



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



U.S. President's Malaria Initiative

US PRESIDENT'S MALARIA INITIATIVE ACTION TO REINFORCE MALARIA VECTOR CONTROL PROGRAM IN BENIN

Surveillance de l'évolution de la résistance vectorielle aux insecticides et caractérisation des mutations L1014F Kdr et G119S Ace-1 et de l'expression des gènes métaboliques chez *Anopheles gambiae* s.l. a long a transect south-north Benin.

Deliverable 4-2

October 2021

Coordonnateur: Professeur Martin C. Akogbéto, PI

Chercheur Associé: Dr Gil G. Padonou, Director CREC

Assistants: Hermann Sagbohan et Casimir Kpanou, MSc., PhD students

Collaboration: National Malaria Control Program

Plan du rapport

Introduction.....	9
<i>1- Objectives de l'étude.....</i>	<i>9</i>
<i>2- Site de l'étude.....</i>	<i>9</i>
3- Protocole de l'OMS sur les tests de sensibilité aux insecticides	12
4- Identification moléculaire des espèces <i>An. gambiae</i> s.l. testées et caractérisation moléculaire des gènes de résistance <i>kdr</i> L1014F et <i>Ace-1</i> G119S.....	12
5- Analyses biochimiques	13
6- Analyses statistiques.....	13
7- Résultats.....	14
<i>Conclusion</i>	<i>25</i>
<i>Défis</i>	<i>26</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>26</i>

Table des matières

Plan du rapport	2
Table des matières.....	3
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	6
Abréviations.....	7
Introduction.....	8
1- Objectives de l'étude.....	8
2- Site de l'étude.....	8
Tableau I : GPS coordinates of the twelve study data collection sites.....	9
Figure 1: Carte du Bénin montrant les communes de collecte des larves de <i>An. gambiae</i> s.l.	10
3- Protocole de l'OMS sur les tests de sensibilité aux insecticides	11
- Tests de sensibilité aux insecticides de l'OMS	11
4- Identification moléculaire des espèces <i>An. gambiae</i> s.l. testées et caractérisation moléculaire des gènes de résistance <i>kdr</i> L1014F et <i>Ace-1</i> G119S.....	11
5- Analyses biochimiques	12
6- Analyses statistiques.....	12
7- Résultats.....	14
1. Statut de résistance de <i>An. gambiae</i> s.l. à une dose 1x de pyréthrianoïdes (deltaméthrine, perméthrine et alpha cyperméthrine), de bendiocarbe, de DDT et de P-méthyl selon les méthodes de test de l'OMS	13
2. Evolution de la résistance des vecteurs aux insecticides.....	21
Tableau V: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des multiples de concentrations diagnostiques de pyréthrianoïdes avec PBO et bendiocarbe en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.....	22

Figure 2: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des concentrations diagnostiques multiples de pyréthri-noïdes sans PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	15
Figure 3: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des concentrations diagnostic des pyréthri-noïdes avec PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes regions	15
Figure 4: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des concentrations diagnostiques de DDT, de bendiocarbe et de P-méthyle en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	16
Figure 5: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à de multiples concentrations diagnostiques de deltaméthrine avec PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	22
Figure 6: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à de multiples concentrations diagnostiques de perméthrine et d'alphacyperméthrine avec du PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	23
Figure 7: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. la concentration diagnostique d'alpha cyperméthrine en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes regions	24
Figure 8: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à la concentration diagnostique de bendiocarb en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	25
 b- Caractérisation des formes moléculaires et des gènes de résistance (Kdr et Ace-1R) dans les 12 communes	16
Tableau III: Distribution des gènes de résistance chez <i>An. gambiae</i> , <i>An. coluzzii</i> et <i>An. arabiensis</i> dans les douze communes	17
 c- Activités enzymatiques (MFO, estérase et GST) entre les 12 populations sauvages et Kisumu	17

✓ Activité des estérases non spécifique (α et β estérases)	17
✓ Activité des Oxidases à fonction mixte.....	17
✓ Activité du Glutathione S-transférase (GST)	17

Tableau IV: Activités moyennes (\pm SE) des oxydases à fonction mixte, des glutathion-S-transférases et des estérases dans les populations de <i>An. gambiae</i> s.l.....	18
---	----

Tableau V: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des multiples de concentrations diagnostiques de pyréthrinoides avec PBO et bendiocarbe en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.....	22
---	----

Conclusion	20
-------------------------	----

Défis	21
--------------------	----

Références bibliographiques	21
--	----

Liste des figures

Figure 1: Carte du Bénin montrant les communes de collecte des larves de <i>An. gambiae</i> s.l.	10
Figure 2: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des concentrations diagnostiques multiples de pyréthri-noïdes sans PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	15
Figure 3: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des concentrations diagnostic des pyréthri-noïdes avec PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes regions	15
Figure 4: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des concentrations diagnostiques de DDT, de bendiocarbe et de P-méthyle en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	16
Figure 5: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à de multiples concentrations diagnostiques de deltaméthrine avec PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	22
Figure 6: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à de multiples concentrations diagnostiques de perméthrine et d'alphacyperméthrine avec du PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	23
Figure 7: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. la concentration diagnostique d'alpha cyperméthrine en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes regions	24
Figure 8: Taux de mortalité après exposition de huit populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à la concentration diagnostique de bendiocarb en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions	25

Liste des tableaux

Tableau I : GPS coordinates of the twelve study data collection sites.....	9
Tableau II: Taux de mortalité après exposition de douze populations de <i>An. gambiae</i> s.l. à des multiples de concentrations diagnostiques de pyréthrinoïdes avec PBO et bendiocarbe en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.....	14
Tableau III: Distribution des gènes de résistance chez <i>An. gambiae</i> , <i>An. coluzzii</i> et <i>An. arabiensis</i> dans les douze communes	17
Tableau IV: Activités moyennes (\pm SE) des oxydases à fonction mixte, des glutathion-S-transférases et des estérases dans les populations de <i>An. gambiae</i> s.l.....	18
Tableau V: Taux de mortalité après l'exposition de treize populations d' <i>An. gambiae</i> s.l. à des multiples de concentrations diagnostiques de pyréthroïdes avec et sans PBO et bendiocarbe en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.....	22

Abréviations

ASS: Health Statistics Yearbook

al. : Collaborateurs

s. l : Senu lacto (sens large)

Ace-1 : Acetylcholinesterase

Ace-1R : Acetylcholinesterase Resistant

An. gambiae : *Anopheles gambiae*

Kdr : knock-down resistance

AChE : L'acetylcholinesterase

DNA : Deoxyribo nucleic acid

CREC : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

MILD : Long Lasting Impregnated Mosquito Net

WHO : World Health Organisation

IRS : Indoor residual spray

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

MS : Ministère de la Santé

GST : Glutathion S-Transférase

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

CDC: Center for disease control and prevention.

1. Introduction

Au Bénin, l'exposition de diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l. à des doses d'insecticides (perméthrine, deltaméthrine) 2 et 5 fois supérieures à la dose diagnostique n'a pas tué le nombre total de moustiques testés, ce qui signifie que le Bénin est caractérisé par une forte résistance des vecteurs. En revanche, la combinaison de la dose diagnostique avec le PBO n'a que partiellement aboli la résistance, montrant une résistance très élevée chez *An. gambiae* s.l. La deuxième étape que nous avons étudiée l'année dernière est l'implication de cette forte intensité de résistance aux insecticides pour la lutte antivectorielle. Nous avons évalué la réponse des moustiques survivants après exposition à de fortes concentrations d'insecticides et à la combinaison insecticides + PBO contre différents types de MILD. Les résultats obtenus ont montré que la résistance métabolique est un des facteurs de résistance des vecteurs au Bénin. Mais, les méthodes que nous avons utilisées pour caractériser ce mécanisme (bouteilles CDC, méthode spectrophotométrique) donnent généralement une réponse qualitative insuffisante pour indiquer le niveau de résistance métabolique. Cette année, les activités se concentrent sur l'évolution de la résistance aux insecticides au Bénin et la caractérisation des gènes métaboliques exprimés chez *An. gambiae* s.l. grâce au nouvel équipement reçu de USAID et Unitaid (New Nets Projet). L'objectif est d'identifier les régions où les moustiquaires insecticides à longue durée d'action (MILD) de nouvelles générations (PermaNet 3.0, Olyset Plus et autres) doivent être distribuées en priorité au Bénin.

2- Objectifs de l'étude

- ✓ Réaliser la sensibilité d'*An. gambiae* à différentes classes d'insecticides en utilisant la méthode de l'OMS ;
- ✓ Caractériser les mutations L1014F Kdr et G119S Ace-1 associées à la résistance aux insecticides chez *An. gambiae* dans les différentes zones écologiques ;
- ✓ Caractériser la mutation de résistance N1575Y chez *An. gambiae*.
- ✓ Caractériser l'expression de L119F-GSTe2 et CYP6 chez *An. gambiae*.
- ✓ Evaluer la carte des gènes métaboliques exprimés chez *An. gambiae* comme base de données pour identifier les régions où les moustiquaires de nouvelles générations doivent être distribuées en priorité au Bénin.

Site d'étude

L'étude a été réalisée dans 12 districts choisis le long d'un transect sud-nord, un district par département. Les 6 districts retenus pour le profil entomologique de la transmission du paludisme en 2020 ont été retenus : N'dali (Borgou), Bantè (Collines), Za-Kpota (Zou), Sèmè (Ouémé),

Abomey-Calavi (Atlantique), Pobè (Plateau). Elles étaient complétées par Natitingou (Atacora), Bassila (Donga), Banikoara (Alibori), Cotonou (Littoral), Azovè (Kouffo), Lokossa (Mono). (Tableau I).

La carte ci-dessous (Figure 1) montre les 12 communes couvertes par cette étude.

Tableau I : Coordonnées GPS des douze sites de collecte de données de l'étude

Departement	Communes	Latitude/ Longitude	
Littoral	Cotonou	06°22'26.76"N, 02°27'32.4"E	
Ouémé	Sème-Podji	456100	705450
Alibori	Banikoara	436135	1263304
Borgou	N'Dali	09°52'21.108"N, 02°37'24.632"E	
Zou	Zakpota	411687	797073
Collines	Bantè	08°24'37.312"N, 01°53'11.38"E	
Atlantique	Abomey-Calavi	428206	712539
Mono	Lokossa	355255	737752
Couffo	Azovè	356918	767465
Plateau	Pobè	463741	771586
Collines	Bassila	353026	996036
Atacora	Natitingou	324409	1131859

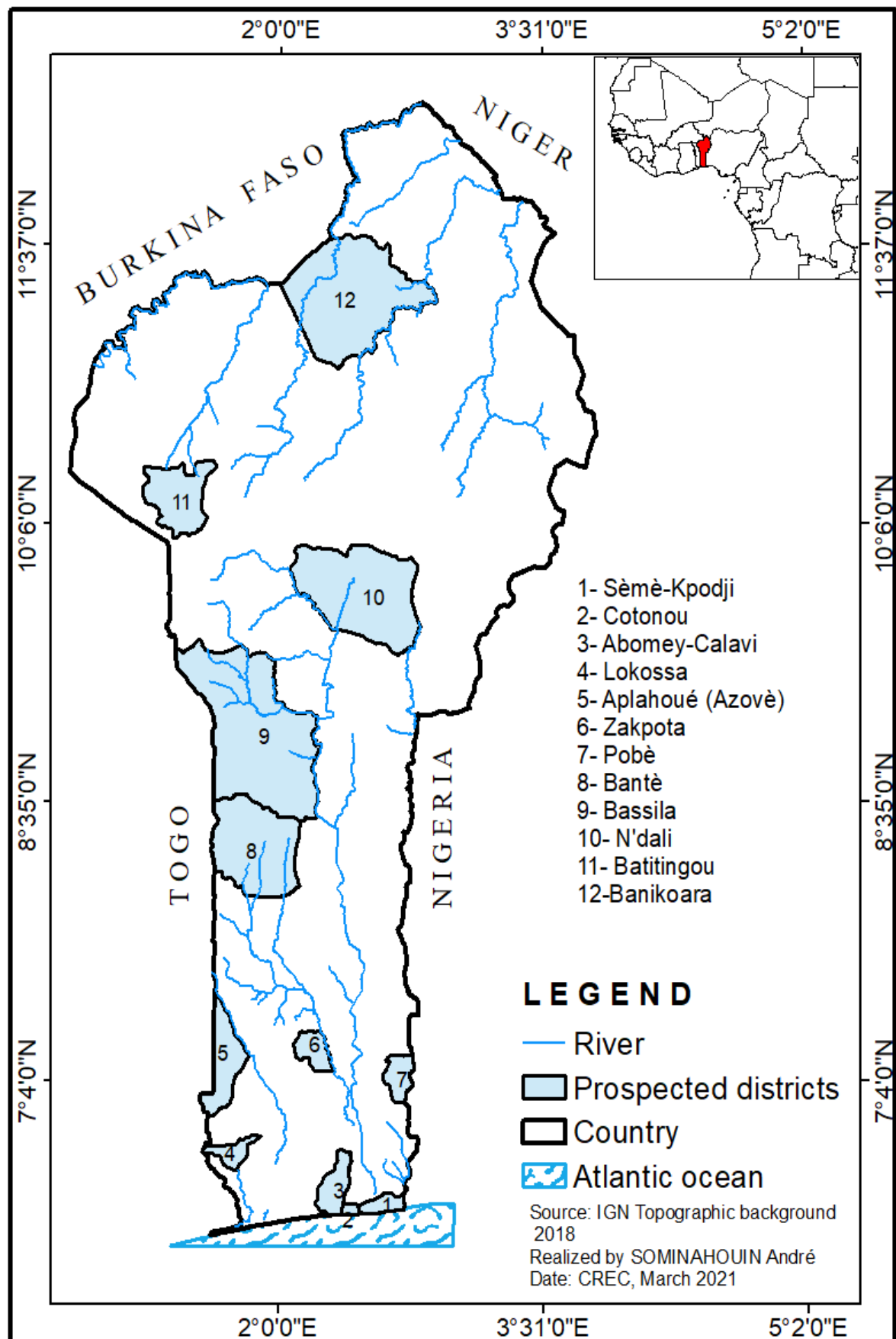


Figure 1 : Carte du Bénin montrant les communes de collecte des larves de *An. gambiae* s.l.

3- Protocole de l'OMS sur les tests de sensibilité aux insecticides

- Tests de sensibilité aux insecticides de l'OMS

Les tests de sensibilité dans les tubes de l'OMS ont été réalisés conformément au protocole de l'OMS (OMS, 2013) avec des moustiques *An. gambiae* s.l. femelles non gorgées âgées de 2 à 5 jours. Ces moustiques ont été exposés à des papiers imprégnés de différentes classes d'insecticides dont des pyréthrinoides (deltaméthrine, perméthrine, alpha cyperméthrine) ; des organophosphorés (pirimiphos-méthyl) ; des carbamates (bendiocarb) ; des organochlorés (DDT) puis des pyréthrinoides associés au BAP. Ces insecticides sont les mêmes que ceux utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires et la pulvérisation intérieure au Bénin. Pour chaque dose d'insecticide, une vingtaine de moustiques ont été introduits dans chaque tube garni de papier imprégné d'insecticide. Il y avait quatre tubes à essai garnis de papier imprégné et deux tubes témoins garnis de papier non imprégné. Pendant l'exposition d'une heure, le nombre de moustiques qui sont tombés sur le dos (effet de choc) à différents intervalles de temps (0, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) a été enregistré. Un lot de moustiques (20-25) exposés à des papiers non imprégnés a servi de témoin. Après 60 minutes d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes d'observation contenant chacun du papier non traité (25°C et 80% d'humidité) avec un accès libre à du jus sucré (10% de jus de miel). La mortalité après 24 heures a été déterminée et interprétée selon le protocole de l'OMS (OMS, 2013). A la fin des tests, les spécimens vivants et morts ont été utilisés pour l'identification moléculaire des espèces et la détermination des mécanismes de résistance (*kdr* L1014F et *G119S ace-1R*) par la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction).

4- Identification moléculaire des espèces *An. gambiae* s.l. testées et caractérisation moléculaire des gènes de résistance *kdr* L1014F et *Ace-1* G119S

Les moustiques vivants et morts (25 vivants et 25 morts) issus des tests de sensibilité ont été analysés par PCR selon le protocole de Santolamazza et al. (2008) pour la détermination des espèces moléculaires du complexe *An. gambiae* s.l. présent sur les dix sites. Les génotypes de la mutation *kdr* L1014F du canal sodique associée à la résistance aux insecticides pyréthrinoides et de la mutation *Ace-1* G119S associée à la résistance aux carbamates et organophosphorés ont été déterminés selon les protocoles de Martinez et al. (1998) et Weill et al. (2004), respectivement. La fréquence allélique de ces deux mutations a été évaluée sur chaque site pour voir la corrélation existante avec la résistance phénotypique.

5- Analyses biochimiques

Environ 30 à 50 femelles de *An. gambiae* s.l. (F1) de chaque site, âgées de 2 à 5 jours et n'ayant jamais été utilisées pour aucun test insecticide, ont été utilisées pour les analyses biochimiques. Avant ces analyses, ces spécimens de moustiques ont été conservés à -80°C dans des tubes de micro centrifugation secs. Des analyses enzymatiques biochimiques ont été réalisées pour comparer le niveau d'activité des oxydases mixtes (MFO), des estérases non spécifiques (α et β -estérases) et des glutathion S-transférases (GST) dans différentes populations de moustiques comparées de *An. gambiae* s.s. Kisumu, une souche de laboratoire sensible.

6- Analyses statistiques

Le statut de résistance des vecteurs du paludisme est déterminé selon les critères de l'OMS (OMS, 2013). Lorsque le taux de mortalité de la population *An. gambiae* s.l. après 24 heures est compris entre [98;100], la population *An. gambiae* s.l. est sensible, lorsqu'il est compris entre [90;97], la population *An. gambiae* s.l. est suspectée de résistance et cette résistance reste à confirmer, et enfin elle est qualifiée de résistante lorsque le taux de mortalité est inférieur à 90%.

Les tests d'analyse de variance à sens unique couplés au test de comparaison multiple de Tukey nous ont permis de comparer les valeurs moyennes des activités enzymatiques (estérases, oxydases et GST) entre les souches de terrain et entre la souche de référence Kisumu et les souches de terrain. Les taux de mortalité et les fréquences alléliques des gènes *kdr-ouest* et *Ace-1R* ont été analysés pour évaluer leur variabilité au sein des différentes populations. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R 2.15.

7. Résultats

1. Les tests de sensibilité au tube de l'OMS ont été réalisés sur douze (12) populations de vecteurs du paludisme (*An. gambiae* s.l.) collectées dans 12 communes différentes. Il s'agit de Cotonou, Bantè, N'Dali, Sèmè-Podji, Bassila, Abomey-Calavi, Lokossa, Azovè, Zakpota, Pobè, Natitingou et Banikoara. Les résultats observés et le statut de résistance de ces populations sont résumés dans les tableaux ci-dessous.

a- Statut de résistance de *An. gambiae* s.l. à une dose 1x de pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine et alpha cyperméthrine), de bendiocarbe, de DDT et de P-méthyl selon les méthodes de test de l'OMS.

Les résultats des tests de sensibilité de *An. gambiae* s.l. effectués selon la méthode du tube à essai de l'OMS à la dose standard de 1x de pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine et alpha cyperméthrine) montrent une résistance généralisée dans les douze communes où des collectes de larves ont été effectuées (Tableau I et Figure 2). Lorsque le PBO a été combiné avec des doses standard de pyréthrinoïdes, une augmentation marquée du taux de mortalité a été observée, mais sans tuer tous les moustiques (Tableau I et Figure 3). Cependant, pour la deltaméthrine combinée au PBO, nous avons enregistré un taux de mortalité supérieur à 90% dans les communes de N'dali, Azovè, Bantè, Lokossa, Bassila, Abomey-calavi, Natitingou et Banikoara. Avec la perméthrine combinée au PBO, la mortalité était supérieure à 90 % à N'dali, Bantè, Lokossa, Bassila, Abomey-calavi, Natitingou et Banikoara. Lorsque le PBO était combiné à l'alphacyperméthrine, les localités de Bantè, Bassila, Pobè, Zakpota, Abomey-calavi, Natitingou et Banikoara présentaient un taux de mortalité supérieur à 90%. Pour le bendiocarbe, *An. gambiae* s.l. collecté dans les différentes communes était suspecté d'être résistant (Sèmè-kpodji, N'dali, Bantè, Bassila, Pobè, Zakpota, Natitingou et Banikoara) sauf dans certaines communes comme Cotonou, Azovè, Lokossa et Abomey-Calavi. *An. gambiae* s.l. est très résistant au DDT alors qu'il présente une sensibilité totale au pyrimiphos-méthyl dans toutes les communes où des larves ont été collectées (Tableau II et Figure 4).

Tableau II: Taux de mortalité après exposition de douze populations de *An. gambiae* s.l. à des concentrations diagnostiques de pyréthrinoïdes avec PBO et bendiocarbe en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

	WHO test											
	Cotonou	Sèmé-Kpodji	Azovè	N'Dali	Bantè	Lokossa	Bassila	Pobè	Zakpota	Abomey-Calavi	Natitingou	Banikoara
Insecticides	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate	Mortality rate
Delta 1x	32.29%	45.34%	47.19%	34.78%	60.86%	45.05%	44.79%	31.52%	34.56%	40.90%	30.76 %	24.74%
Delta 1x+ PBO	79.34%	79.31%	94.00%	90.24%	98%	97%	97.91%	96.70%	88.42%	92.63%	92.22%	91.57%
Per 1x	36.90%	38.75%	42.64%	42.85%	47%	40.00%	55%	30.10%	48.27%	37.50%	52.94%	32.00%
Per 1x + PBO	61%	77.10%	70.93%	93.33%	95.91%	69.38%	96%	80.85%	82%	91.02%	90.12%	92.47%
Alpha 1x	45.31%	50.61%	38.63%	36.98%	50.00%	30.64%	51.56%	23.52%	52.27%	45.00%	50.00%	37.11%
Alpha 1x + PBO	76.04%	68%	79.45%	84.52%	92.22%	75.75%	96%	92.13%	90.62%	94.00%	93.90%	88.37%
Bendiocarb	98.63%	95%	100%	95.65%	93.18%	100%	91.17%	93.13%	96.42%	100%	95.87%	97.62%
P-methyl	100%	99%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	98.82%	100%	100%
DDT	08.57%	03.22%	03.70%	05.88%	06.84%	02.38%	04%	00%	01.11%	09.75%	04.00%	02.38%

P-value of the chi-square test for comparison of mortalities due to insecticide doses, according to locality. In the columns, the proportions of mortalities assigned to different letters differ statistically, P <0,0001.

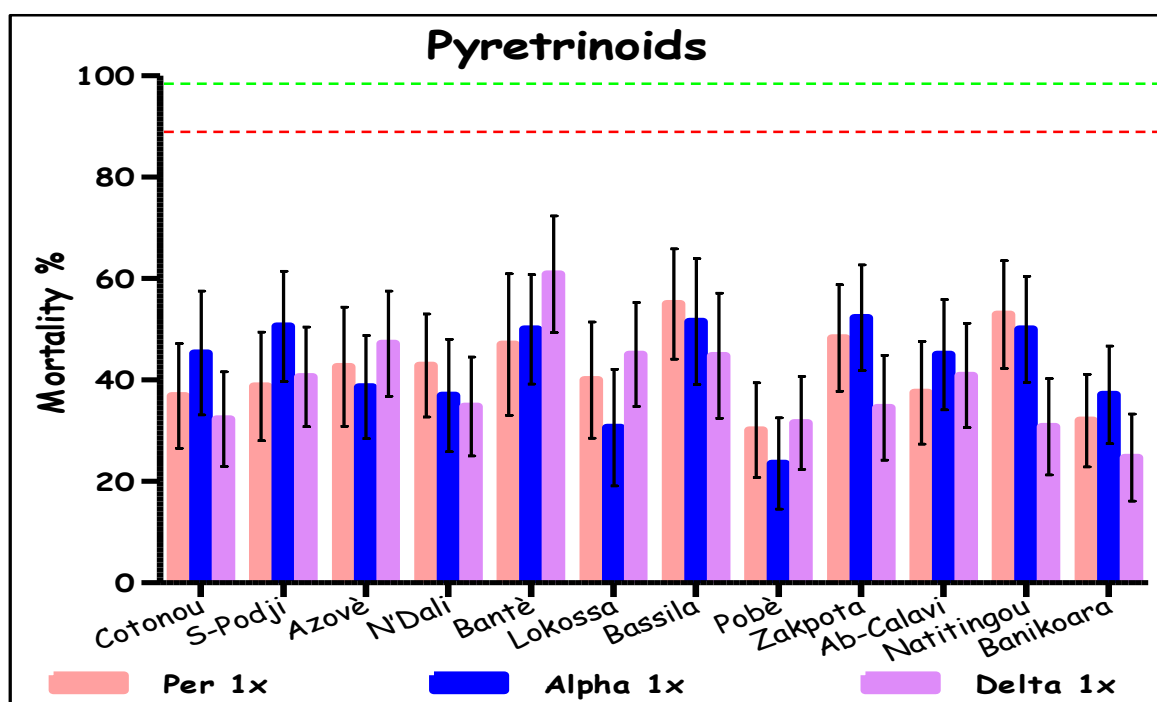


Figure 2: Taux de mortalité après exposition de douze populations de *An. gambiae* s.l. à des concentrations diagnostiques multiples de pyréthrinoïdes sans PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

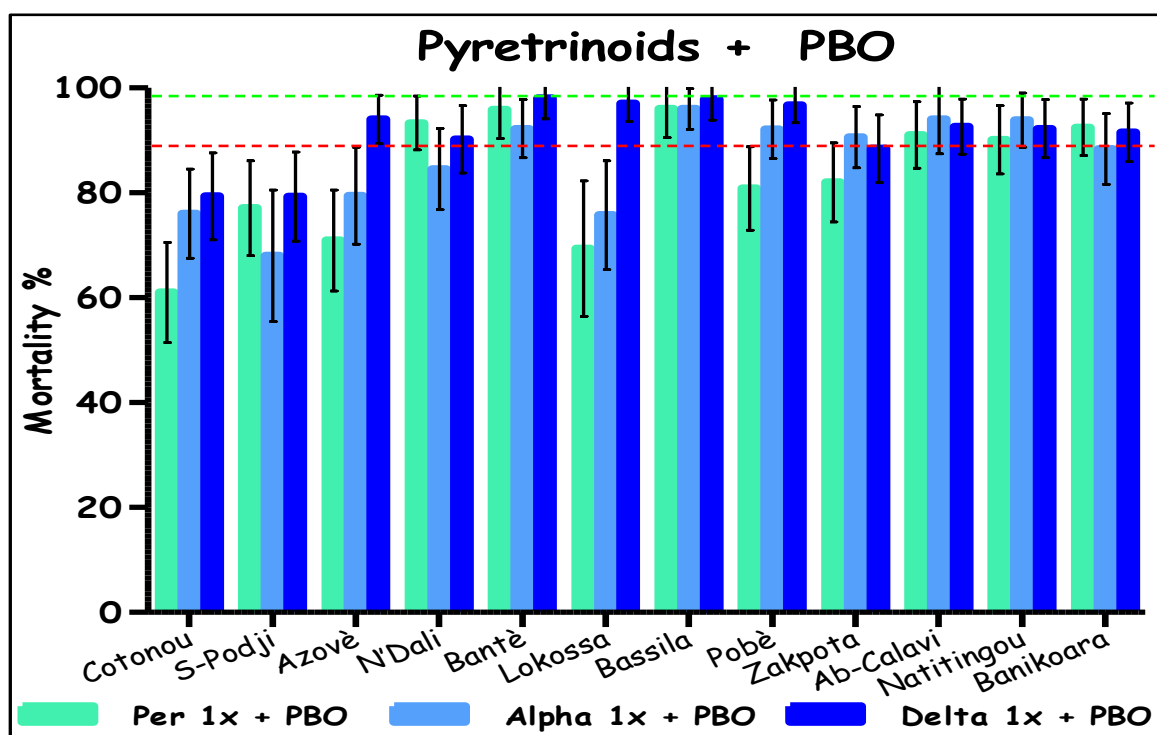


Figure 3: Taux de mortalité après exposition de douze populations de *An. gambiae* s.l. à des concentrations diagnostic des pyréthrinoïdes avec PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes regions.

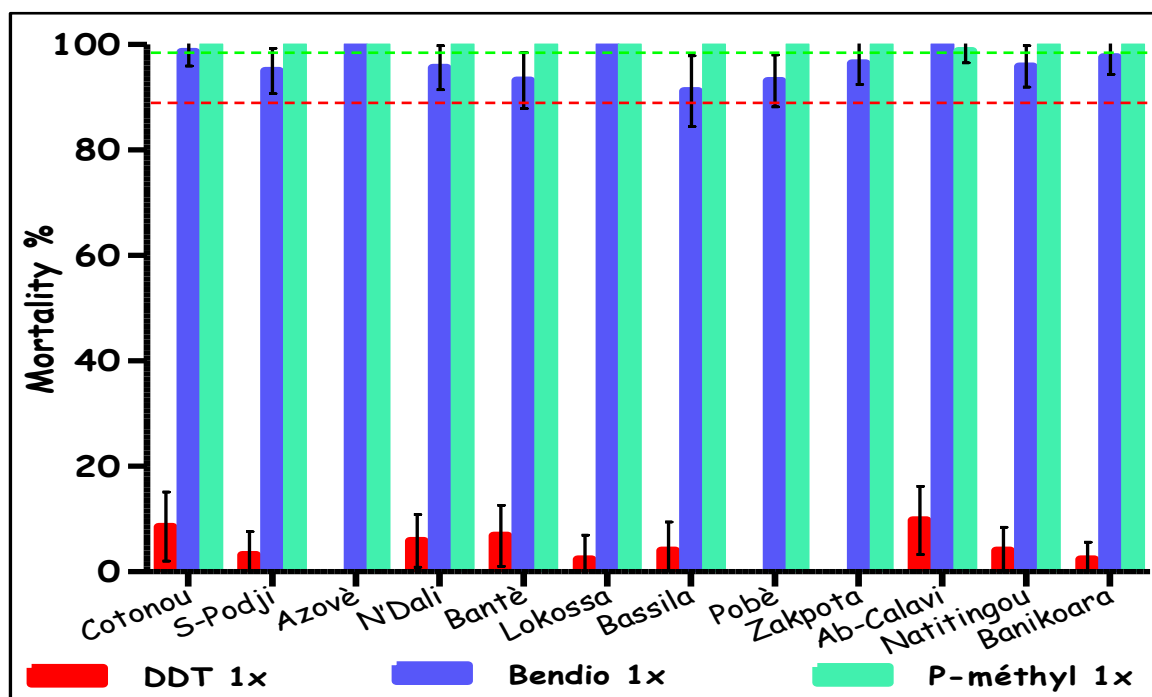


Figure 4: Taux de mortalité après exposition de douze populations de *An. gambiae* s.l. à des concentrations diagnostiques de DDT, de bendiocarbe et de P-méthyle en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

b- Caractérisation des formes moléculaires et des gènes de résistance (Kdr et Ace-1R) dans les 12 communes

La distribution de *An. gambiae* s.l. montre la présence de trois espèces principales : *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* avec des proportions très élevées pour *An. gambiae* et *An. coluzzii* dans presque toutes les localités sauf à Cotonou, Sèmè-Podji et Abomey-Calavi où tous les anophèles analysés sont *An. coluzzii*. Tous les moustiques collectés à Cotonou en 2021 sont des *An. Coluzzii* contrairement au résultat de 2019 où ils étaient tous des *An. gambiae*. Ce résultat serait dû à la période de collecte des larves qui n'est pas la même pour les deux tests. En 2019, la collecte des larves a été faite pendant la saison des pluies (juin-juillet). En 2021, la collecte a été faite en saison sèche (novembre-décembre).

La fréquence de l'allèle L1014F du gène *Kdr* est élevée dans toutes les localités. La fréquence la plus faible du gène de résistance *Kdr* est observée à Bassila (0,66) et la plus élevée à Banikoara (0,92). Contrairement au gène de résistance *Kdr*, la fréquence de l'allèle G119S du gène *Ace-1R* est très faible dans toutes les localités étudiées. Les analyses statistiques révèlent qu'il n'y a pas de différence significative entre les fréquences des gènes des différentes localités étudiées (Tableau III).

Tableau III: Distribution des gènes de résistance chez *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* dans les douze communes.

Locality	Moléculary form			Mutation Kdr					Mutation Ace-1R				
	<i>An. Arabiensis</i>	<i>An. Coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	RR	RS	SS	F. Kdr	P-value	RR	RS	SS	F. Ace-1	P-value
Cotonou	00	50	00	38	10	02	0.86^a	0.155	00	00	50	0.00^a	0.612
Sèmè-Podji	00	50	00	39	10	01	0.88^a		00	00	50	0.00^a	
Azovè	01	11	38	39	10	01	0.88^a		00	02	48	0.02^a	
N'Dali	00	00	50	39	09	02	0.87^a		00	01	49	0.01^a	
Bantè	00	04	46	35	12	03	0.82^a		00	02	47	0.02^a	
Lokossa	00	34	16	36	11	03	0.83^a		00	01	49	0.01^a	
Bassila	00	00	50	33	11	06	0.77^a		00	03	47	0.03^a	
Pobè	00	13	37	41	08	01	0.90^a		00	03	47	0.03^a	
Zakpota	00	07	43	33	12	05	0.78^a		00	03	47	0.03^a	
Abomey-Calavi	00	50	00	38	10	02	0.86^a		00	02	48	0.02^a	
Natitingou	00	05	45	42	04	04	0.88^a		00	07	43	0.07^a	
Banikora	00	00	50	44	04	02	0.92^a		00	06	44	0.06^a	

P value du test de chi-deux pour la comparaison des fréquences kdr et Ace, selon la localité. Dans les colonnes, les fréquences affectées de la même lettre ne diffèrent pas.

c- Activités enzymatiques (MFO, estérase et GST) entre les 12 populations sauvages et Kisumu

✓ *Activité des estérases non spécifiques (α et β estérases)*

Les activités des estérases non spécifiques (α et β) analysées au spectrophotomètre montrent une surexpression de ces enzymes de détoxification dans les populations de Lokossa, Azovè, Cotonou, Natitingou et Banikoara par rapport à la souche Kisumu ($p < 0,0001$) (Tableau IV).

✓ *Activité des oxydases à fonction mixte*

L'activité oxydase à fonctions mixtes est plus élevée dans les populations de Cotonou, Azovè, Lokossa, Abomey-Calavi, Natitingou et Banikoara par rapport à la souche sensible de laboratoire Kisumu ($p < 0,0001$) (Tableau IV).

✓ *Activité du glutathion S-transférase (GST)*

La plus forte activité glutathion S-transférase (GST) a été observée dans les populations de Cotonou, N'Dali, Bantè, Bassila, Pobè, Abomey-Calavi et Banikoara par rapport à la souche sensible de Kisumu ($p < 0,0001$) (Tableau IV).

Tableau IV: Activités moyennes (\pm SE) des oxydases à fonction mixte, des glutathion-S-transférases et des estérases dans les populations d'*An. gambiae* s.l..

Strain	α -Esterase	β -Esterase	MFO	GST
	(μ mol α Naph/ /min/mg protein)	(μ mol β Naph /min /mg protein)	(nmol/P450/min/mg protein)	(nmol/GSH conj /min/mg protein)
Kisumu	0.104 \pm 0.013	0.096 \pm 0.011	0.051 \pm 0.009	0.228 \pm 0.033
Cotonou	0.098 \pm 0.018	0.110 \pm 0.024	0.103 \pm 0.018	0.377 \pm 0.051
Sèmè-Podji	0.108 \pm 0.010	0.121 \pm 0.010	0.054 \pm 0.006	0.213 \pm 0.053
Azovè	0.147 \pm 0.019	0.134 \pm 0.023	0.070 \pm 0.015	0.310 \pm 0.043
N'Dali	0.110 \pm 0.030	0.120 \pm 0.042	0.056 \pm 0.013	0.370 \pm 0.064
Bantè	0.101 \pm 0.021	0.112 \pm 0.024	0.042 \pm 0.007	0.504 \pm 0.052
Lokossa	0.167 \pm 0.048	0.154 \pm 0.039	0.070 \pm 0.010	0.230 \pm 0.048
Bassila	0.190 \pm 0.024	0.192 \pm 0.040	0.057 \pm 0.008	0.471 \pm 0.093
Pobè	0.117 \pm 0.015	0.125 \pm 0.024	0.063 \pm 0.006	0.445 \pm 0.065
Zakpota	0.136 \pm 0.015	0.143 \pm 0.019	0.037 \pm 0.009	0.223 \pm 0.030
Abomey-Calavi	0.144 \pm 0.025	0.137 \pm 0.023	0.072 \pm 0.016	0.355 \pm 0.053
Natitingou	0.128 \pm 0.018	0.140 \pm 0.028	0.092 \pm 0.017	0.356 \pm 0.116
Banikoara	0.133 \pm 0.014	0.139 \pm 0.014	0.080 \pm 0.019	0.432 \pm 0.082
One Way ANOVA	F=06.481; df=12, 339; P<0.0001	F=03.707; df=12, 339; P<0.0001	F=09.027; df=12, 339; P<0.0001	F=14.470; df=12, 339; P<0.0001

MFO = mixed function oxidases, GST = glutathione-S-transférase ; P<0,05, test de Tukey. *Augmentation significative des différences moyennes par rapport à la souche de référence du laboratoire, P<0,05, test.

2. Evolution de la résistance des vecteurs aux insecticides

A partir du troisième trimestre de l'année 2021, nous avons entamer notre surveillance de routine de la résistance des vecteurs aux principaux insecticides dans treize communes (Cotonou, Malanville, Parakou, Kandi, Porto-Novo, Bohicon, Missérété, Allada, Ouidah, Savè, Dassa, Bantè et N'Dali) sur le transect sud-nord du Bénin. Sur les treize communes, nous avons parcouru huit pour le moment en raison de la rareté des gîtes larvaires dans certaines communes (Savè, Dassa, N'Dali, Ouidah et Bantè). Les résultats de la sensibilité d'*An. gambiae* s.l. par la méthode du test en tube de l'OMS à 1 et 2 doses de perméthrine, deltaméthrine et alpha cyperméthrine ont montré une résistance généralisée dans les huit communes où les enquêtes larvaires ont été réalisées (Tableau V et Figures 5 à 7). Lorsque nous avons associé le PBO à ces insecticides, une nette augmentation du taux de mortalité de ces vecteurs a été observée, mais la résistance était toujours présente. Pour le Bendiocarb (Tableau V et Figure 8), seules les populations d'anophèle de la commune de cotonou se sont révélées résistantes, celles des autres communes étant suspectées de résistance.

Tableau V: Mortality rate after exposure of thirteen populations of *An. gambiae* s.l. to multiples of diagnostic concentrations of pyrethroids with and without PBO and bendiocarb using WHO bioassay from different area.

Method	Locality	Insecticides	Delta 1x	Delta 1x+ PBO	Delta 2x	p-value	Per 1x	Per 1x + PBO	Per 2x	Alpha 1x	p-value	Bendio 1x
WHO test	Kandi	Mortality rate	15.16±7.5 ^a	61.26±9.7 ^b	44.23±9.4 ^c	<0.0001	14.26±7.5 ^a	42.50±10.1 ^a	30.43±9.6 ^a	28.56±9.9 ^a	>0.0001	90±2.3
	Parakou	Mortality rate	37.5±9.9 ^a	92.18±5.7 ^b	41.7±10.1 ^a	<0.0001	20.5±8.5 ^a	56.6±10 ^b	39.14±9.9 ^a	36.10±9.6 ^a	<0.0001	92.5±3.5
	Bohicon	Mortality rate	25.13±8.1 ^a	61.24±6.8 ^c	44.8±8.8 ^b	<0.0001	16.7±9 ^a	48.32±9.1 ^b	43.3±9.2 ^b	39.8±10 ^b	<0.0001	93.61±3.4
	Cotonou	Mortality rate	26.31±7.7 ^a	73.7±8.3 ^c	43.33±8.6 ^b	<0.0001	19.8±7.1 ^a	44.52±8.9 ^b	31.42±10 ^b	40.41±9.7 ^b	<0.0001	84.36±7.6
	Malanville	Mortality rate	38.6±8.9 ^a	75.01±8.8 ^b	51.4±10.3 ^a	<0.0001	38.8±9.4 ^a	68.56±9.3 ^b	37.22±10.6 ^a	44.32±10 ^a	<0.0001	93.82±5.6
	Missérété	Mortality rate	32.81±8.2 ^a	78.65±7.5 ^b	44.43±9.8 ^a	<0.0001	18.76±7.9 ^a	61.61±9.7 ^b	44.31±9.2 ^b	42.15±9.8 ^b	<0.0001	94.82±3.1
	Porto-Novo	Mortality rate	23.21±7.4 ^a	81.32±6.9 ^c	63.22±8.7 ^b	<0.0001	21.65±7.5 ^a	81.58±8.2 ^b	63.54±9.1 ^b	30.71±9.4 ^a	<0.0001	93.9±3.5
	Allada	Mortality rate	25.44±7.8 ^a	81.52±6.9 ^c	40.8±8.9 ^b	<0.0001	17.60±6.2 ^a	82.81±8.1 ^c	33.63±8.9 ^b	16.2±6.7 ^a	<0.0001	94.91±3.3

m±*n* = Mortality rate (%); ±*se*; P: p-value of comparison between localities; In column rate with same latter are not statistically different.

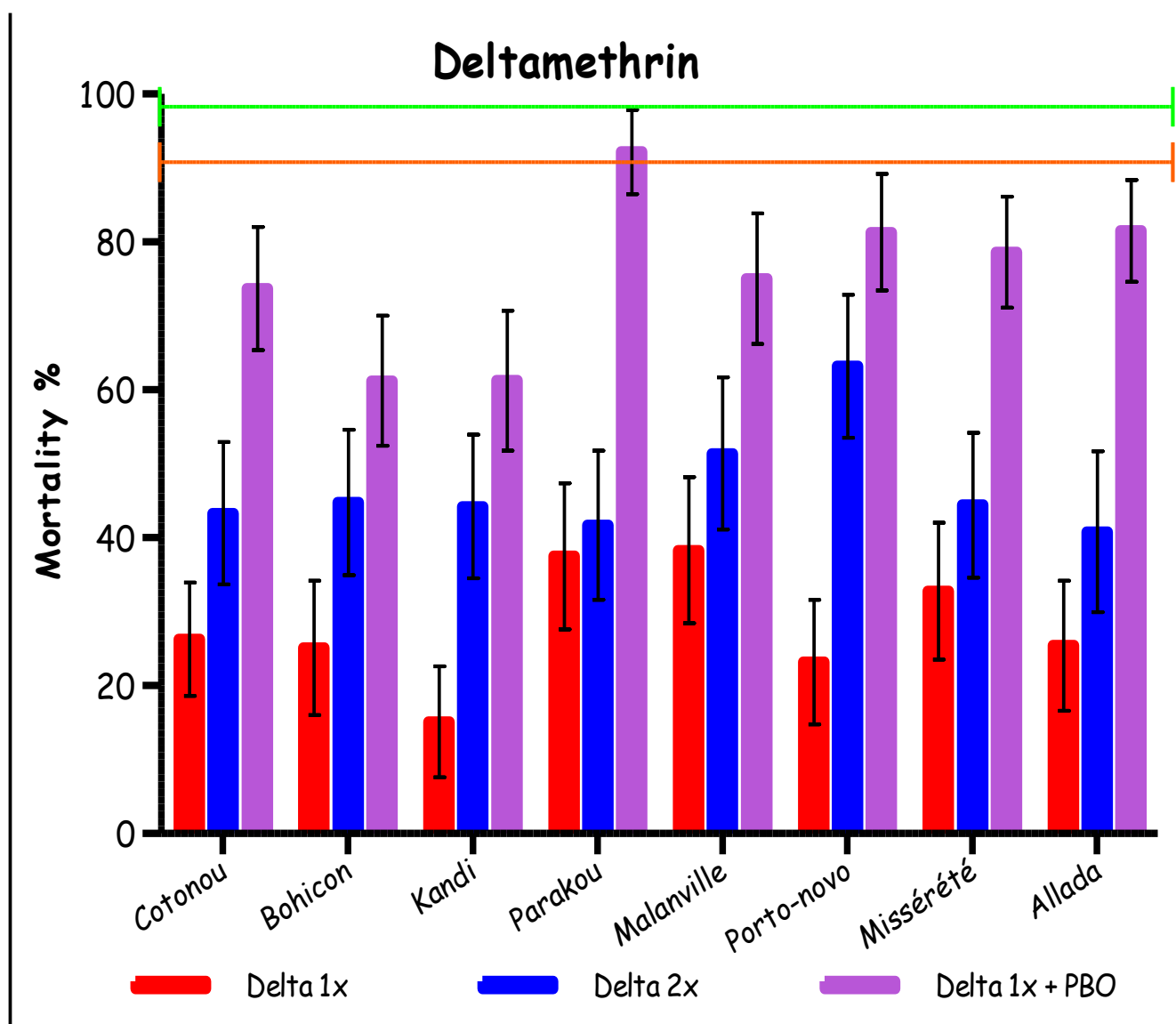


Figure 5: Taux de mortalité après exposition de huit populations d'*An. gambiae s.l.* à de multiples concentrations diagnostiques de deltaméthrine avec PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

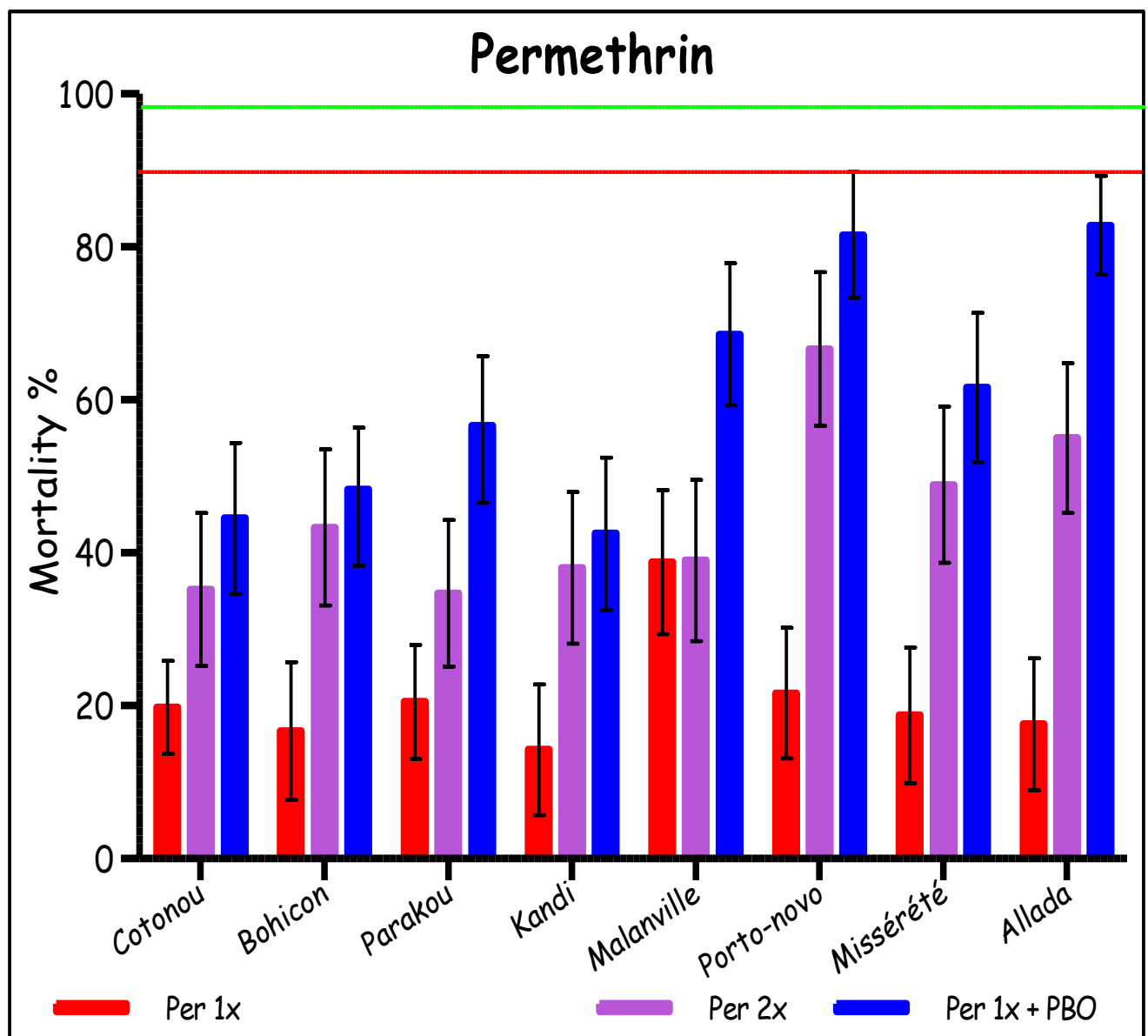


Figure 6: Taux de mortalité après exposition de huit populations d'*An. gambiae* s.l. à de multiples concentrations diagnostiques de perméthrine et d'alphacyperméthrine avec du PBO en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

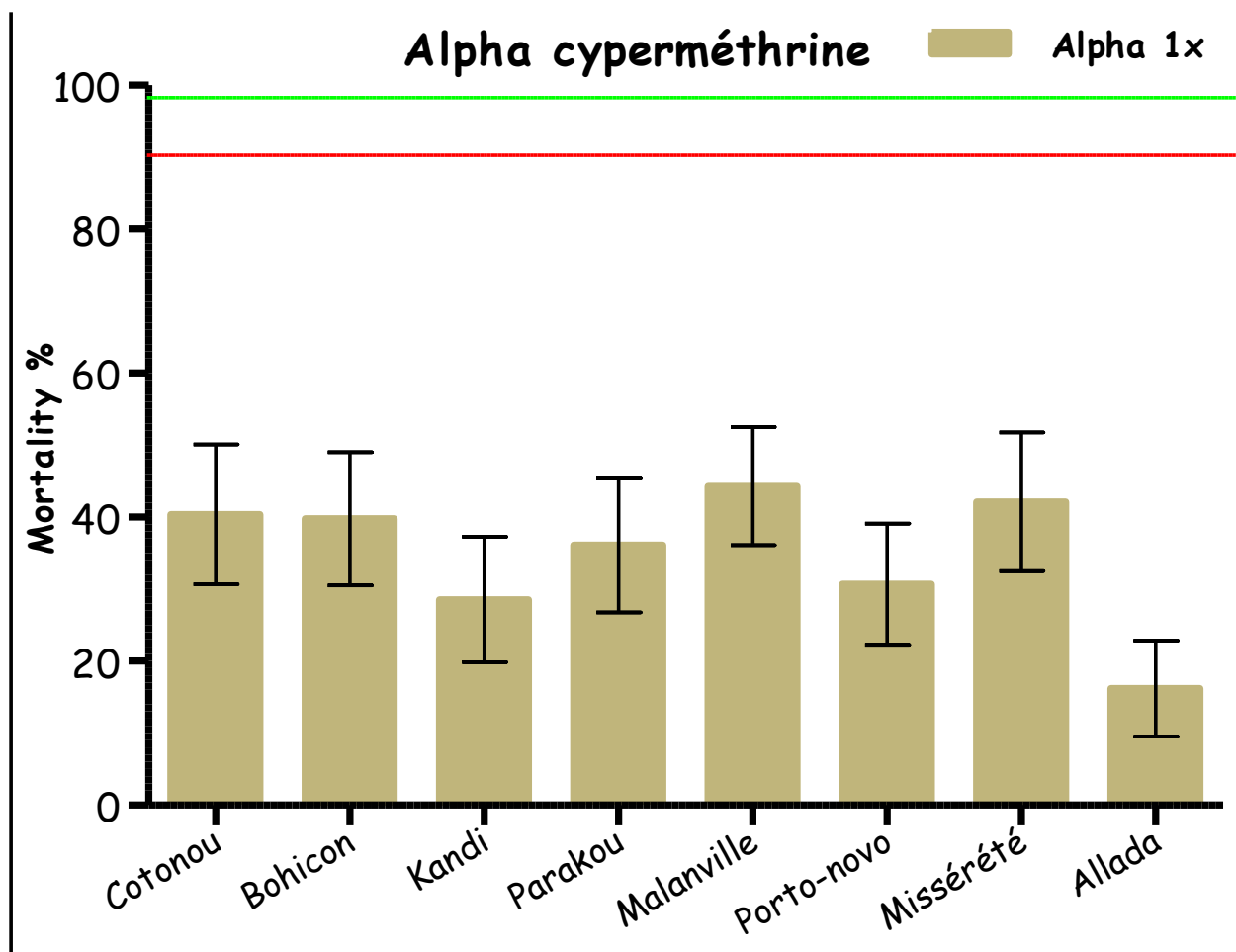


Figure 7: Taux de mortalité après exposition de huit populations d'*An. gambiae s.l.* la concentration diagnostique d'alpha cyperméthrine en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

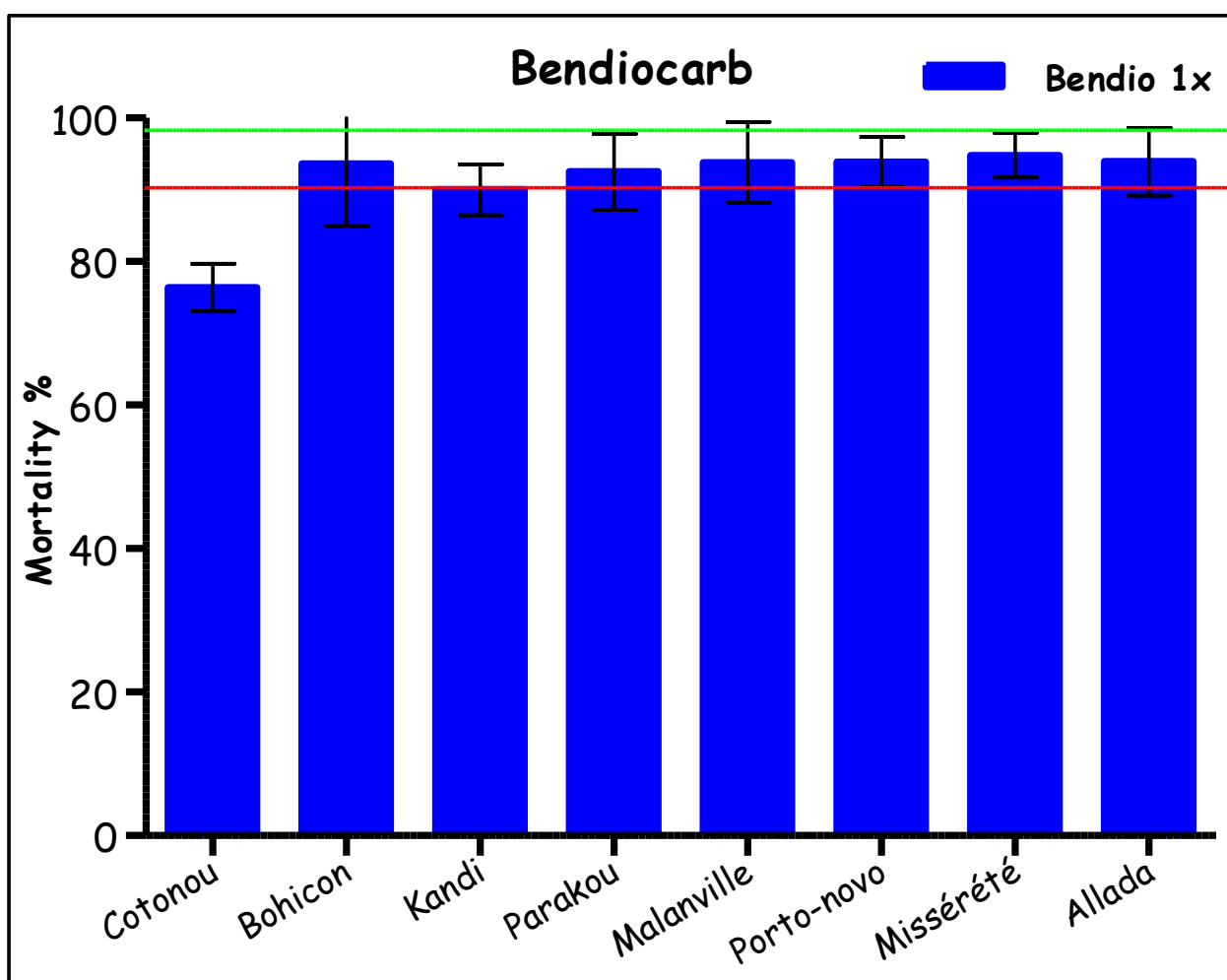


Figure 8: Taux de mortalité après exposition de huit populations d'*An. gambiae* s.l. à la concentration diagnostique de bendiocarb en utilisant le bio-essai de l'OMS dans différentes régions.

Conclusion

La sensibilité des moustiques à la perméthrine, à la deltaméthrine, à l'alphacyperméthrine, au DDT, au bendiocarbe et au pirimiphos-méthyl suit la même tendance dans les douze différentes communes étudiées. Ces résultats montrent une très forte résistance des vecteurs aux pyréthriinoïdes et aux organochlorés. L'ajout du synergiste PBO augmente significativement le taux de mortalité aux pyréthriinoïdes sans tuer le nombre total de moustiques. C'est le signe d'une forte résistance à ces insecticides due à plusieurs mécanismes : L1014F kdr, surexpression des oxydases, des estérases et de la glutathion S-transférase.

Par ailleurs, nous avons entamé notre surveillance de routine de la résistance des vecteurs aux insecticides dans treize communes sur le transect sud-nord Bénin. Nous avons pu parcourir huit communes (Cotonou, Porto-Novo, Missérété, Bohicon, Allada, Kandi, Parakou, et Mallaville) pour le moment en raison de la rareté des gîtes larvaires au nord du pays actuellement.

Défis

Suivre l'évolution de la résistance des vecteurs aux insecticides au Bénin, y compris la sensibilité des anophèles aux nouveaux insecticides candidats (chlorfénapyr, clothianidine, pyriproxifène et broflanilide) pour les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action et la pulvérisation intradomiciliaire.

Références bibliographiques

1. Aïkpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, Oké-Agbo F, Akogbéto M: **Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control.** *Parasit Vectors*. 2013 Jun 26; 6:192.
2. 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.** *Parasit Vectors*. 2013 Sep 21; 6:274. doi: 10.1186/1756-3305-6-274.
3. WHO., (2013) : ***Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.*** Geneva: World Health Organization; 2013.
4. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, Torre AD: **Distribution of knockdown resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa.** *Malar J* 2008, 7:74.
5. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Berge J, Devonshire A, Guillet P, Pasteur N and Pauron D (1998) : **Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*.** *Insect MolBiol*, 1998, 7, 179-184.
6. Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M. **The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect MolBiol*, 2004, 13, 1-7.
7. Hemingway, J., N. Hawkes, L. Prapanthadara, K.G.I. Jaya wardenal, 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.
8. Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F: **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-**

- treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets.** Malar J. 2009 Oct 20; 8:233. doi: 10.1186/1475-2875-8-233.
9. 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
 10. Salako AS, Ahogni I, Kpanou C, Sovi A, Azondekon R, Sominahouin AA, et al. **Baseline entomologic data on malaria transmission in prelude to an indoor residual spraying intervention in the regions of Alibori and Donga, northern Benin, West Africa.** Malar J. 2018;17:392
 11. Chouaïbou M, Etang J, Brévault T, Nwane P, Kérah Hinzoumbé C, Mimpfoundi R, Simard F: **The dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon.** Trop Med Int Health 2008, 13:1–11.
 12. Kristan M, Fleischmann H, Della-Torre A, Stich A, Curtis CF: **Pyrethroid resistance /susceptibility and differential rural/urban distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. malaria vectors in Nigeria and Ghana.** Med Vet Entomol. 2003, 17: 326-332. 10.1046/j.1365-2915.2003.00449.x.

Annexes



Photo 1: Prospection larvaire dans la commune de Bassila le 12/02/2021



Photo 2: Prospection larvaire dans la commune de Bantè le 15/02/2021



Photo 3: Prospection larvaire dans la commune de Zakpota le 21/01/2021



Photo 4: Prospection larvaire dans la commune de Cotonou le 02/02/2021



Photo 5: Réalisation des tests OMS 27/01/2021



Photo 6: Réalisation des tests OMS 02/03/2021



Photo 7: Réalisation des tests PCR 04/03/2021



Photo 8: Réalisation des tests Biochimique 10/03/2021