 18 percent in the communities that were farther away from water (Table 3). LLINs in the ‘good condition’ category were also significantly higher ($p < 0.05$) in location with less access to water for washing nets. When LLINs with any holes were categorized by the nature of hole as representing either a rip in the fabric, a rip in the seam, a burn hole or the result of chewing by rodents, the ‘rip in the fabric’ category accounted in average for 85% of the damage, while burn holes accounted for 10%, open seams for 3% and rodent damage for 2% at T12 assessment (Table 4). At T18 assessment, the ‘rip in the fabric’ category accounted in average for 84% of the damage, while burn holes accounted for 11%, open seams for 3% and rodent damage for 2% (Table 4).

Factors associated with loss of integrity

Table 5 characterizes households by LLIN washing frequency, nightly LLINs use, maintenance, and five other ‘selected’ characteristics, roofing material, daytime placement, kitchen location, cooking fuel, and type of sleeping furniture (bed, mat, other). Washing frequency increased more rapidly over time in communities that were closer to the water-for- washing source. Most households indicated that LLINs were used nightly (55-84%). Over half of the households use steel sheet as their roofing material. Most, 62-98%, used firewood for cooking fuel, mats were more common (50-95%) at Kessounou and Malanville, whereas, at Allada and Kandi beds were more common (44-51%).

Factors that showed a significant relationship with loss of integrity as measured by nets with any hole included:

Table 3 LLIN Fabric integrity (pHI) after 12 and 18 months at sites with different access to water for washing nets

	Kessounou South		Malanville North		Allada South		Kandi North	
	T12	T18	T12	T18	T12	T18	T12	T18
Tagged LLINs found	253	227	338	279	286	184	348	283
n (%) of nets found with any hole (s)	219 (87)	210 (92)	294 (87)	260 (93)	178 (62)	133 (72)	241 (69)	208 (73)
CI ₉₅ of (%)	81.73-90.51	88.28-95.58	82.92-90.38	89.57-95.85	56.34-67.88	65.22-78.62	64.11-74.06	67.95-78.55
Mean pHI	799	1479	691	888	398	623	510	447
Median pHI	290	706	243	312	46	105	86	96
IQR pHI	1034	2057	978	1156	439	667	560	477
n (%) of nets in pHI<64 'good' category	69 (27)	43 (19)	107(32)	73 (26)	162 (57)	83 (46)	161 (46)	133 (47)
CI ₉₅ (%)	22.16-33.07	14.38-24.54	26.93-36.80	21.36-31.62	50.8-62.26	39.2-53.67	41.10-51.52	41.26-52.81
n (%) of nets in 64<pHI<768 'serviceable' category	100 (40)	74 (33)	129 (38)	105 (38)	79 (28)	53 (30)	112(32)	99 (35)
CI ₉₅	33.70-45.66	26.83-38.94	33.15-43.45	32.1-43.45	22.76-33.08	23.4-36.67	27.49-37.26	29.66-40.71
n (%) of nets in pHI >768 'needs replacement' category	84 (33)	110 (48)	102 (30)	101 (36)	45 (16)	43 (24)	75 (22)	51 (18)
CI ₉₅	27.69-39.22	42.04-54.93	25.53-35.27	30.7-41.27	11.9-20.40	18.3-30.78	17.5-26.17	13.98-22.92

IQR=Interquartile range; n=number; T12=12 months; T18=18 months; CI=Confidence Interval.

washing frequency, LLINs maintenance (low), location of the kitchen (inside the house), type of cooking fuel and the distance to water for washing (Table 6). High washing frequency increased the risk of physical damage to the LLINs ($p<0.0001$).

Discussion

LLIN loss, measured by survivorship/attrition, occurred more rapidly than predicted by the 'three-year serviceable life' assumption, currently used in Benin to program distribution/replacement of LLINs. Of interest, however, was the observation that survivorship rates did not appear to be affected by LLIN washing frequency. In

contrast, our results showed a marked effect of washing frequency on the integrity of the LLINs. Therefore, LLIN loss of physical integrity/deterioration, a factor that affects the ability of LLINs to prevent mosquito-human contact, may not be taken into account if only survivorship is monitored. In this evaluation, loss of integrity, measured in LLINs that remained in place, was so extensive that it may well have compromised the value of the LLINs still remaining in the households as a malaria prevention measures. Recent work [15] in which damaged LLINs are shown to increase man-vector contact from none to an average of five bites/man/night demonstrates the impact that a relatively small loss of integrity,

Table 4 Type of damage: percentage of assessment households responding to LLIN survey question "What was the principle cause of the damage to this LLIN?" at 12 and 18 months assessment visits

	Kessounou South		Malanville North		Allada South		Kandi North	
	T12	T18	T12	T18	T12	T18	T12	T18
Distance to water for washing nets	< 0.05 km				> 5.0 km			
Assessment visit	T12	T18	T12	T18	T12	T18	T12	T18
n of nets found with any hole (s)	219	210	294	260	178	133	241	208
n (%) of nets with 'rip in the fabric'	158 (72)	142 (68)	279 (95)	248 (95)	133 (75)	114 (86)	219 (91)	178 (86)
CI 95%	65.87-77.66	61.02-73.58	91.75-96.88	92.11-97.34	67.86-80.54	78.76-90.66	86.57-93.89	80.16-89.71
n (%) of nets with 'rip in the seam'	4 (2)	5 (2)	3 (1)	5 (2)	10 (6)	3 (2)	9 (4)	16 (8)
CI 95%	00.71-04.60	01.02-05.45	00.35-02.96	00.82-04.42	03.08-10.03	00.77-06.42	01.98-06.94	04.79-12.13
n (%) of nets with 'burn holes'	52 (24)	62 (29)	9 (3)	6 (2)	26 (14)	11 (8)	12 (5)	9 (4)
CI 95%	18.59-29.80	23.77-36.02	01.62-05.71	01.06-04.94	10.17-20.54	04.68-14.20	02.87-08.50	02.29-08.02
n (%) of nets chewing by rodent	5 (2)	2 (1)	3 (1)	1 (1)	9 (5)	5 (4)	1 (0)	5 (2)
CI 95%	00.98-05.23	00.26-03.41	00.35-02.96	00.07-02.15	02.68-09.33	01.62-08.50	00.07-02.31	01.03-05.50

CI=Confidence Interval.

Table 5 Percentage distribution of washing frequency, LLINs usage and housing characteristic by assessment visit (T12, T18)

Factors	Modalities	KESSOUNOU		MALANVILLE		ALLADA		KANDI	
		T12	T18	T12	T18	T12	T18	T12	T18
Washing frequency	None	08.16	02.17	04.00	00.00	28.00	31.91	14.29	22.45
	1 time	04.08	02.17	06.00	06.12	30.00	10.64	16.33	12.24
	2-5 times	61.22	36.96	52.00	24.49	38.00	44.68	63.27	48.98
	6-10 times	16.33	39.13	24.00	34.69	04.00	12.77	06.12	16.33
	10 and more	10.20	19.57	14.00	34.69	00.00	00.00	00.00	00.00
LLINs maintenance	Clean	30.61	41.30	46.00	26.53	28.00	25.53	36.73	28.57
	Dirty	69.39	58.70	54.00	73.47	72.00	74.47	63.27	71.43
LLINs use	Not at all	04.08	04.35	00.00	06.12	08.00	00.00	02.04	2.04
	Often	26.53	30.43	16.00	34.69	22.00	25.53	16.33	42.86
	Every night	69.39	65.22	84.00	57.14	70.00	74.47	81.63	55.10
Roofing material	Paving stone	2.04	02.17	02.00	01.15	02.00	02.13	01.00	02.04
	Straw	20.41	34.78	22.00	21.30	00.00	00.00	06.12	02.04
	Steel sheet	77.55	63.04	76.00	77.55	98.0	97.87	92.88	95.92
	Hanging	71.43	71.74	74.00	59.18	64.00	80.85	81.63	71.43
Daytime location of LLIN	Folded	22.45	23.91	26.00	36.73	20.00	14.89	16.33	28.57
	Tidy away	6.12	04.35	00.00	04.08	16.00	04.26	02.04	00.00
Location of the kitchen	Outside	83.67	76.52	90.00	100.0	96.00	93.62	97.96	100.0
	Inside	16.33	23.48	10.00	00.00	04.00	06.38	02.04	00.00
Cooking fuel	Firewood	97.96	97.83	90.00	97.96	62.00	68.09	67.35	87.76
	Chacoral	02.04	02.17	08.00	02.04	36.00	29.79	30.61	10.20
	Gas	00.00	00.00	02.00	00.00	02.00	00.00	02.04	02.04
	kerosene	0.00	00.00	0.00	00.00	0.00	02.13	0.00	00.00
	Other	0.00	00.00	8.00	12.24	4.00	02.13	20.41	10.20
Sleeping material	Bed	4.08	08.70	42.00	30.61	44.00	48.94	51.02	51.02
	Matting	95.92	91.30	50.00	57.14	52.00	48.94	28.57	38.78
Total number of households visited/opened		393	293	411	350	396	274	442	345

increasing the pHI to 276, can have on LLIN efficacy. Therefore, we suggest that, assumptions about LLIN serviceable life/time to replacement should be informed, to the extent possible, by monitoring integrity of existing nets [13] as well as survival/attrition. Our results suggest that the assumption of a 3-year LLIN serviceable life, for the LLINs distributed in 2011 in Benin overestimated their duration of impact by as much as one year, a situation that could contribute to a rebound in malaria illness during the last year (year three) prior to net replacement. Additional programmatic questions of interest that can be addressed by LLIN durability monitoring include: 'Is the programmatic 'effective life assumption realistic under local/regional conditions?'; 'Do some LLIN products have slower loss/integrity attrition rates in a given location?'; and, 'What programmatic changes can be implemented to improve LLIN duration of effective life?'

Net removal for all reasons was observed in 6% of the study houses at T6, in 18% at T12 and in 26% at T18. Some, perhaps most, of these nets were moved by design of the household (e.g. given away to other houses in the community) and therefore, it is possible that the nets continued to contribute to community protection. Nonetheless, the percentage of nets thrown away (25%) and nets re-purposed were surprisingly high in some communities, eg. Kessounou.

The proportionate hole index (pHI) [13] provides a standardized approach to describing changes in LLIN fabric integrity. Applying pHI thresholds [16]: 'like new', 'needs repair' and 'needs replacement', to our results, we observed that after 12 months, 16-22% of the LLIN need to be replaced at locations with less access to water (Allada and Kandi) versus 30-33% at locations with ready access to water for washing (Malanville and Kessounou). Estimates of net loss associated with

Table 6 Factors associated with loss of integrity

Factors	Modalities	Coefficients	Rate ratio	CI-% (RR)	P (Wald test)	P (LR-test)
Washing frequency	None	-	1.00	-	-	
	1	0.744	2.1	[0.92-04.84]	0.07967	<0.0001
	2-5	1.024	2.78	[1.40-05.55]	0.00355	
	>=6	1.766	5.85	[2.85-11.99]	<0.0001	
Type of roof	Steel sheet	-	1.00	-	-	0.168491
	Straw	-0.324	0.72	[0.46-01.15]	0.16930	
Location of kitchen in the house	Outside	-	1.00	-	-	0.026399
	Inside	0.543	1.72	[1.06-02.79]	0.027699	
Cooking fuel	Charcoal	-	1.00	-	-	0.034210
	Firewood	0.582	1.79	[1.04-03.09]	0.036875	
Sleeping material	Other	-	1.00	-	-	0.774194
	Bed	-0.229	0.79	[0.43-01.49]	0.472834	
	Matting	-0.142	0.87	[0.48-01.56]	0.6365219	
LLINs maintenance	High	-	1.00	-	-	0.002677
	Low	0.526	1.69	[1.20-02.39]	0.002908	
Frequency of net use	Not at all	-	1.00	-	-	0.077341
	Often	-0.889	0.41	[0.19-00.88]	0.02139	
	Every night	-0.718	0.49	[0.24-01.00]	0.05074	
Distance to water for washing	>5 km	-	1	-	-	0.000106
	<0.5 km	0.48	1.61	[1.27-2.05]	0.000106	
Number of sleeper/Net	-	0.105	1.11	[0.96-01.28]	0.14466	0.153694

RR=Rate Ratio; P=p-value.

integrity (computing loss as proportion of nets in pHI category 'needs replacement' were between 18% and 48% after 18months). If loss associated with fabric integrity declines at these rates, more than one half of the LLINs distributed in 2011, and still present in the household to which they were given, would need replacement prior to two transmission seasons post-distribution. Thus, based on fabric integrity alone, the LLINs would not be expected to provide adequate protection after two transmission seasons.

Cooking fuel, location of the kitchen as well as low LLINs maintenance and washing frequency were correlated with the loss of fabric integrity. Social practices regarding net care and repair, vary from community to community, and most likely influence condition of the LLINs in each region [17,18]. It important, therefore, to reinforce awareness about the best practices related to net care and repair.

A recent study in Kenya [19] reported that people washed their LLINs more frequently than recommended and associated this practice with poor physical quality of nets. The study also noted that light colored nets were more likely to be washed than were dark colored nets. The polyethylene-based LLINs in this assessment were light blue. The majority of the nets (54-74%) were

observed to be dirty. Thus, it may be that these factors also contributed to the high observed frequency of washing/rapid decline in fabric integrity. They could significantly affect the bio-efficacy of the nets that decreased from 9-58% after 6 months [11]. However, bio-efficacy results were not included in the present assessment-and represent a potential limitation of the study.

The findings of this study have important implications for the LLIN-malaria control strategy in Benin. They suggest that: the current polyethylene-based LLIN, distributed during 2011, has an effective life of two rather than three years; that behaviour change communication (BCC) strategies that support LLINs repair and that discourage subsequent removal of nets after distribution should be strengthened in an attempt to sustain higher coverage levels for a longer period of time; and that channels for routine replacement of LLINs, between national campaigns should be strengthened to replace nets that no longer meet minimum fabric integrity standards; and that other WHOPES-approved LLIN products should be evaluated to determine which is most cost-effective. Finally, it may be that local communities can adopt and use WHO guidance on assessment of integrity (counting holes) and survival to assess LLIN loss, thereby verifying ongoing impact under local conditions.

Conclusions

This study suggests that in Benin, survivorship/attrition of LLINs followed a 2-year net serviceable life assumption (model), rather than the currently used three-year assumption; that loss of fabric integrity in nets that were still in use, was extensive, with as many as one-third in need of replacement. The condition of the LLINs at the midpoint of its assumed serviceable life raises serious doubts about their usefulness in preventing mosquito-human contact during the subsequent 18 months prior to program replacement of nets under the current plan.

As countries consider how to sustain LLIN impact, it will be important to have meaningful information on LLIN loss in a variety of settings. This information should be used to 'inform' decisions on replacing LLINs thereby avoiding loss of efficacy earlier than assumed.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VG: designed experiments, coordinated field activities, mapping, collected data, wrote and revised the paper; RA: participated in designed experiments, field activities and revised the paper; FO: assisted with the statistical analysis and participated in field activities and data collection; RB: participated in the design of the study and revised the paper; AM: designed the study, supervised field activities and revised the paper. All authors have read and agreed with the content of the submitted manuscript.

Acknowledgement

Our thanks are addressed to the Village Health Workers, Benin National Malaria Control Program. This research was made possible through support provided by the President's Malaria Initiative via the Bureau for Global Health, U.S. Agency for International Development. The opinions expressed herein are those of the author(s) and do not necessarily reflect the views of the U.S. Agency for International Development.

VG: mapping, coordinated field activities, collected and analyzed data, wrote and revised the paper; RA: designed experiments, participated in data collection, and revised the paper; FO: assisted with the statistical analysis and participated in field activities and data collection; RB and MA: designed the study, supervised field activities and revised the paper. All authors have read and agreed with the content of the submitted manuscript.

Author details

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

²Faculte des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ³University of Massachusetts, Amherst, MA, USA.

⁴Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.

Received: 26 October 2013 Accepted: 3 February 2014

Published: 8 February 2014

References

- Lengeler C: Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, **2**:CD000363.
- Roll Back Malaria: *World Malaria Report*. Geneva: World Health Organization; 2005.
- Gamble C, Ekwari PJ, Garner P, ter Kuile FO: Insecticide-treated nets for the prevention of Malaria in pregnancy: a systematic review of randomised controlled trials. *PLoS Med* 2007, **4**:e107.
- WHO | WHOPES Recommendations and Reports of WHOPES Working Group Meetings. Geneva: World Health Organization; 2012 [http://www.who.int/whopes/recommendations/wgm/en/]
- Masum H, Shah R, Schroeder K, Daar A, Singer P: Africa's largest long-lasting insecticide-treated net producer: lessons from A to Z Textiles. *BMC Int Health Hum Rights* 2010, **10**:S6.

- Mejia P, Teklehaimanot H, Tesfaye Y, Teklehaimanot A: Physical condition of Olyset(R) nets after five years of utilization in rural western Kenya. *Malar J* 2013, **12**:158.
- Erlanger TE, Enayati AA, Hemingway J, Mshinda H, Tami A, Lengeler C: Field issues related to effectiveness of insecticide-treated nets in Tanzania. *Med Vet Entomol* 2004, **18**:153-160.
- Spencer S, Grant AD, Piola P, Tukpo K, Okia M, Garcia M, Salignon P, Genevier C, Kiguli J, Guthmann J-P: Malaria in camps for internally-displaced persons in Uganda: evaluation of an insecticide-treated bed-net distribution programme. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, **98**:719-727.
- Kilian A, Byamukama W, Pigeon O, Atieli F, Duchon S, Phan C: Long-term field performance of a polyester-based long-lasting insecticidal mosquito net in rural Uganda. *Malar J* 2008, **7**:49.
- Githinji S, Herbst S, Kistemann T, Noor AM: Mosquito nets in a rural area of Western Kenya: ownership, use and quality. *Malar J* 2010, **9**:250.
- Azondekon R, Gnanguenon V, Oke-Agbo F, Houeвоessa S, Green M, Akogbeto M: A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin. *Parasites Vectors* 2014, **7**:6.
- PNLP: *Campagne de distribution gratuite des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action aux ménages du Bénin*. Cotonou: Ministère de la Santé; 2012.
- WHO/HTM/NTD/WHOPES: *Guidelines for Monitoring the Durability of Long-Lasting Insecticidal Mosquito Nets under Operational Conditions*. Geneva: World Health Organization; 2011.
- Tableman M, Kim JS: *Survival Analysis Using S: Analysis of Time-to-Event Data*. Danvers: Chapman and Hall/CRC; 2003.
- Gnanguenon V, Azondekon R, Oke-Agbo F, Sovi A, Ossè R, Padonou G, Aikpon R, Akogbeto MC: Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets. *BMC Public Health* 2013, **13**:751.
- Kilian A: *Measurement of Net Durability in the Field: Current Recommended Methodology (presented in Lyon)*. Geneva: World Health Organization; 2012.
- Sexton AR: Best practices for an insecticide-treated bed net distribution programme in sub-Saharan eastern Africa. *Malar J* 2011, **10**:157.
- Sangaré LR, Weiss NS, Brentlinger PE, Richardson BA, Staedke SG, Kiwuwa MS, Stergachis A: Determinants of use of insecticide treated nets for the prevention of Malaria in pregnancy: Jinja, Uganda. *PLoS ONE* 2012, **7**:e39712.
- Mutuku FM, Khambira M, Bisanzio D, Mungai P, Mwanzo I, Muchiri EM, King CH, Kitron U: Physical condition and maintenance of mosquito bed nets in Kwale County, coastal Kenya. *Malar J* 2013, **12**:46.

doi:10.1186/1471-2334-14-69

Cite this article as: Gnanguenon et al.: Durability assessment results suggest a serviceable life of two, rather than three, years for the current long-lasting insecticidal (mosquito) net (LLIN) intervention in Benin. *BMC Infectious Diseases* 2014 **14**:69.

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



Autres publications

1. **Gnanguenon V**, Azondekon R, Oke-Agbo F, Sovi A, Ossè R, Padonou G, Aïkpon R, Akogbeto MC: Evidence of man-vector contact in torn long-lasting insecticide-treated nets. BMC Public Health 2013, 13:751.
2. Govoetchan R, **Gnanguenon V**, Ogouwalé E, Oké-Agbo F, Azondékon R, Sovi A, Attolou R, Badirou K, Youssouf RA, Ossè R, Akogbéto M: Dry season refugia for anopheline larvae and mapping of the seasonal distribution in mosquito larval habitats in Kandi, northeastern Benin. Parasites & Vectors 2014, 7:137.
3. Govoetchan R, **Gnanguenon V**, Azondékon R, Agossa RF, Sovi A, Oké-Agbo F, Ossè R, Akogbéto M: Evidence for perennial malaria in rural and urban areas under the Sudanian climate of Kandi, Northeastern Benin. Parasites & Vectors 2014, 7:79.
4. Ossè R, **Gnanguenon V**, Sèzonlin M, Aikpon R, Padonou G, Yadouleton A, Akogbeto M: Relationship between the presence of kdr and Ace-1 mutations and the infection with Plasmodium falciparum in Anopheles gambiae s.s. in Benin. J. November 2012. Parasitol Vector Biol 2012, 4:3139.
5. Agossa FR, Padonou GG, **Gnanguenon V**, Oké-Agbo F, Zola-Sahossi J, Dègnonvi H, Salako A, Sèzonlin M, Akogbéto MC: Laboratory and field evaluation of the impact of washings on the effectiveness of LifeNet®, Olyset® and PermaNet® 2.0 in two areas, where there is a high level of resistance of Anopheles gambiae to pyrethroids, Benin, West Africa. Malar J 2014, 13:193.
6. Tokponnon FT, Ogouyémi AH, Sissinto Y, Sovi A, **Gnanguenon V**, Cornélie S, Adéothy AA, Ossè R, Wakpo A, Gbénou D, Oke M, Kinde-Gazard D, Kleinschmidt I, Akogbeto MC, Massougbdji A: Impact of long-lasting, insecticidal nets on anaemia and prevalence of Plasmodium falciparum among children under five years in areas with highly resistant malaria vectors. Malaria Journal 2014, 13:76.
7. Sovi A, Djègbè I, Soumanou L, Tokponnon F, **Gnanguenon V**, Azondékon R, Oké-Agbo F, Okè M, Adéchoubou A, Massougbdji A, Corbel V, Akogbéto M: 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.

8. Aïzoun N, Azondekon R, Aïkpon R, **Gnanguenon V**, Osse R, Asidi A, Akogbéto M: Study of the efficacy of a Wheaton coated bottle with permethrin and deltamethrin in laboratory conditions and a WHO impregnated paper with bendiocarb in field conditions. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014, 4:492–497.
9. Aïzoun N, Aïkpon R, **Gnanguenon V**, Oussou O, Agossa F, Padonou G, Akogbéto M: Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato from the south and north Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 2013, 6:274.
10. Anagonou R, Agossa F, Azondékon R, Agbogan M, Oké-Agbo F, **Gnanguenon V**, Badirou K, Agbanrin-Youssouf R, Attolou R, Padonou GG, Sovi A, Ossè R, Akogbéto M: 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. *Parasites & Vectors* 2015, 8:117.
11. Ossè RA, Aïkpon R, Gbédjissi GL, **Gnanguenon V**, Sèzonlin M, Govoétchan R, Sovi A, Oussou O, Oké-Agbo F, Akogbéto M: A shift from indoor residual spraying (IRS) with bendiocarb to long-lasting insecticidal (mosquito) nets (LLINs) associated with changes in malaria transmission indicators in pyrethroid resistance areas in Benin. *Parasit Vectors* 2013, 6:73.
12. Tokponnon FT, Aholoukpe B, Denon EY, **Gnanguenon V**, Bokossa A, N'guessan R, Oke M, Gazard DK, Akogbeto MC: Evaluation of the coverage and effective use rate of long-lasting insecticidal nets after nation-wide scale up of their distribution in Benin. *Parasites & Vectors* 2013, 6:265.
13. Tokponnon F, Sissinto Y, Ogouyémi AH, Sovi A, **Gnanguenon V**, Adéothy AA, Wapo A, Aholoukpe B, Makoutodé P, Adéchoubou A, Ossè RA, N'Guessan R, Gbenou D, Oké M, Gazard DK, Massougbdji A, Akogbeto M: Assessment of long-lasting insecticidal net coverage, use and physical integrity one year after universal distribution campaign in Plateau department in SouthEast Benin. *Journal of Public Health and Epidemiology* 2014, 6:8–13.
14. Aïzoun N, Ossè R, Azondekon R, Alia R, Oussou O, **Gnanguenon V**, Aikpon R, Padonou GG, Akogbéto M: Comparison of the standard WHO susceptibility tests and the CDC bottle bioassay for the determination of insecticide susceptibility in malaria

- vectors and their correlation with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 2013, 6:147.
15. Padonou G, Gbedjissi G, Yadouleton A, Azondekon R, Razack O, Oussou O, **Gnanguenon V**, Aikpon R, Sezonlin M, Akogbeto M: Decreased proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae* s.l. populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa). *Parasites & Vectors* 2012, 5:262.
 16. Aizoun N, Azondekon R, Aikpon R, Anagonou R, **Gnanguenon V**, Akogbeto M: 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. *Journal of Cell and Animal Biology* 2014, 8:41–50.
 17. Sovi A, Govoétchan R, Tokponnon F, Hounkonnou H, Aikpon R, Agossa F, **Gnanguenon V**, Salako AS, Agossou C, Ossè R, Okè M, Gbénou D, Massougboji A, Akogbéto M: Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasit Vectors* 2013, 6:352.
 18. Aikpon R, Sovi A, Padonou GG, Oke-Agbo F, **Gnanguenon V**, Akogbéto M with Razaki Ossé: 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* 2013, 5:325–335.
 19. Aizoun N, Aikpon R, Padonou GG, Oussou O, Oké-Agbo F, **Gnanguenon V**, Ossè R, Akogbéto M: 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. *Parasites & Vectors* 2013, 6:223.
 20. Aizoun N, Aikpon R, Azondekon R, **Gnanguenon V**, Osse R, Padonou GG, Akogbeto M: Centre for Disease Control and Prevention (CDC) bottle bioassay: A real complementary method to World Health Organization (WHO) susceptibility test for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors. *Journal of Parasitology and Vector Biology* 2014, 6:42–47.

21. Agbanrin R, Padonou GG, Yadouleton A, Attolou R, Badirou K, Govoetchan R, **Gnanguenon V**, Sovi A, Anagonou R, Akogbeto M: Abundance and diversity of culicidae fauna at cotonou in southern benin abundance and diversity of culicidae fauna at cotonou in southern benin abundance and diversity of culicidae fauna at cotonou in southern benin. International Journal of Current Research 2015, 7:14085–14091.

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'H₂O - Ne pas vortexer - Laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une 1/2 journée)

CTAB 2%

Réactifs	Volume	Conc. finale
1 M Tris HCl pH 8.0	100 ml	100 mM
0.5 M EDTA	20 ml	10 mM
NaCl	81.8 g	1.4 M
CTAB*	20 g	2 %
ddH ₂ O	QSP 1 L	

* Cetyl trimethyl ammonium bromide

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à TA.

PCR diagnostique *An. gambiae* s.l.

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Elle distingue en Afrique de l'Ouest: *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*

Réf.: Scott JA, Brogdon W & Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993, 49(4):520-9.

Amorces

UN GTGTGCCGCTTCCTCGATGT
AG CTGGTTTGGTCGGCACGTTT
AA AAGTGTCTTCTCCATCCTA
AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

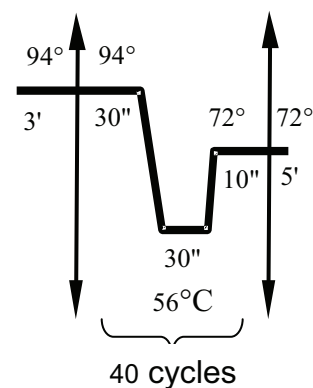
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05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

Amplification :

3' [30", 30", 10"]_{40c} 5' @ 56°C

Taille attendue

An. gambiae : 390 bp
An. arabiensis : 315 bp
An. melas : 464 bp



Formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

ISA, janv 2003

Polymorphisme d'un segment de l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Réf : Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I & Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol. 2001, 10(1):19-23.

Amorces

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
MgCl 25 mM	1 mM	1.0 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer R3 (10 µM)	7.5 pmoles	0.75 µl
Primer R5 (10 µM)	7.5 pmoles	0.75 µl
Primer Mop int (10 µM)	15 pmoles	1.5 µl
Primer B/S int (10 µM)	15 pmoles	1.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		14.45 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

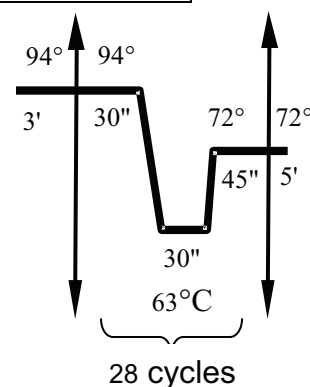
3' [30", 30", 45"]_{28c} 5' @ 63°C

Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



Mutation Kdr

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans un gène codant pour un canal à Na, associé à la résistance au DDT et aux pyréthrinoides.

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

Réf : Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998, 7(2):179-84.

Amorces

D1 ATAGATTCCCCGACCATG
D2 AGACAAGGATGATGAACC
D3 AATTTGCATTACTTACGACA
D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer D1 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D2 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D3 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Primer D4 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		14.75 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

3' [30", 30", 10"]_{35c} 5' @ 55°C

Taille attendue

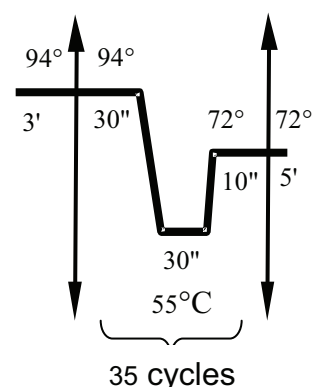
D1/D2 : 293 bp

D1/D3 : 195 bp

D2/D4 : 137 bp

Résistant

Sensible



Mutation Ace 1 chez *Anopheles*

Isa et Alphonsine, juin 2003

Polymorphisme dans le gène ace-1 qui code pour l'acétylcholine estérase Ache1.

La mutation se situe au niveau de l'AA 119, qui est une Gly chez les susceptibles et une Ser chez les résistants.

Réf : Weill, M. et al. (2003) Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423 (6936), 136-137

Amorces
Ex3AGdir GATCGTGGACACCGTGTTCG
Ex3AGrev AGGATGGCCCGCTGGAACAG

Conditions PCR

Avec la **Taq Quiagen** (Cat. N 201207), pour un volume final de **25 µl** par réaction

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer Ex3AGdir (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Primer Ex3AGrev (10 µM)	10 pmoles	1.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH ₂ O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

Amplification :

3' [30", 30", 30"]_{35c} 5' @ 62°C

Taille attendue

Ex3AG : 541 bp

Vérifier 5µl de produit de PCR sur gel d'agarose 1.5%

Digestion enzymatique

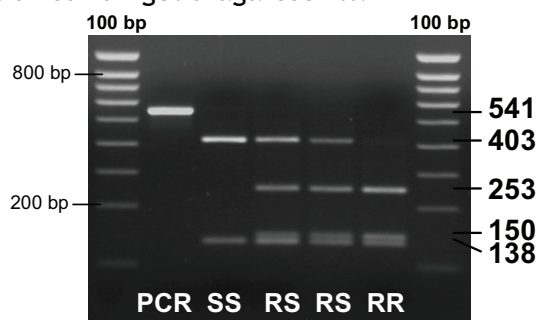
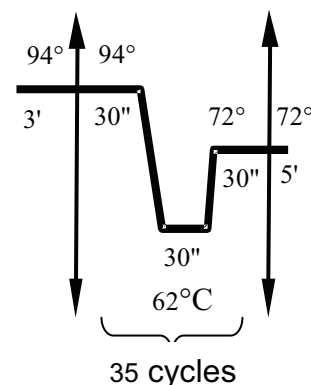
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH ₂ O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

Incuber à 37°C pendant 3 heures, voire toute la nuit.

Vérifier la réaction en faisant migrer 10µl de la digestion sur un gel d'agarose 2%.

Tailles attendues

Génotype	SS	RR
taille	403 bp 138 bp	253 bp 150 bp 138 bp



ELISA - CSP
(Circumsporozoite protein de Plasmodium)

DF, janv 2003

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

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

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

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

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

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

13 - METTRE 50 µl/puits de l'**ACm CONJUGUE**, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl) LAISSER 1 H sur paillasse

ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, : il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande

CONJUGUES Pour 1 plaque

p. falciparum : 7,5 µl/5 ml **BB**
p. vivax 210: 10 µl/5 ml **BB**
p. vivax 247 : 2 µl/5 ml **BB**
p. malariae 15 µl/5 ml **PBS**
p. ovale 15 µl/5 ml **BB**

Pour 3 plaques

f : 22,5 µl/15 ml **BB**
v 210 30 µl/15 ml **BB**
v 247 : 6 µl/15 ml **BB**
m : 45 µl/15 ml **PBS**
o : 45 µl/15 ml **BB**

14 - Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le **SUBSTRAT** de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

- * 5 mg d'**Ortho-tolidine** dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- * 30 ml de **Tampon citrate**
- * 12 µl de **H2O2** à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

15 - VIDER LA PLAQUE. **LAVER 4 FOIS AU PBS/TWEEN 20**

16 - METTRE 100 µl/puits de **SUBSTRAT**

17 - INCUBER 30 minutes A OBSCURITE SANS TOUCHER (coloration bleue 620 nm)

18 - Blocage par 50 µl d'**acide sulfurique 4N** : Coloration jaune :

19-Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa

Réactifs et quantités pour ELISA - CSP

DF, janvier 2003

* **PBS**

Reconstituer le PBS en poudre Sigma :

9,7 g dans 1 L d'eau distillée (ex réf. Sigma D 5773)

* **NP 40/BB** = Nonidet P40 (Sigma n° 3516, 50 ml) pour une plaque 2 ml = 25 µl NP 40 + 2 ml BB, agiter (préparer pour 5 plaques 10 ml + 125 µl NP 40)

* **BB** = Dans un litre PBS, ajouter :

- 1) 5 g de Casein (Sigma C 5890)
- 2) 0,1 g de Thiomérosal (Sigma T 5125)
- 3) 0,04 g de Phenol red (Sigma P 4758)
- 4) 10 g de BSA (Sigma A 7906)

AGITER 2H

(pour les calculs une plaque, moustiques à broyer compris : 100 ml de BB)

* **PBS/TWEEN 20** - 500 µl de Tween 20 dans 1l de PBS, agiter (Sigma P 1379)

Substrat de Peroxydase = Pour 3 plaques :

- * 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- * 30 ml de Tampon citrate
- * 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30%, ou 6 µl à 20%).

Tampon Citrate pH4

- préparer le Tampon Citrate pH4 : Pour 1 litre :

Acide citrique, 1 H ₂ O	11,77 g
Hydroxyde de Sodium	4,48 g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution. Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N. Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

RECONSTITUTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX LYOPHILISES (ACm)

* milieu reconstitution = 1/2 volume H₂O + 1/2 volume Glycérol (Sigma G.9012)

- 1,0 mg ACm + 2 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)
- 0,5 mg ACm + 1 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)
- 0,25 mg ACm + 0,5 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

QUANTITE D'ACM NECESSAIRE :

- Sensibilisation : ACm capture dans du **PBS**

DILUTIONS RECOMMANDEES PAR WIRTZ :

P. falciparum capture = 0.10µg / 50µl PBS (soit 10 µg par plaque : soit 20 µl par plaque dans 5 ml PBS)
P. vivax-210 capture = 0.025µg / 50µl PBS (soit 2,5 µg par plaque : soit 5 µl par plaque dans 5 ml PBS)
P. vivax-247 capture = 0.05µg / 50µl PBS (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml PBS)

CAPTURE Pour 1 plaque

p. falciparum : 15 µl/5 ml PBS
p. vivax 210 : 5 µl/5 ml PBS
p. vivax 247 : 10 µl/5 ml PBS
p. malariae : 60 µl/5 ml PBS
p. ovale : 15 µl/5 ml PBS

f :

v 210:

v 247 :

m :

o :

Pour 3 plaques

45 µl/15 ml PBS
15 µl/15 ml PBS
30 µl/15 ml PBS
180 µl/15 ml PBS
45 µl/15 ml PBS

- Révélation : ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**

DILUTIONS RECOMMANDEES PAR WIRTZ :

P. falciparum peroxidase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB)
P. vivax -210 peroxidase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB)
P. vivax -247 peroxidase = 0.01µg / 50µl BB (soit 1 µg par plaque : soit 2 µl par plaque dans 5 ml BB)

CONJUGUES Pour 1 plaque

p. falciparum : 7,5 µl/5 ml BB
p. vivax 210 : 10 µl/5 ml BB
p. vivax 247 : 2 µl/5 ml BB
p. malariae : 15 µl/5 ml BB
p. ovale : 15 µl/5 ml BB

f :

v 210

v 247 :

m :

o :

Pour 3 plaques

22,5 µl/15 ml BB
30 µl/15 ml BB
6 µl/15 ml BB
45 µl/15 ml BB
45 µl/15 ml BB

Les ACm sont fournis par le Dr WIRTZ, CDC Atlanta

TEMOINS

Dilutions pour les témoins positifs CSP antigène de *P. f.*, *P. v* 210 et *P. v* 247

Attention reconstitution du lyophilisat dans eau distillée, puis dilution dans BB

Ces témoins sont fournis par le CDC

Espèce plasmodiale	Numéro de la Solution	Volume de l'antigène controle positif	Volume de Blocking Buffer (BB)	Concentration en antigène dans 50 µl
<i>P. falciparum</i>	Stock	Pf lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist.	----
	I	5µl de stock	500µl BB	500ng
	II	10µl de I	1000µl BB	5000pg
	* III	20µl de II	1000µl BB	100pg
	Témoin pos			
<i>P. vivax 210</i>	Stock	Pv210 lyophilisé (25 µg)	25 µl d'eau dist	----
	A	5µl de stock	500µl BB	500ng
	B	10µl de A	1000µl BB	5000pg
	C	20µl de B	500µl BB	200pg
	* D	200µl de C	800µl BB	40pg
	Témoin pos			
<i>P. vivax 247</i>	Stock	Pv247 lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist	----
	1	5µl de stock	500µl BB	500ng
	2	40µl de 1	1000µl BB	20ng
	3	100µl de 2	700µl BB	2.5ng
	Témoin pos			

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

ABSTRACT

In many African countries like Benin, Long Lasting Insecticidal mosquito Nets (LLINs) are now being used to reduce the morbidity and mortality due to malaria by 75%. However, recent data on the evaluation of LLINs reveal that these mosquito nets no longer last long enough to protect the population. In order to improve this current method of protection in Benin, an evaluation of the effectiveness of LLINs needs to be conducted. This assessment must also include an evaluation of the transmission of malaria, help collect baseline data on the transmission of malaria, and the extent to which mosquitoes are resistant to insecticides. Such data will later help design quality interventions to better control malaria, especially when community practices are not compatible with efficient LLINs usage.

This study was conducted in 8 districts representing the main eco-epidemiological malaria regions in Benin. In those areas, the entomological indices of the transmission of malaria, the indices of susceptibility in malaria vectors to insecticides, as well as the indices of the durability of LLINs were monitored as recommended by the World Health Organization (WHO). The results show that *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles melas* and *Anopheles arabiensis* are the main vectors of the transmission of malaria with a spatio-temporal variation in their distribution. These species are responsible of 0 to 8 infected bites per human per night. Four malaria transmission profiles were observed: high transmission areas with a single transmission season (June – August), low transmission areas with two transmission seasons (March – August; October – November), intermediate transmission areas, and high transmission areas characterized by a continuous transmission of *Plasmodium falciparum*. Susceptibility tests showed a widespread distribution of vector resistance to deltamethrin (<90% mortality rate), a slightly lower resistance to Bendiocarb (90-97% mortality rate) and a full susceptibility to Pirimiphos methyl and Fenitrothion (98-100% mortality rate). Knock-down resistance (Kdr) frequencies ranged between 0.78 to 0.96 and 0.002 to 0.1 for acetylcholinesterase-1. As for the durability of mosquito nets, the study showed that the observed survival of the LLINs after 24 months was much lower than the expected durability of 3 years. In addition, the physical integrity of the LLINs still in use reveal that they are over used and needed to be replaced. Six environmental and human factors correlated to their rapid degradation.

This study revealed 4 entomological profiles of the transmission of malaria combined with a widespread distribution of vector resistance to Pyrethroids in Benin, an emerging resistance to Carbamates and a susceptibility to Organophosphates. It also showed that LLINs last about 2 years under field conditions.

Keywords: Malaria transmission, Indoor Residual Spraying (IRS), LLINs, resistance, insecticides, durability.

RESUME

Dans plusieurs pays africains comme le Bénin, l'approche de couverture universelle en moustiquaires imprégnées à longue durée d'action a été mise en place afin de réduire de 75% la mortalité et la morbidité liées au paludisme. Cependant, les données récentes sur l'évaluation des MIILD révèlent qu'elles ne durent pas assez longtemps pour protéger les populations. Pour atteindre et conserver un niveau élevé de couverture au Bénin, il est alors nécessaire de mettre en place une étude pour estimer la durée des MIILD dans les communautés. Cette étude devrait également permettre de disposer des données de base sur la transmission du paludisme et la résistance des vecteurs aux insecticides pouvant servir à la mise en œuvre d'une intervention de lutte plus adaptée au cas où le comportement d'une communauté ne serait pas compatible avec une utilisation efficiente des MIILD.

L'étude a été menée dans huit communes représentant les principales zones éco-épidémiologique du paludisme au Bénin. Dans ces localités, les indicateurs entomologiques de transmission du paludisme, de la sensibilité des vecteurs aux insecticides ainsi ceux de la durabilité des MIILD ont été suivis pendant environ trois ans selon les méthodes recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les résultats ont montré une variation spatio-temporelle de la distribution de *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles melas* et *Anopheles arabiensis*, principaux vecteurs identifiés. Ils assurent la transmission du paludisme avec environ 0 à 8 piqûres infectantes/homme/nuit. Quatre profils de transmission du paludisme ont été observés avec des localités à une saison de forte transmission (Juin - Août), des localités à deux saisons de faible transmission (Mars-août; Octobre-Novembre), des localités à saison de transmission modérée et des localités à forte saison de transmission continue de *Plasmodium falciparum*. Les tests de sensibilités ont montré une large distribution de la résistance des vecteurs à la deltaméthrine (mortalité <90%), un début de résistance au Bendiocarb (mortalités entre 90 et 97%) et une sensibilité totale au pirimiphos méthyl et au Fénitrothion (mortalités entre 98 et 100%). Les fréquences de la résistance Knock-down étaient de 0,78 à 0,96 et de 0,002 à 0,1 pour l'acétylcholinestérase-1 insensible. Quant à la durabilité des moustiquaires, elle a montré que le taux de survie observé, après 24 mois, est nettement inférieur à celui prévu pour une moustiquaire de trois ans. En outre, l'intégrité physique du tiers des moustiquaires encore présentes dans les ménages est tellement dégradée qu'elles ont besoin d'être remplacées. Six facteurs environnementaux et humains étaient corrélés à leur dégradation rapide.

Cette étude a révélé quatre grands faciès entomologiques de transmission du paludisme avec une large distribution de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes dans tout le Bénin, une émergence de la résistance aux carbamates et une sensibilité des vecteurs aux organophosphorés. Elle a également montré que dans les communautés, les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action durent environ deux ans.

Mots clés : Transmission du paludisme, PID, MIILD, résistance, insecticides, durabilité