



Ecole Doctorale
Pluridisciplinaire
« Espaces, Cultures
et Développement »



Chaire UNESCO
« Science,
Technologie et
Environnement »
(CUSTE)

Thèse de Doctorat Unique pour l'obtention du grade de
Docteur en Gestion de l'Environnement de l'Université
d'Abomey-Calavi

Option: Environnement, Santé et Développement

N° d'enregistrement : 078 / EDP/ FLASH/ UAC

Développement de la résistance d' *Anopheles gambiae* aux
pyréthrinoïdes au Bénin: facteurs favorisant, mécanismes
et impacts sur la transmission du paludisme.

Présenté par YADOLETON Tadagbé

Anges

Sous la direction scientifique de :

Martin C. AKOGBETO

Professeur Titulaire en Entomologie Médicale et Vétérinaire,
Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin

Membres du Jury :

Présidente: **Isabelle GLITHO**, Professeur Titulaire en Entomologie Agricole, Université de Lomé ;
République du Togo.

Rapporteurs : **Julien M. C. DOANNIO**, Professeur Titulaire en Entomologie Médicale et Vétérinaire,
Institut National de Santé Publique (INSP), Abidjan Côte d'Ivoire.

Manuel TAMO, Directeur de Recherche en Entomologie ; IITA- Bénin.

Martin AKOGBETO, Professeur Titulaire en Entomologie Médicale et Vétérinaire,
Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin.

Examineurs : **Michel BOKO**, Professeur Titulaire en Climatologie ; Université d'Abomey-Calavi,
République du Bénin.

Sahidou SALIFOU, Maître de Conférences en Entomologie Vétérinaire, Université
d'Abomey-Calavi, République du Bénin.

Date de soutenance : 18 Juillet 2011

Mention : Très honorable avec les félicitations du jury

Sommaire

Titres.....	Pages
Sommaire.....	1
Liste des figures	4
Liste des tableaux	6
Liste des annexes.....	7
Dédicace.....	8
Remerciement.....	9
Résumé.....	14
Abstract.....	16
Liste des sigles et abréviations.....	18
Introduction générale.	19
I- Chapitre I : Revue de littérature.....	27
1-Généralités	28
2- Les méthodes de lutttes anti vectorielle	35
3. La résistance d' <i>An. gambiae</i> s.l aux insecticides.....	41
Chapitre II- Utilisation des pesticides chimiques et la résistance d'<i>An. gambiae</i> aux insecticides.....	47
Thème 2.1 : Situation de la résistance d' <i>An. gambiae</i> s.l aux insecticides au Bénin.....	51
2.1. Zones d'études	51
II-Matériel et méthodes. d'études.....	53
2-1- Enquêtes CAP.....	53
2.2. Sensibilité des anophèles aux insecticides.....	54
2.2.4. Identification des formes, espèces et mécanismes de résistance des anophèles issus des tests de sensibilité	57
2.3. Résultats	58
3.1. Enquête sur l'utilisation des insecticides et fertilisants au Bénin.....	58
3.2. Sensibilité d' <i>Anopheles gambiae</i> aux insecticides.....	62
3.2.2. Mécanisme de résistance : PCR formes, espèces, <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i>	66

4-Discussion et conclusion.....	68
Thème 2.2. Evaluation biologique de la présence des résidus d’insecticides dans les substrats de terre	72
I-Matériels et méthodes.....	72
1-2- Analyses statistiques.....	73
2.4- Résultats.....	74
24.1. Impact des traitements insecticides agricoles sur l’éclosion des œufs d’ <i>An. gambiae</i>	74
2.4.2. Impact des traitements insecticides agricoles sur le développement des larves d’ <i>An. gambiae</i>	75
2.5-Discussion et conclusion.....	77
Chapitre III- Développement des zones maraîchères au Bénin : Impacts sur l’homme et son environnement.....	79
Thème 3.1 : Genèse et développement des zones maraîchères au Bénin.....	83
I - Zone d’étude	83
3- Matériel et méthode	84
3.2-Collecte des données sur le développement des zones maraîchères au Bénin.....	84
3.2.3. Analyse des données.....	85
3.3. –Résultats.....	85
3.1. Genèse et gestion des périmètres maraîchers du Bénin.....	85
3.2.4 Utilisation des pesticides dans les sites maraîchers.....	88
3.4. Discussion et conclusion.....	90
Thème 3.2 : Impact du développement des zones maraîchères sur la transmission du paludisme.....	92
3.1. Zone d’étude	92
3.2. Matériel et Méthode	92
3.4.Analyse des données.....	94
3.5. Résultats.....	95

1-Dynamique des populations d'anophèles : Variations mensuelles de la densité agressive (ma).....	95
2-Identification des espèces et formes et chez <i>An. gambiae</i>	98
3-Variations mensuelles de l'indice sporozoïtique (IS).....	99
4-Variations mensuelles du taux d'inoculation entomologique.....	100
5- Relation entre l'infectivité en protéine CS <i>P. falciparum</i> et le génotype du gène <i>Kdr</i>	102
3.7-Discussion et conclusion.....	103
Discussions générales - Conclusions & perspectives.....	106
Références bibliographiques.....	111
Annexe 1 : Protocoles PCR	
Annexe2 : Protocoles Elisa.....	
Annexe 3 : Articles publiés.....	

Liste des figures

Titres.....	Pages
Figure 1 : Cycle de développement d'un plasmodium	29
Figure 2 : Micrographie des œufs d'anophèles.....	31
Figure 3 : Schéma d'une larve d'anophèle	32
Figure 4 : Cycle biologique d'un anophèle.....	34
Figure 5 : Répartition des différentes espèces du complexe <i>An. gambiae</i> s.l.....	35
Figure 6 : Mécanismes majeurs conférant la résistance aux importantes familles d'insecticides chez les moustiques.....	45
Figure 7 : Carte du Bénin indiquant les sites d'étude.....	55
Figure 8 : entomologiste médical récoltant des larves d'anophèles dans les gîtes de moustiques.....	55
Figure 9 : Vue de l'insectarium du CREC : lieu de rangement des bacs.....	56
Figure 10 : Extraite montrant le résultat du test diagnostic PCR-RFLP chez des individus uniques <i>An. gambiae</i> s.s.....	57
Figure 11 : Utilisation des pesticides dans les sites d'études par les paysans.....	59
Figure 12 : Sources d'approvisionnement des pesticides au Bénin.....	59
Figure 13 : Modes et voies d'élimination des emballages vides de pesticide.....	60
Figure 14 : Mortalité observée après exposition des populations d' <i>An. gambiae</i> à la perméthrine à 0,75% selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles..	63
Figure 15 : Mortalité observée après exposition des populations d' <i>An. gambiae</i> au DDT 4% selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles.....	64
Figure 16 : Mortalité observée après exposition des populations d' <i>An. gambiae</i> à la deltaméthrine (0,05%) selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles.....	65
Figure 17 : Mortalité observée après exposition des populations d' <i>An. gambiae</i> au bendiocarb (0,1%) selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles....	65
Figure 18 : Taux d'éclosion des larves d'anophèles issus des différentes simulations de gîtes.....	75
Figure 19 : Effet des insecticides sur l'émergence des larves d'anophèles	76
Figure 20 : Carte de la ville de Cotonou illustrant la multiplication des sites maraîchers	87

de 1980 à 2008.....	
Figure 21 : Evolution de l’effectif des maraîchers et de la superficie exploitée dans la commune de Cotonou de 1972 à 2009.....	87
Figure 22 : Pourcentage des maraîchers respectant ou non les doses d’insecticides dans les trois zones d’étude	89
Figure 23 : Variation de la densité agressive d’ <i>An. gambiae</i> s.l (ma) en fonction de la pluviométrie à Houeyiho (A), Acron (B) et à Azèrèkè (C).	97

Liste des tableaux

Titres.....	Pages
<u>Tableau I</u> : Insecticides régulièrement utilisés sur les sites maraîchers, cotonniers et rizicoles.....	61
<u>Tableau II</u> : Répartition des formes, des espèces et des fréquences <i>Kdr</i> et <i>Ace-I</i> d' <i>An. gambiae</i> s.l issue des zones d'études.....	67
<u>Tableau III</u> : Composition de la faune culcidiennne récoltée à partir des captures sur appât humain et par aspersion intra-domiciliaire	96
<u>Tableau IV</u> : Caractérisation moléculaire des espèces et formes assurant la transmission du paludisme dans les trois zones d'étude.....	98
<u>Tableau V</u> : variation saisonnière de l'indice sporozoitique des moustiques collectés en zone A et B	99
<u>Tableau VI</u> : Variation saisonnière du Taux d'Inoculation Entomologique des <i>An. gambiae</i> collectés en zone A et B	101
<u>Tableau VII</u> : distribution des <i>An. gambiae</i> positifs en antigènes <i>CSP falciparum</i> en fonction du génotype <i>kdr</i> dans les trois zones	102

Liste des annexes.

- Annexe 1 : Protocoles PCR
- Annexe 2 : Protocoles Elisa
- Annexe 3 : Listes des publications parues

Dédicaces

A mon fieul Bocovo Carel, que ce travail soit un exemple à suivre et à dépasser.

Puisse le Seigneur t'accorder courage et persévérance.

Remerciements

Ce travail est la synthèse de plusieurs années de travaux entièrement réalisés au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou entre 2007 et 2011. C'est le fruit d'une collaboration et d'un partenariat soutenus entre plusieurs équipes avec l'apport financier du Centre de Recherche pour le Développement International (CRDI), de l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) à travers la bourse UNDP, de African Population and Health Research Center (APHRC), du Gouvernement Béninois que nous tenons à remercier à travers la bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC).

Nous remercions la Direction du CREC qui a mis à notre disposition les moyens techniques et logistiques pour la conduite des activités de recherche.

Nos remerciements vont particulièrement à l'endroit de :

- Notre Directeur de thèse, le Professeur Martin C. Akogbéto, Directeur du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou. Cher maître, C'est sous votre impulsion que nous avons fait nos premiers pas en entomologie médicale en 2006. Votre autorité, vos conseils et la rigueur de vos directives ont été pour nous un solide soutien intellectuel et moral et le meilleur des encouragements. Vous avez été la personne qui a le plus influencé ce travail malgré vos multiples responsabilités scientifiques et administratives. Vous êtes à l'origine de plusieurs idées maîtresses, pour la plupart dévoilées sur le terrain. Ces idées ont orienté nos recherches et sont largement exprimées dans ce travail. C'est le lieu de vous dire merci. Nous vous garantissons notre respectueuse reconnaissance et souhaite encore bénéficier de vos critiques toujours constructives.
- Madame Isabelle Glitho, Professeur titulaire d'entomologie, Doyen de la Faculté des Sciences à l'Université de Lomé. C'est pour nous un grand plaisir de vous côtoyer et d'apprendre beaucoup de vous durant les trois années du Projet Corus et au cours de certaines rencontres internationales. Comme une mère, vos conseils nous ont beaucoup édifiés dans notre vie scientifique, professionnelle et sociale. Recevez à travers ce document, nos marques de

reconnaissance envers votre personne et merci pour l'honneur que vous me faites à nouveau en acceptant de présider le jury de cette thèse.

- Monsieur Julien M. C. DOANNIO, Professeur Titulaire en Entomologie Médicale et Vétérinaire à l'Institut National de Santé Publique (INSP), Abidjan Côte d'Ivoire. C'est pour nous un plaisir de travailler à vos côtés et nous n'oublierons jamais les forts moments passés ensemble lors de la rédaction du rapport final du projet MIM A550066 au Bénin. Vos conseils et votre rigueur pour le travail bien fait sont pour moi des exemples à suivre. Recevez ici mes sincères remerciements pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.
- Monsieur Manuel Tamo, entomologiste agricole et Chef station IITA-Bénin. C'est avec une grande joie au cœur que nous tenons à remercier IITA-Bénin à travers votre personne. Nous n'oublierons jamais les jours passés au sein de cette station de recherche et votre soutien indéfectible qui nous motivait surtout après le départ de notre superviseur, Dr Andy Cherry. Merci d'avoir accepté être le rapporteur de cette thèse.
- Monsieur Sahidou SALIFOU, Maître de Conférences en Entomologie Vétérinaire à l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin. En votre qualité de Directeur de Cabinet du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, vous avez été d'une grande utilité pour nous dans le cadre de la bourse du ministère pour la finalisation de notre thèse. Recevez ici nos sincères remerciements pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.
- Monsieur Michel Boko, Professeur Titulaire en Climatologie à la Faculté des Lettres Arts et Sciences Humaines. Vous nous aviez enseigné les concepts de la gestion de l'environnement et c'est vous qui, la première fois nous avez accepté à l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire. Vous nous avez soutenu depuis notre Diplôme d'Etudes Approfondies et tout au long de cette thèse. Vos conseils nous ont beaucoup édifiés dans notre vie scientifique, professionnelle et sociale. Recevez à travers ce document, nos marques de reconnaissance envers votre personne.

- Nous gardons un souvenir inoubliable de Dr Raphael N'guessan et de Dr Alex Asidi qui nous ont aidés dans la traduction de nos articles. Les résultats de notre collaboration sur le paludisme maraîcher ont été très édifiants et sont à jamais gravés dans notre mémoire. Vos qualités scientifiques et expériences dans la lutte anti-vectorielle nous ont poussé à aimer la recherche.
- A l'équipe de l'IRD UR016, Dr Corbel Vincent, Dr Thierry Baldet, Dr Franck Remoué, nous exprimons notre profonde gratitude.
- A Dr Thibaud Martin, précédemment chercheur de l'IRD UR016 au Bénin. Avec vous, nous avons appris d'avantage à travailler avec le monde paysan notamment avec le projet Corus qui a réuni le Bénin, le Togo et le Burkina-Faso. C'est le lieu de vous dire merci pour vos innombrables contributions dans cette thèse.
- Nous gardons un souvenir inoubliable de Dr Andy Cherry, entomologiste agricole à l'IITA-Bénin avec qui nous avons fait nos premiers pas dans la recherche. Andy, nous avons conduit d'excellents essais au laboratoire et en milieu réel au Bénin et au Ghana. C'est le lieu de vous dire merci pour nous avoir donné goût à la recherche et à la langue anglaise.
- Dr Luc Djogbenou, Dr Djouaka Rousseau respectivement à l'IRSP et l'IITA-Bénin. C'est le lieu de vous dire aussi merci pour les forts moments passés ensemble au laboratoire et dans la brousse à la recherche des gîtes d'*Anopheles gambiae*.
- A vous, Christian Agossou ; merci pour les multiples sacrifices et aides que notre travail vous imposait ; recevez à travers ce document, la marque de notre profonde amitié.
- A mon collègue de bureau Gil Germain Padonou avec qui nous avons partagé les moments forts de notre DEA et de notre thèse. Reçois ici l'expression de notre profonde gratitude.
- A mes amis et collègues doctorants Armel Djèntonin, Bio Bangana, Innocent Djègbè de l'IRD UR016 que nous aimions taquiner; recevez nos sincères remerciements à travers ce document.

- A vous Rock Aïkpon, Razaki Ossé, mes amis frères. Recevez à travers cette thèse et les articles que nous avons publiés ensemble, la marque de sympathie et d'amitié dont vous avez toujours faire preuve à mon égard. C'est le lieu de vous dire que vous prenez la relève auprès de notre cher et commun Directeur de thèse. Que ses conseils et ses idées soient pour vous des paroles bibliques ou coraniques pour votre épanouissement et votre vie professionnelle.
- A mes chers amis et frères mastorants, Agbanrin Youssouf Ramziyath, Badirou Kéfilath, Attolou Roseline, Govoetchan Renaud, Sovi Arthur, Gnanguenon Virgile, Aizoun Nazaire, Ole zelo sangba Marina Toffodji Ulrick, Ganhoutode Gabriel, Houkanrinkpè Firmin, Klotoe Armand et Kiki Laurète qui ont été d'une grande utilité pour nous dans l'accomplissement de ce travail. Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.
- A nos grands amis de laboratoire, nous voulons nommer Géraldo Houndéton, Aboubakar Sidik avec qui nous passions la moitié de notre journée à faire la biologie moléculaire, nous exprimons ici notre grande amitié.
- A mes amis de LSTHM, nous voulons nommer Boko Pélagie, Hermione Adjé, Estelle Vidjinou, Abibath, Hermione Boko, Aimé, avec qui nous partageons les forts moments de prière les 13 de chaque mois à l'Eglise S^t Jean de Cotonou. Recevez à travers ce document, les marques de sympathie et d'amitié de la part de votre parrain spirituel.
- A mes amis, Roserick Azondékon, Olivier Oussou, Roland Alia, que nous taquinions beaucoup durant nos travaux de recherche. Merci pour tout votre soutien.
- A Dr Nahum et son équipe de recherche, nous exprimons toute notre reconnaissance
- A Sébastien Koudénoukpo, M^{me} Kindji Balbine, Herbert Noukpo M^{me} gentille ; merci pour votre aimable soutien
- A M^{me} Clémence Durand, Secrétaire Administrative du CREC, recevez ici l'expression de notre profonde gratitude à votre égard. Vous n'avez jamais cessé de nous aider, c'est le lieu de vous dire merci.

- A monsieur Médard Yamadjako, financier du CREC et son assistant Yannick Djegui. Vous avez été d'une grande utilité vitale pour l'accomplissement de cette thèse. Les mots nous manquent aujourd'hui pour vous témoigner toute notre gratitude. Recevez à travers ce document, le fruit d'une bonne collaboration entre vous et moi.
- Hyacinthe Allagbé, prêtre de la congrégation des Eudistes qui nous a aidé dans la finalisation de notre thèse. Reçois ici nos sincères remerciements.
- Nous remercions la fondation Bill and Melinda Gates qui à travers le financement du projet PMI, nous a permis de faire l'étude sur la résistance des vecteurs du paludisme au sud du Bénin et la publication d'un article dans *Malaria Journal*.
- Nous remercions aussi le Projet CORUS qui a financé une partie de nos travaux de recherche dans le cadre de la résistance des vecteurs du paludisme dans les sites cotonniers et la publication d'un article dans *Parasites and Vectors*.
- Nous présentons nos vives reconnaissances à notre père et à notre mère qui ont, tous deux consenti de lourds sacrifices pour nous permettre de poursuivre nos études. Nous les présentons en outre à nos frères, sœurs et cousins qui ont toujours supporté avec beaucoup de compréhension, les diverses contraintes que nous imposait ce travail.

Résumé

La lutte anti-vectorielle basée sur l'utilisation des matériaux imprégnés, notamment les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILD), considérées comme l'un des outils les plus efficaces de prévention contre les moustiques vecteurs, est en proie depuis quelques années, à une baisse d'efficacité. Cette baisse d'efficacité est due à l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides pyréthrinoïdes.

Sans apporter des preuves concrètes, on cite l'utilisation des insecticides dans le domaine agricole comme principal facteur à l'origine de cette résistance. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué la résistance des populations d'*An. gambiae* s.l issues des zones maraîchères (Houeyiho à Cotonou, Acron à Porto-Novo et Azèrèkè à Parakou), rizicoles (Malanville), céréalières (Kétou, Comè et Séhouè) et des zones cotonnières à programme calendaire (utilisation de fortes quantités d'insecticides), à Lutte Etagée Ciblée (LEC) avec très peu d'insecticide et des zones de programme biologique où aucun insecticide chimique n'est utilisé.

Au début de l'étude, nous avons effectué une enquête sur la nature des pesticides utilisés contre les ravageurs des cultures, leur origine et les doses appliquées.

Dans un second temps, nous avons étudié la sensibilité des anophèles issus de ces sites d'étude aux papiers imprégnés de deltaméthrine (0,05 %), de perméthrine (0,75%) de DDT (4%), et du bendiocarb (0,1%) et procédé ensuite à la caractérisation des mécanismes de résistance (PCR *Kdr* et *Ace-1*) des populations d'*An. gambiae* issues de ces sites d'étude. Enfin, nous avons étudié l'impact de la résistance sur la transmission du paludisme en comparant des zones proches et éloignées des zones maraîchères à travers une étude sur l'infectivité des anophèles en antigène circumsporozoïtique porteurs de divers génotypes de la mutation *Kdr*.

Au terme des travaux, les résultats des enquêtes sociologiques montrent que 97% des paysans interrogés déclarent utiliser les pesticides dans les sites cotonniers à programme calendaire, LEC ainsi que dans les périmètres maraîchers pour contrôler les ravageurs des cultures. La pression exercée par ces insecticides est l'un des facteurs du développement de la résistance des moustiques, en particulier d'*An. gambiae* vis-à-vis des pyréthrinoïdes et des organochlorés avec un niveau de résistance plus prononcé

dans les sites cotonniers à programme calendaire, LEC, et maraîchers (où les paysans utilisent une forte dose d'insecticide) par rapport aux zones céréalières, rizicoles et de coton biologiques qui nécessitent peu ou pas du tout d'insecticide. La mutation du gène *Kdr* semble être le principal mécanisme responsable de la résistance des vecteurs du paludisme avec une fréquence très élevée (0,86 à 0,91) dans les zones à forte utilisation d'insecticides par rapport aux zones à faible utilisation d'insecticide (0,32 à 0,55). Outre la mutation *Kdr*, la mutation *Ace-1R* a été retrouvée à très faible fréquence (0,001 à 0,005) seulement dans les populations de moustiques provenant des sites cotonniers à traitement calendaire, LEC et des sites maraîchers.

Ces sites maraîchers qui ont connu un développement rapide ces dernières années au Bénin pour des raisons liées au chômage, à l'exode rural et aux exigences alimentaires des populations urbaines, créent des poches d'eau qui constituent des gîtes potentiels quasi permanents pour le développement des larves d'*An. gambiae* s.l. Ces gîtes contribuent à l'augmentation du taux d'agressivité des vecteurs du paludisme et du taux d'inoculation entomologique surtout en saison sèche dans les habitations proches des périmètres maraîchers par rapport à celles situées loin de ces périmètres.

Cependant, les résultats de nos travaux de recherche montrent qu'il n'existe pas de relation nette entre l'infectivité au *Plasmodium falciparum* et la présence ou non du gène de résistance (*Kdr*) chez le moustique.

On peut conclure que l'utilisation anarchique des insecticides en agriculture est un des facteurs responsables de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides. Il est urgent de mettre en place des stratégies de lutte intégrée et raisonnée permettant de mieux gérer la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme.

Mots clés : Bénin ; Insecticides ; résistance ; transmission ; paludisme *Anopheles gambiae*.

Abstract

Vector control programme based on deployment of insecticide treated nets (ITNs) has become the main method for malaria prevention in many endemic countries across Africa. However, the threat of pyrethroid resistance in West Africa is increasingly becoming a serious concern for the future usefulness of ITNs.

Without sufficient evidence, the emergence of insecticide resistance in insect vectors has been partly attributed to the abusive use of insecticides against household and agricultural pests. To explore this hypothesis further, the present study was designed to identify potential practices that may contribute to the emergence of insecticide resistance and establish the relationship between the Knock down resistance gene (*Kdr*) and infectivity rate of *Plasmodium falciparum* transmitted by *Anopheles gambiae* s.l. To meet this goal, four different settings were selected based on the history of their agricultural practices: i) areas with high production of vegetables (Houéyiho at Cotonou, Acron at Porto-novo and Azèrèkè at Parakou), ii) rice cultivation (Malanville), iii) cereals production (Kétou Comè and Séhouè) and iv) cotton growing sites. At the later site, pest management strategies such as the “Calendar Control Program (CCP)”, “Targeted Intermittent Control Program (TICP)” and the “Biological control program (BP)” officially recommended already operate in Benin

Knowledge about practices likely to favour the emergence of resistance was investigated through interviews and focus group discussions among farmers. They were subjected to quantitative and qualitative questionnaires to generate data on insecticides being used, the various doses applied for pests eradication, the frequency of treatments, the origin of insecticides and provision, safety methods and related health hazards. Bioassays were performed on adult mosquitoes collected from various farms at these sites to assess the susceptibility of malaria vectors to insecticide-impregnated papers (permethrin 0.75%, deltamethrin 0.05%, DDT 4%, and bendiocarb 0.1%) following WHOPES guidelines. The species within *An. gambiae* complex, molecular form and presence of *Kdr* and *Ace-1* genes were determined by PCR. Finally, a potential association between insecticide resistance and malaria transmission was studied by comparing the infectivity rates of mosquitoes carrying

various alleles of the *Kdr* gene in households close to vegetable farms and in others located far from them.

Results of this study showed that more than 97% of local farmers use insecticides in agriculture, with the exception of BP areas where no chemicals were deployed to control pests. The *Kdr* gene seemed to be the main resistance mechanism with very high frequency in CCP, TICP and vegetable farming areas (0,86 - 0,91) but low in the cereals, rice cultivation and BP areas (0,32 à 0,55) where insecticide usage hardly targets pest control. The *Ace-IR* mutation was found in very low frequency (< 0.1) only in cotton fields and vegetables farming areas.

Although *Kdr* allelic frequencies were high and did not differ between Households Close to Vegetable Farms (HCVF) and those located in Households Far to Vegetable Farms (HFVF) during the dry season at the three study sites. This indicated no clear link between the resistance status of *An. gambiae* and malaria transmission.

This study provides clear evidence that the use of insecticides by local farmers to protect vegetable crops within urban areas is one factor that contributes to the emergence of insecticide resistance in malaria vectors. Therefore, the need to develop Integrated Pest and Vector Management (IPVM) strategies and management of insecticide resistance in malaria vectors seem to be very important for vector control.

Keywords: Benin; Insecticides; resistance; transmission; malaria; *Anopheles gambiae*.

Liste des sigles et abréviations

Ace-1: acetylcholinesterase

An: *Anopheles*

CREC : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

CS : Circumsporozoïtique

CSP : Circumsporozoïtic Protein

CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Arthémisinine

DDT: Dichloro-diphényl-trichloro-éthane

IRS: Indoor Residual Spraying

Kd: *Knock-down*

KDR: Knock-down resistance

MILD : Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée

Nbre : Nombre

NMCP : National Malaria Control Programm

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P : Valeur de probabilité

pi/h/an : piqûre infectée par homme et par an

PCR : Polymerase Chain Reaction

PID : Pulvérisation Intradomiciliaire

PMI : President's Malaria Initiative

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

s.s : sensu stricto

s.l: sensu lato

TIE : Taux d'Inoculation Entomologique

I- Introduction générale

Le paludisme (du latin *paludis*, "marais") est un des premiers problèmes mondiaux de santé et constitue un véritable frein au développement socio-économique (WHO, 2009). C'est une érythrocytopathie fébrile très répandue dans le monde, transmise à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique du genre *Anopheles* (Pennetier et al., 2007, Bruce-Chwatt., 1987). Il demeure l'un des fléaux majeurs des pays les plus pauvres de l'Amérique du Sud à l'Asie du Sud-Est, en passant par l'Afrique subsaharienne où surviennent 90% des décès dus à la maladie notamment chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (WHO, 2009). En 2009, les cas de paludisme dans le monde ont été estimés à 225 millions avec 781 000 décès (WHO, 2010).

Au Bénin, il est demeuré la première cause de fréquentation des formations sanitaires avec une fréquence de 37% chez les adultes et 41% chez les enfants de moins de 5 ans (Akogbeto et al., 2010).

Le paludisme se manifeste chez l'homme par de fortes fièvres survenant à intervalles de temps réguliers, dues à l'infection des globules rouges par un protozoaire parasite appartenant au genre *Plasmodium*. Quatre espèces de *Plasmodium* infectent l'homme: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*.

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus répandue en Afrique sub-saharienne (Burkot et al., 1987). Le parasite du paludisme est transmis lors de la piqûre par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Le parasite infeste les cellules hépatiques de la victime puis circule dans le sang, en colonisant les hématies et en les détruisant.

Grâce aux multiples efforts déployés pour lutter contre cette maladie, la morbidité et la mortalité ont connu une baisse notable (WHO, 2009). Parmi les stratégies de lutte utilisées, la lutte anti-vectorielle semble être le meilleur outil de lutte contre le paludisme. A cet effet, deux méthodes sont utilisées de nos jours: les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action et les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides à effet rémanent (Kelly-Hope et al., 2008). La lutte anti-vectorielle par l'utilisation des Matériaux Imprégnés d'Insecticide (MII) a montré qu'on pouvait réduire la morbidité palustre de 50 à 60% et la mortalité générale

de 20% en Afrique (Alonso *et al.*, 1991, Alonso *et al.*, 1993, D'Alessandro *et al.*, 1995, Binka *et al.*, 1996).

Au Bénin, le principal moyen de lutte anti-vectorielle repose essentiellement sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (Ministère de la Santé- Bénin, 2006). Beaucoup d'efforts ont été consentis pour augmenter l'accessibilité des populations aux moustiquaires imprégnées, en particulier aux enfants de moins de cinq ans et aux femmes enceintes. Malheureusement, des problèmes importants subsistent mettant en danger les objectifs et la pérennité des réalisations. La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides constitue un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés.

Suite à la baisse observée de sensibilité d'*An. gambiae* aux pyréthrinoïdes, la résistance des vecteurs aux insecticides est devenue un domaine de recherche prioritaire en Afrique depuis quelques années (Elissa *et al.*, 1993 ; Zaim *et al.*, 2002 ; Awolola *et al.*, 2009).

En Afrique et particulièrement au Bénin, les pyréthrinoïdes sont utilisés de façon intense dans les zones de culture du coton, du riz et du sorgho contre les insectes ravageurs, les punaises et les acridiens (Akogbéto *et al.*, 2005 ; Yadouléton *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2010). Ces mêmes insecticides sont également utilisés en zones urbaines et rurales contre la nuisance des insectes. Les travaux de Yadouléton *et al.* (2009), Tripet *et al.* (2003) montrent que la plupart des pesticides utilisés pour contrôler les ravageurs du cotonnier sont aussi utilisés par les maraîchers, ce qui pourrait augmenter le niveau de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides. Cette situation a probablement contribué à l'apparition de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et pourrait être un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés et par conséquent compromettre l'espoir que les autorités sanitaires placent dans cette stratégie de protection des populations contre le paludisme.

Au cours de la dernière décennie, l'émergence de la résistance d'*An. gambiae* sensu lato (s.l) aux différents insecticides utilisés en santé publique a été signalée dans plusieurs pays Africains comme la Côte d'Ivoire (Elissa *et al.*, 1993), le Kenya (Vulule *et al.*, 1999 ; 1994), le Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2002a), le Nigéria (Awolola *et al.*, 2003), le Mali (Fanello *et al.*, 2002 ; 2003), le Cameroun (Etang *et al.*, 2003) et le

Bénin (Akogbéto et Yacoubou, 1999 ; Corbel et *al.*, 2007 ; N'Guessan et *al.*, 2007, Yadouleton et *al.*, 2009, Djènontin et *al.*, 2009, Yadouleton et *al.*, 2010a, Yadouleton et *al.*, 2011).

Sans aucune preuve scientifique, on cite l'utilisation des insecticides en hygiène domestique et dans le domaine agricole comme les principaux facteurs de la résistance. Pour les acteurs du développement rural, ce sont les bombes aérosols et autres produits, parfois de qualité douteuse, utilisés *larga manu* depuis des décennies à l'intérieur des maisons, aussi bien dans les centres urbains que dans certaines zones rurales qui sont à la base de l'émergence de la résistance. En revanche, les spécialistes de la santé publique incriminent une utilisation massive des insecticides agricoles contre les ravageurs de cultures. Selon Coetze et *al.* (2000), Chandre et *al.* (2000) et Awolola et *al.* (2002), les pulvérisations intra-domiciliaires de DDT effectuées de 1995 à 1999 ont favorisé la résistance d'*An. funestus* aux pyréthriinoïdes dans le Kwazulu-Natal en Afrique du Sud. Parallèlement, au Bénin, Akogbéto et Yacoubou en 1999 ont suspecté que la résistance d'*An. gambiae* au DDT observée dans la région méridionale du Bénin serait due à deux phénomènes: l'utilisation massive de ce produit et de la dieldrine en pulvérisation intra-domiciliaire de 1953 à 1960 dans la plupart des villages du sud lors de la campagne OMS d'éradication du paludisme et l'emploi massif des organochlorés en agriculture au cours des années 50. Dans une étude récente, Diabaté et *al.* (2002b) au Burkina-Faso ont montré que chez *An. gambiae*, la fréquence des gènes de résistance (*knock down resistance, Kdr*) est plus élevée dans les zones cotonnières habituellement soumises à des traitements insecticides que les zones rurales où les paysans ne pratiquent que la culture des produits vivriers de consommation locale. En Côte-d'Ivoire, la mutation *Kdr* mise en évidence chez *An. gambiae* aurait probablement été sélectionnée par l'emploi massif du DDT et des pyréthriinoïdes contre les ravageurs du coton (Chandre et *al.*, 1999b ; Diabaté et *al.*, 2002c). S'il est manifeste que la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes a pu être sélectionnée par les traitements du coton au Burkina, en Côte-d'Ivoire et au Bénin, en revanche les études réalisées dans le cadre du réseau "Multilateral Initiative of Malaria" (MIM) en Afrique de l'Ouest ont montré des fréquences de résistance *Kdr* similaires dans certaines zones cotonnières régulièrement

soumises à des traitements insecticides et les localités témoins (zones non cotonnières) (Diabaté et *al.*, 2002c). La mutation *Kdr* joue donc un rôle très important dans l'émergence de la résistance d'*An. gambiae* au DDT et aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'Ouest. Toutefois, aucune étude n'a pu démontrer à l'heure actuelle les facteurs à l'origine de la sélection de cette résistance.

Il serait probable que la résistance a pu être sélectionnée par des facteurs issus du secteur agricole ou en santé publique. Toutefois, on manque d'informations sur la nature et les quantités d'insecticides utilisés et les pratiques des utilisateurs. Une utilisation anarchique, par exemple, peut accélérer l'apparition du phénomène. En effet, il n'est pas exclu que, pour des mesures d'économie, certains utilisateurs, en particulier les paysans, diluent les produits ou diminuent les doses recommandées dans le seul but de parvenir à traiter une plus grande superficie (Akogbeto et *al.*, 2005). L'une des conséquences de telles pratiques serait le développement de populations d'insectes qui finiraient par tolérer des doses d'insecticides auxquelles ils étaient préalablement sensibles ce qui crée ou accentue les foyers de résistance des vecteurs du paludisme.

Ces résistances sont dues soit à une mutation de la cible des pyréthrinoïdes, le « canal sodium voltage dépendant » (mutation *Kdr*) (Martinez-Torres et *al.*, 1998), soit à une augmentation des processus enzymatiques de détoxification (oxydases, estérases, etc.) (Vulule et *al.*, 1999).

Dans ce contexte de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, notamment les pyréthrinoïdes, la recherche de méthodes de lutte autres que celles utilisant ces pyréthrinoïdes (utilisation d'autres familles d'insecticides seules ou en combinaison) devient une nécessité (Zaim et *al.*, 2002). Le recours à d'autres familles d'insecticides survint. Ainsi, le propoxur et le bendiocarb furent utilisés en aspersions intradomiciliaires pour lutter contre les vecteurs du paludisme (Carnevale et Mouchet, 1990). Depuis quelques années, ces nouvelles familles d'insecticides font l'objet d'un regain d'intérêt en santé publique étant donné les forts taux de résistance aux pyréthrinoïdes enregistrés chez les vecteurs du paludisme en Afrique subsaharienne.

Au Bénin, outre l'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (LLINs), les Pulvérisations Intra-Domiciliaires d'insecticides (PID) qui entre temps avaient été abandonnées vers les années 80 (Akogbéto et *al.*, 2010), ont refait surface dans le cadre du programme President's Malaria Initiative (PMI). Au Bénin, le programme PID est basé sur l'utilisation du bendiocarb qui est l'une des alternatives aux pyréthriinoïdes choisie par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) afin de réduire les problèmes de la résistance des vecteurs du paludisme (Akogbéto et *al.*, 2010). Toutefois, une attention particulière est indispensable en ce sens que bon nombre de paysans, en l'occurrence les cotonculteurs, utilisent des carbamates pour contrôler les ravageurs de leur champ. Ceci pourrait entraîner l'apparition de la mutation Acétylcholinestérase Résistance (*Ace-IR*), un autre mécanisme de résistance qui a été détecté chez *Anopheles gambiae* sensu stricto (s.s.): une acétylcholinestérase (AChE1) insensible à l'inhibition par les carbamates et les organophosphorés (N'Guessan et *al.*, 2003). Il résulte de la substitution de la glycine en position 119 par la sérine, conférant une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés (Weill et *al.*, 2004).

Plusieurs facteurs sont suspectés d'être à l'origine de ces mutations. Parmi ces facteurs, on peut noter l'utilisation des insecticides en hygiène domestique et dans le domaine agricole. Les travaux de Diabaté et *al.* (2002a) au Burkina-Faso, de Akogbéto et *al.* (2005) et Yadouléton et *al.* (2011) montrent que la culture du coton et l'agriculture péri-urbaine utilisent une gamme variée d'insecticides contre les ravageurs des cultures. Ces traitements qui s'effectuent toutes les semaines diffusent aisément des particules d'insecticides dont certaines sont en contact avec le sol et les gîtes de moustiques, et par conséquent avec les larves de moustiques. La pression exercée par ces insecticides pourrait conduire au développement de la résistance des moustiques, en particulier d'*An. gambiae* vis-à-vis de ces insecticides.

Ces divers travaux réalisés dans le cadre de la résistance des vecteurs du paludisme dans la plupart des pays africains ont été ponctuels et réalisés sur de petits échantillons ce qui ne permet donc pas de préciser tous les facteurs à l'origine de la résistance des vecteurs du paludisme. Sans avoir la prétention d'étudier le coût génétique de cette résistance, nous avons recherché dans cette étude, la relation entre le portage du gène

Kdr et l'infectivité des moustiques issus des zones de culture maraîchères, zones par excellence favorables au développement des moustiques en particulier d'*An. gambiae* s.l.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux de recherche **«Développement de la résistance d'*Anopheles gambiae* aux pyréthrinoïdes au Bénin: facteurs favorisants, mécanismes et impacts sur la transmission du paludisme»**.

Ce travail vise à étudier les facteurs responsables de la sélection de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides au Bénin, les mécanismes de cette résistance et leurs impacts sur la transmission du paludisme.

Pour répondre à cet objectif général, il a été question de :(a) déterminer le niveau de sensibilité/résistance d'*An. gambiae* aux insecticides agricoles dans les zones à forte et à faible utilisation de pesticides contre les ravageurs des cultures ; (b) étudier les mécanismes de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides chez *An. gambiae* et proposer un schéma de gestion de cette résistance ; et enfin (c) étudier l'impact de la résistance d'*An. gambiae* sur la transmission du paludisme dans les zones maraîchères.

Trois hypothèses ont été formulées afin d'atteindre ces objectifs spécifiques. En effet : (a) les pratiques paysannes en matière d'utilisation d'insecticide sont un des facteurs de sélection de résistance chez les vecteurs du paludisme ; (b) la fréquence du gène *Kdr* chez *An. gambiae* s.l varie en fonction du degré d'utilisation des pesticides dans le monde agricole ; (c) les génotypes homozygotes et hétérozygotes de la mutation *Kdr* n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis du *Plasmodium falciparum*.

II- Présentation du travail de thèse

Trois chapitres ont constitué l'essentiel du manuscrit. Il s'agit de :

Chapitre I : Revue de littérature

Cette revue vise à faire ressortir les éléments pertinents à nos hypothèses ci-dessus citées (pour ou contre). Elle est une phase préliminaire de la recherche et permet d'avoir une idée précise sur ce qui avait été fait dans le domaine. Dans le cadre de nos travaux, l'état des lieux sur le paludisme (les vecteurs du paludisme, la résistance des vecteurs aux insecticides, la transmission de cette maladie et les diverses méthodes de lutte) a été fait à partir des travaux déjà réalisés par d'autres chercheurs. Les publications, les communications et les sites internet ont servi de support

Chapitre II : Utilisation des pesticides chimiques et la résistance d'*An. gambiae* aux insecticides.

Dans ce chapitre, nous avons, dans un premier temps, fait le point sur les pratiques agricoles en matière d'utilisation d'insecticide chimique et leurs impacts sur la résistance des vecteurs du paludisme. Dans un deuxième temps, nous avons procédé à la mise en évidence de l'induction de la résistance par la présence des insecticides dans les gîtes larvaires.

Ces deux aspects ont été développés à travers deux sous-chapitres (thèmes).

Thème 1 : Situation de la résistance d'*An. gambiae* s.l aux insecticides au Bénin

Thème 2 : Dosage des résidus d'insecticides dans les échantillons de terre.

Chapitre III. Utilisation des pesticides en zones maraîchères et impacts sur l'environnement et la santé humaine.

Ce chapitre a permis dans un premier temps, de connaître les raisons liées au développement de la filière maraîchage au Bénin depuis quelques décennies. Dans un deuxième temps, les pratiques paysannes en matière d'utilisation d'insecticide dans ces sites maraîchers et leur impact sur la santé humaine et l'environnement ont été aussi étudiées à travers deux sous-chapitres.

Thème 1 : Développement des zones maraîchères en milieu urbain et périurbain

Thème 2 : Impact du développement des zones maraîchères sur la transmission du paludisme urbain.

Enfin, une discussion générale suivie d'une conclusion et les perspectives de recherche ont été aussi exposées dans cette thèse.

Chapitre I : Revue de littérature.

Revue de littérature

Dans ce chapitre, l'état des lieux sur le paludisme, les vecteurs responsables de la transmission de cette maladie, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, les diverses méthodes de lutte contre cette pandémie ont été occultés afin de pouvoir asseoir nos objectifs et vérifier les hypothèses qui justifient ce travail de thèse.

I-Généralités

1-1 Les parasites

Les parasites responsables de la maladie appartiennent au genre *Plasmodium*. Chez l'homme, quatre espèces peuvent conduire à la maladie: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus dangereuse car responsable de la quasi totalité des décès dus au paludisme (Burkot et al., 1987). Le moustique, l'hôte définitif, est une femelle appartenant au genre *Anopheles*, vecteur exclusif de cette maladie. L'homme, hôte intermédiaire, est le seul hôte réservoir. Au cours de son repas sanguin, la femelle anophèle inocule à l'homme la forme infectante du parasite: les sporozoïtes. Ces sporozoïtes passent dans le sang puis migrent vers le foie via les vaisseaux sanguins (figure 1). La phase exo érythrocytaire se met en place. Les sporozoïtes envahissent alors les hépatocytes et s'y multiplient. Ils évoluent en schizontes contenant plusieurs milliers de jeunes parasites appelés mérozoïtes. Puis la cellule éclate, libérant ainsi les mérozoïtes qui pénètrent alors les hématies par endocytose pour poursuivre leur développement. La phase suivante est dite érythrocytaire. Les mérozoïtes peuvent évoluer en trophozoïtes puis en schizontes qui libèrent à nouveau des mérozoïtes (étape cyclique), ou bien évoluer en gamétocytes. Ces derniers se différencient en gamétocytes mâles et femelles et sont ingérés par un anophèle femelle au cours du repas sanguin. C'est cette étape qui permet au moustique de devenir infectant et de représenter un danger pour l'homme, car contrairement à ce dernier, le moustique ne pâtit pas de la présence du parasite dans son organisme. La première phase au sein du moustique est la sporogonique. Les gamétocytes parviennent dans l'estomac du moustique où ils

se transforment en gamètes. Les gamètes femelles sont fécondés et il en résulte un zygote qui évolue en ookinète. Ce dernier s'implante au niveau de la paroi stomacale et évolue en oocyste. Une division méiotique et plusieurs mitoses conduisent au développement de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles dans l'hémolymphe. Ils gagnent ensuite les glandes salivaires du moustique, qui est alors infectant, et pourront être inoculés à l'homme avec la salive lors d'une prochaine piqûre. Il faut environ 10 à 18 jours, selon les conditions environnementales, pour permettre au parasite de finir son cycle sporogonique au sein du moustique.

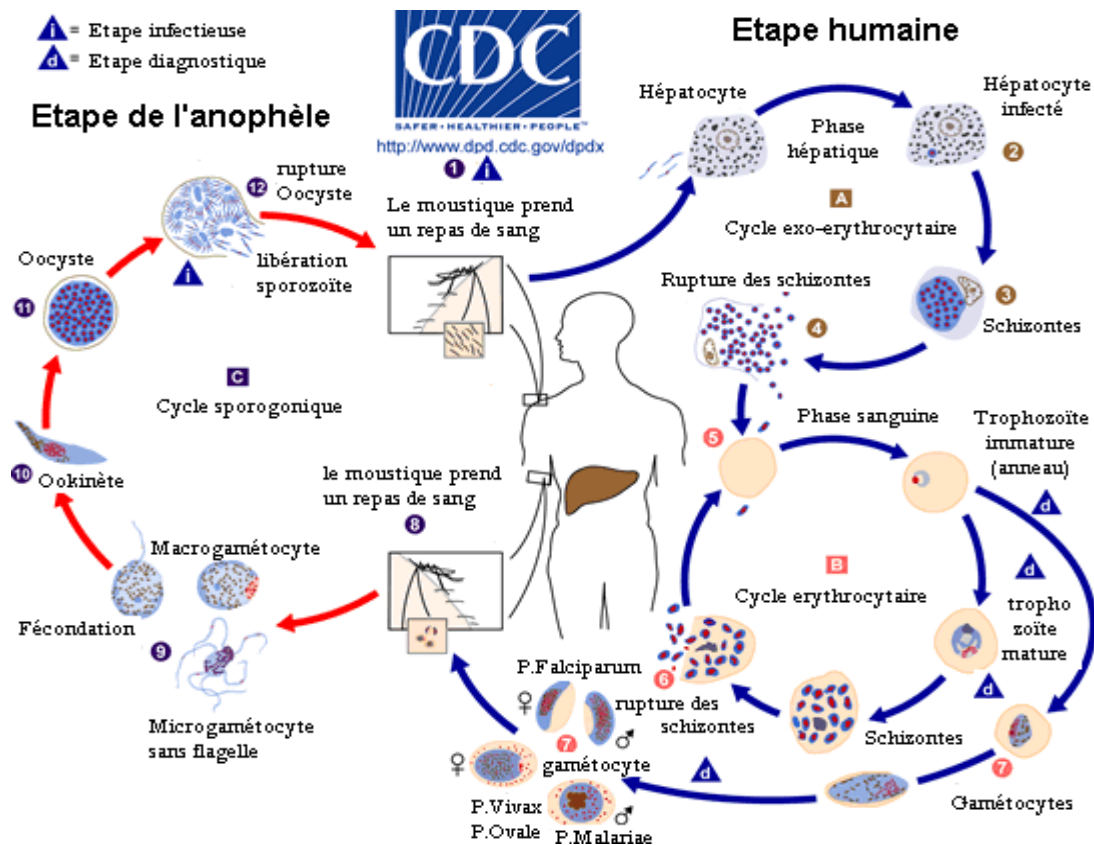


Figure 1 : Cycle de développement d'un plasmodium : l'homme est l'hôte intermédiaire et l'anophèle est l'hôte définitif (WHO, 2009)

1-2 - Les vecteurs du paludisme

Les vecteurs du paludisme appartiennent et 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 et *al.*,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 *An. gambiae* peut transmettre le paludisme.

Les principaux vecteurs du paludisme en Afrique sont : *Anopheles. gambiae* sensu stricto (s.s), *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti*.

Au Bénin, *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. funestus* appartenant au groupe d'*An. gambiae* sensu lato (s.l) sont les principaux vecteurs du paludisme (Akogbéto et *al.*, 1995). *An. gambiae* s.l présente deux formes moléculaires: la forme moléculaire Savane (S) et la forme moléculaire Mopti (M) (Favia et *al.*, 1997; della Torre et *al.*, 2005).

Le cycle de développement des moustiques comme chez la plupart des insectes comprend une phase pré imaginale (œufs, larves, nymphes) et une phase adulte.

La répartition géographique de ces espèces est liée à des contraintes climatiques et écologiques. En général, *An. gambiae* s.l occupe majoritairement la zone de forêt et de savane humide et sèche (Coluzzi, 1993 ; Wondji et *al.*, 2002 ; Touré et *al.*, 1998 ; Dia et *al.*, 2003). Cette espèce vit en sympatrie avec *An. arabiensis* dans la presque totalité des savanes afro-tropicales. *An. arabiensis* se retrouve presque seul dans les zones sahéliennes et désertiques. Des sept espèces du complexe, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont les vecteurs les plus importants. Les analyses cytogénétiques portant sur la caractérisation d'inversions chromosomiques, en particulier sur les inversions du bras droit du chromosome 2 (2R), ont montré que l'espèce *An. gambiae* s.s. est constituée de plusieurs sous-populations non panmictiques (Coluzzi et *al.*, 1985 ; Petrarca et *al.*, 1987, Touré et *al.*, 1994). Les inversions les plus fréquentes sont les 2Rbc, 2Ru et 2Rd et elles ont permis d'identifier 5 formes chromosomiques dans cette

espèce (Bamako, Bissau, Forêt, Mopti et Savane). Ces caryotypes sont répartis en Afrique de l'Ouest suivant des paramètres écologiques et éthologiques (Coluzzi *et al.*, 1985). Bien qu'aucune différence morphologique ou barrière reproductive n'aient été observées au laboratoire, certains auteurs estiment que la ségrégation de ces formes chromosomiques sont la preuve d'une spéciation en cours entre les cinq unités taxonomiques (Coluzzi *et al.*, 1985, Touré *et al.*, 1994 ; 1998). Les analyses moléculaires regroupent ces cinq formes chromosomiques en deux formes moléculaires à savoir : la forme Mopti (M) et la forme Savane (S). L'identification moléculaire de ces formes est basée sur un test PCR-RFLP.

1-3- Les œufs

Chaque ponte comporte 30 à 300 œufs selon l'espèce (Rozendaal, 1999). Les œufs de forme oblongue et de longueur d'environ 0,6 à 0,8 mm sont déposés isolément à la surface de l'eau et flottent grâce à des flotteurs latéraux. L'éclosion a lieu au bout de 2 à 3 jours dans les régions tropicales (Rodhain *et al.*, 1985).



Figure 2 : Micrographie des œufs d'anophèles (WHO, 2009).

1-4- Les larves

La larve qui émerge est vermiforme et est formée de trois parties: la tête, le thorax et l'abdomen. Elle est apode avec un corps recouvert de soies (figure 3). 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. La vie larvaire est composée de quatre stades successifs séparés par trois mues larvaires. Les larves d'anophèles sont détritivores; elles se nourrissent des microorganismes présents dans les gîtes larvaires: levures, bactéries. La durée de la vie larvaire varie de huit (8) à douze (12) jours dans les conditions favorables (Rodhain et *al.*, 1985).



Figure 3 : Schéma d'une larve d'anophèle (WHO, 1998).

1-5- Les nymphes

A la fin du quatrième stade larvaire, la cuticule se fend dorsalement et libère la nymphe qui est formée de deux parties: le céphalothorax et l'abdomen. La contraction des muscles abdominaux est à l'origine des mouvements chez la nymphe. Elle ne se nourrit pas (Mouchet et *al.*, 2004). La durée du stade nymphal va d'un jour à 3 jours chez *An. gambiae* selon la température (Gwadz et *al.*, 1996). C'est un stade de transition au cours duquel on observe de profondes transformations morphologiques et physiologiques qui aboutissent à l'adulte.

1-6- Les adultes

Après trois jours de vie nymphale, la cuticule du céphalothorax se fend dorsalement selon un plan sagittal et libère successivement les différentes parties de l'insecte adulte. Il reste immobile le temps que les ailes se déploient et que la cuticule durcisse. Les anophèles adultes ont un corps long et grêle formé de trois parties bien distinctes: la

tête, le thorax et l'abdomen. L'émergence dure quelques minutes et constitue une phase de grande mortalité du fait non seulement des prédateurs à la surface de l'eau mais aussi de la possibilité de noyade. Après l'émergence, les femelles ont besoin de 12 à 24 heures et les mâles de 72 heures pour que leur exosquelette durcisse et que les organes de reproduction se mettent en place. Les femelles prennent ensuite du jus sucré pour leurs besoins énergétiques (Mouchet et *al.*, 2004). Elles s'accouplent avec des mâles plus âgés au bout de vingt quatre (24) à quarante huit (48) heures après l'émergence. L'accouplement est en général crépusculaire et a lieu au cours d'un essaimage appelé la danse nuptiale. Après l'accouplement, certains mâles ‘’placent’’ un bouchon de fécondation au niveau de la chambre génitale de la femelle pour éviter une nouvelle copulation. Ce bouchon est très fréquent chez les femelles nullipares (femelles dont les organes génitaux ne sont pas encore aptes à la fonction de reproduction) d'*An. gambiae*.

En général les femelles d'anophèle ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie (Bregues et *al.*, 1973). Les spermatozoïdes sont stockés dans un réceptacle, la spermathèque, et rélargués lors de chaque ponte. Ils conservent leur pouvoir fécondant durant toute la vie du moustique (Bruce-Chwatt et *al.*, 1987).

Chez les anophèles, un repas sanguin est indispensable pour la maturation des ovaires. Les protéines de l'hémoglobine sont une source d'acides aminés nécessaires au développement des œufs. Le premier repas de sang a lieu au bout de vingt quatre (24) à quarante huit (48) heures de vie adulte. A la fin du repas de sang, le processus de digestion se met en place et la maturation ovarienne commence. Le moustique passe successivement du stade gorgé à semi-gravide puis à gravide. La femelle n'est gravide que trente six (36) à quarante huit (48) heures après le repas de sang (Mouchet et *al.*, 2004). Elle va alors à la recherche d'un site favorable à la ponte. Après la ponte, la femelle va à la recherche d'un autre repas sanguin pour le cycle. La période qui s'écoule entre la prise de sang et la ponte correspond au cycle gonotrophique. Il est d'environ quarante huit (48) heures chez les anophèles à une température de 23°C à 25°C.

La vie de l'imago est d'une vingtaine de jours en moyenne et elle ne dépasse pas un mois dans les conditions naturelles (Robert et *al.*, 1989). La femelle de la plupart des

espèces d'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* est un excellent vecteur du paludisme est son degré d'anthropophilie élevé (Coluzzi et al., 1993). Les conditions environnementales ont un effet sur la survie et le comportement des anophèles. En termes de transmission du paludisme, la température est un facteur particulièrement important car la température externe affecte directement la durée du cycle trophogonique et la durée du cycle sporogonique du parasite. En d'autres termes, plus le parasite met de temps à compléter sa maturation, moins il y a de chances que le moustique vive suffisamment longtemps pour transmettre l'infection.

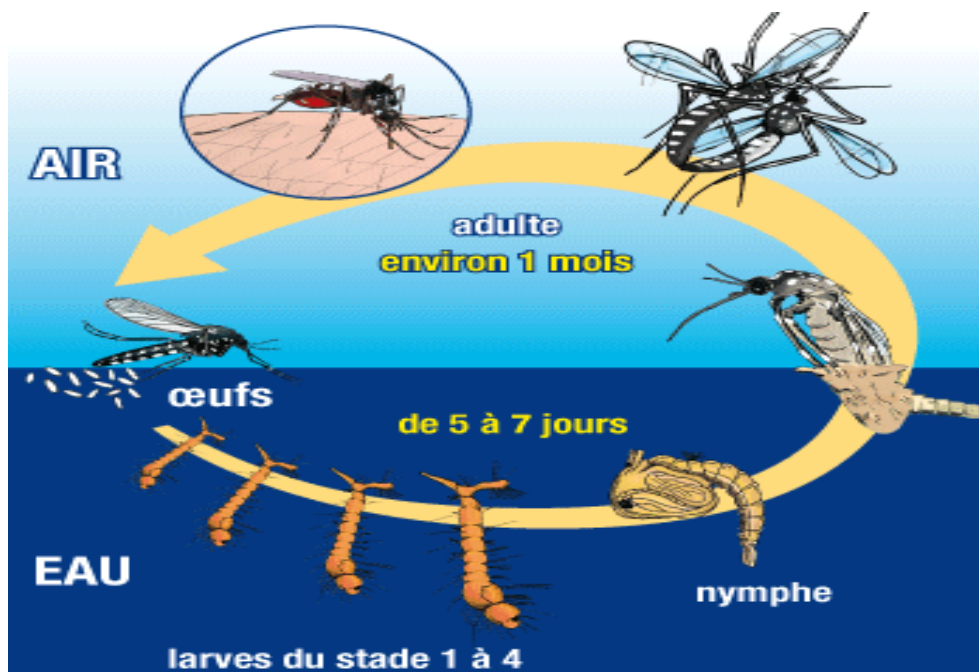


Figure 4 : Cycle biologique d'un anophèle.

Sur le continent africain, quasiment toutes les espèces appartiennent au complexe Anopheles. (Figure 5). Ce complexe comprend sept espèces : *An. gambiae* s.s, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus A* et *An. quadriannulatus B*. Les cinq dernières espèces citées ont un rôle nul ou faible dans l'épidémiologie de la transmission du paludisme avec une distribution étroite. En revanche *An. gambiae* s.s. a une aire de répartition extrêmement vaste en

Afrique et une capacité de transmission élevée. Il préfère des gîtes larvaires contenant de l'eau propre (non polluée), ensoleillés et dépourvus de végétation dans lesquels il pond ses œufs. Ce vecteur étant un acteur majeur dans la transmission du paludisme, il est l'objet de plusieurs méthodes de lutte anti-vectorielle.

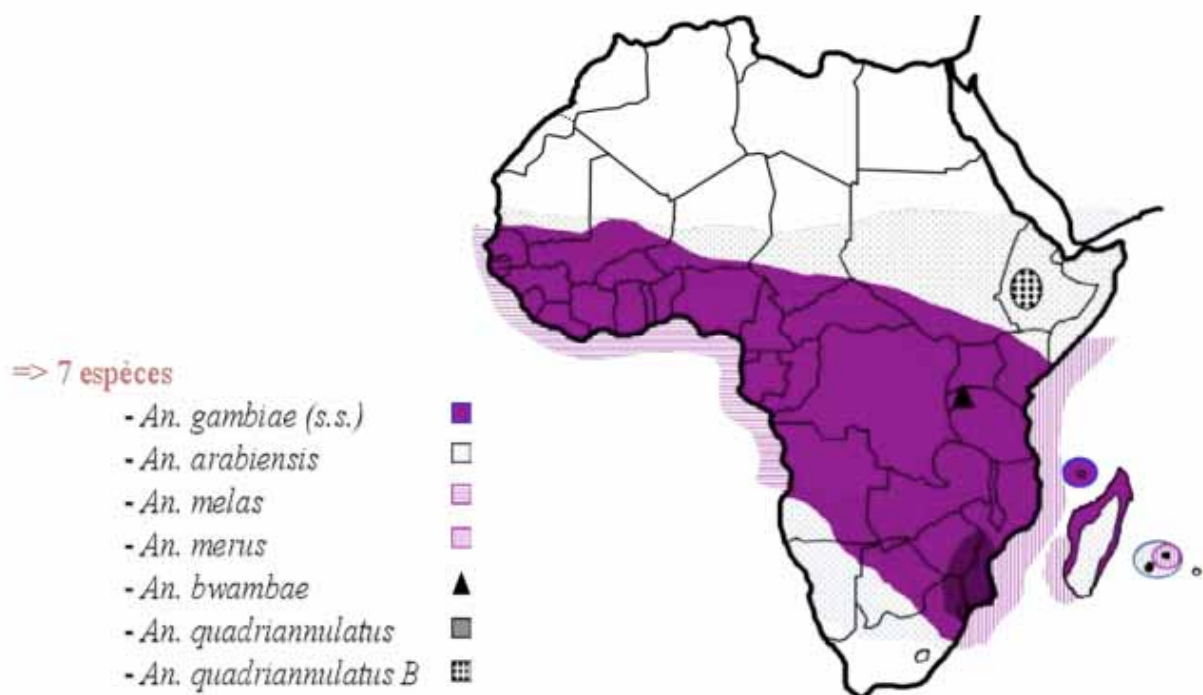


Figure 5 : Répartition des différentes espèces du complexe *An. gambiae* présentes en Afrique (Coluzzi et al., 1993).

2. Les méthodes de lutte anti vectorielle

L'objectif principal de la lutte antivectorielle est la diminution de la morbidité et de la mortalité palustre grâce à l'abaissement du taux d'inoculation entomologique. L'inoculation nécessitant la présence du vecteur infecté, les méthodes actuelles visent principalement la réduction du contact homme vecteur, la densité du vecteur et la durée de vie du vecteur adulte (WHO, 1998).

2.1. Les méthodes physico-chimiques

2.1.1 L'assainissement et l'aménagement de l'environnement

L'écologie du paludisme est étroitement liée à la présence d'eau, si bien que les eaux stagnantes de surface générées par l'activité de l'homme et les pluies sont des gîtes potentiels. De ce fait, la réduction du nombre des gîtes larvaires contribue à réduire le risque de transmission du paludisme. De plus, l'aménagement urbain et l'assainissement des zones péri-urbaines sont autant de moyens pour réduire la transmission du paludisme.

2.1.2. La pose d'écran aux ouvertures des habitats

La pose d'écran aux ouvertures et aux avant-toits des habitats réduit efficacement le contact homme vecteur. Ce type de contrôle vectoriel présente l'avantage d'être permanent (WHO, 1998). Cependant, le coût élevé et la praticabilité de cet outil handicapent sa mise en place dans les pays en voie de développement contrairement aux matériaux imprégnés qui se trouvent à la portée de tout le monde.

2.1.3. Les matériaux imprégnés : cas de la moustiquaire imprégnée.

Les moustiquaires sont des textiles fait de coton, ou de fibres synthétiques de mailles d'environ 61 trous par cm². Elles permettent de réduire le contact mécanique vecteur/homme. Le terme moustiquaire imprégnée lui est attribué par suite de son trempage dans une solution d'insecticide. L'initiative « Faire reculer le paludisme» projette d'atteindre à l'orée 2025, un taux de protection de 80% des personnes à risque par les méthodes appropriées de lutte anti vectorielle comme les moustiquaires imprégnées d'insecticide. Ces moustiquaires sont souvent distribuées gratuitement ou subventionnées par les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) lors des campagnes nationales ou par des organismes internationaux.

L'usage de cet outil et des rideaux imprégnés dans certains pays constituent un moyen essentiel de réduction de la transmission du paludisme (Darriet et *al.*, 1998; Lengeler et *al.*, 1996).

Aujourd'hui, deux marques de moustiquaires sont couramment utilisées. Il s'agit des moustiquaires de type Olyset (imprégnation faite à la perméthrine) et les Permanet (imprégnation faite à la delthaméthrine).

Mais la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides notamment les pyréthriinoïdes utilisés dans le cadre de l'imprégnation des matériaux imprégnés et les effets néfastes de ces insecticides sur l'environnement et l'homme obligent les chercheurs à recourir à la lutte biologique contre les vecteurs du paludisme.

2-2- Les méthodes biologiques.

Elles consistent à l'utilisation des bactéries et champignons entomopathogènes ou des prédateurs naturels contre les larves.

2.2.1. Les bactéries entomopathogènes

Ce sont des micro organismes qui se développent aux dépens des larves de nombreux insectes. Les plus utilisés dans la lutte contre les moustiques appartiennent au genre *Bacillus*

- *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis israelensis est une espèce bactérienne qui vit naturellement dans les sols. La bactérie synthétise des cristaux constitués de protoxines. Ces dernières, une fois ingérées par l'insecte sont transformées en toxines actives au niveau du tube digestif par le biais d'enzymes digestives. Les toxines ainsi activées vont se fixer sur des récepteurs spécifiques des cellules du tube digestif de l'insecte provoquant ainsi d'importantes lésions et une paralysie du tube digestif. La larve cesse de se nourrir très rapidement et meurt de septicémie dans les 24 à 48 heures après l'ingestion des cristaux. Cette bactérie est adaptée à la lutte contre les espèces de moustiques et a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche dans les pays du nord (Darriet et al ; 1998) et plus récemment au Bénin (Akogbéto et al., 2010)

- *Bacillus sphaericus*

Bacillus sphaericus produit également une toxine larvicide. Elle se développe mieux dans les eaux chargées en matières organiques où vivent les espèces du genre *Culex*.

2.2.2. Les champignons entomopathogènes

Plusieurs espèces de champignons entomopathogènes ont été isolées et testées sur la plupart des moustiques vecteurs de maladies. Cependant, ceux qui sont utilisées en santé publique doivent avoir les caractéristiques suivantes:

- Tuer à la fois la forme larvaire et adulte.

- Ne requérir qu'une seule ou quelques application(s) par saison.
- Etre dispersible par les femelles adultes dans les gîtes non encore traités.
- Montrer une activité résiduelle et persistante dans la population de moustique.
- Ne tuer sélectivement que les moustiques.
- Agir dans une marge assez large de température, d'humidité relative et de gîtes variés.
- Etre d'un bon rapport coût/efficacité.
- Avoir une longue durée de vie.
- Ne présenter aucune nuisance pour l'homme et les organismes non ciblés.

Le genre *Beauveria* est le champignon entomopathogène le plus utilisé contre les larves de moustiques à cause de sa virulence sur ces dernières.

- *Beauveria*

Beauveria est le genre de champignon entomopathogène regroupant plusieurs espèces, dont les spores peuvent être utilisées comme moyen de lutte. Parmi les espèces qui le composent, *Beauveria bassania* infecterait les stades larvaires et adultes de *Culex tarsalis*, *Culex pipiens* et *An. albimanus* (Clark et al., 1968). Suivant les études de Scholte et al. (2004), on obtiendrait 82% d'adultes d'*An. gambiae* infectés avec une LT50 (letal Time 50) de 3,5 jours comparé à 8,8 jours du groupe contrôle.

2.2.3. Les poissons larvivores

Depuis près de 60 ans, les poissons larvivores comme les Gambusies (*Gambusia ajjinis*), les guppys (*Poecilia reticulata*) et les tilapias (*Oreochromis* spp) sont utilisés pour lutter contre les larves d'anophèles, mais leur emploi n'est efficace que si ces poissons peuvent vivre dans les mêmes gîtes que les moustiques (Mouchet et al., 2004). Des succès ont cependant été enregistrés dans des citernes en Somalie (Darriet et al., 1998) sur les larves de *Anopheles arabiensis*.

2-3. Les méthodes chimiques

Les composés utilisés au début contre les organismes nuisibles étaient des pesticides de première génération relativement simple à base d'arsenic, de soufre, de chaux, de dérivés du pétrole, de substance à base de fluor ou extraite de plantes comme la

nicotine. Ces pesticides se caractérisent par leur toxicité relativement élevée dans l'environnement (Philogene et *al.*, 1991).

Par la suite, des composés synthétiques dits de deuxième génération ont été mis en place, il s'agit des organochlorés, des organophosphorés et des carbamates. Ces pesticides de deuxième génération et les pyréthriinoïdes sont encore utilisés de nos jours en agriculture et dans la lutte antivectorielle.

2-3-1. Les classes d'insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle.

- Les organochlorés : DDT

Le dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT) est un composé qui présente une grande solubilité dans les solvants organiques, les graisses et le pétrole. Sa découverte en 1939 a constitué une véritable révolution dans la lutte contre les insectes. Cette molécule fut largement utilisée en agriculture et en santé publique. Il est utilisé en santé publique notamment lors des pulvérisations intra-domiciliaire. Il agit sur le système nerveux périphérique et central des insectes. L'action de cet insecticide est rapide et se traduit par un effet de choc (knock-down) réversible aux doses sub-létales. Le DDT a été abandonné à cause de son accumulation dans les chaînes alimentaires et de l'apparition de la résistance chez les insectes.

- Les organophosphorés

Les organophosphorés (OP) sont des pesticides utilisés en milieu agricole comme insecticides. Ils sont moins toxiques que les organochlorés et agissent en inhibant l'acétylcholinestérase, provoquant ainsi l'accumulation d'acétylcholine et le blocage de la transmission de l'influx nerveux. Ils ont le même mode d'action que les carbamates. Le malathion, le parathion, le temephos et le fénitrothion sont les insecticides de cette classe qui sont utilisés contre les moustiques.

- Les carbamates

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. Ces composés sont moins toxiques que les précédents qu'ils ont progressivement remplacés. Ils sont toujours utilisés. Ils sont de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, enzyme qui dégrade l'acétylcholine. Cette dernière agit au niveau des synapses cholinergiques localisées dans le système nerveux central comme neuromédiateur. Lorsque les carbamates se

fixent sur l'acétylcholinestérase, l'acétylcholine s'accumule dans la fente synaptique et les récepteurs à l'acétylcholine se bloquent en position ouvert, ce qui entraîne la paralysie puis la mort de l'insecte. Le propoxur et le bendiocarb sont les deux insecticides de cette famille recommandés par l'OMS.

- Les pyréthriinoïdes

Selon leur origine, ils ont été classés en pyréthriinoïdes naturelles ou insecticides botaniques extraites des plantes (*Solanaceae*, *Compositaceae*) et en pyréthriinoïdes synthétiques (carboxylester).

Les pyréthriinoïdes ont la même cible que le DDT et induisent rapidement un effet knock-down. Ils possèdent des propriétés excito-répulsives et sont peu toxiques pour les mammifères aux doses opérationnelles.

Les pyréthriinoïdes sont largement utilisés en agriculture (Chandre *et al.*, 1999; Diabaté *et al.*, 2004a) et dans l'imprégnation des moustiquaires à cause de leur effet irritant marqué sur les moustiques (Chandre *et al.*, 1999). Les plus utilisés sont: la perméthrine, la deltaméthrine, la lambdacyalothrine, la cyperméthrine et la cyfulthrine. Parmi ces insecticides, l'alphacyperméthrine confère une efficacité maximale aux moustiquaires imprégnées contre *An. gambiae* (Hougard, 2003).

2.3.2. Les répulsifs

Ce sont des substances odoriférantes qui ont la faculté de repousser les insectes. Ils présentent en général une faible rémanence et une durée moyenne de répulsion de 6 à 7h. Ils ont 4 modes d'action variables:

- Inhibition de la réponse à un signal attractif.
- Réorientation du message sensoriel de l'attraction à la répulsion.
- Activation d'un récepteur qui contrôle un comportement compétitif.
- Activation simultanée de différent type de récepteur causant la perte du signal spécifique permettant la localisation de l'hôte. On distingue deux groupes de répulsifs: les répulsifs naturels et les répulsifs synthétiques.

2.3.3. Les régulateurs de croissance

D'autres insecticides appartenant à la classe des inhibiteurs de croissance et sont des analogues d'hormones (Darriet *et al.*, 1998).

Les inhibiteurs de croissance sont de 2 catégories:

- les ecdysoïdes qui inhibent la sclérification de la cuticule après les mues larvaires;
- les juvénoïdes qui bloquent la nymphose, de sorte que la nymphe meurt sans donner d'adulte (Mouchet, 2004).

Diverses études ont été conduites en laboratoire et sur le terrain pour évaluer la rémanence des inhibiteurs de croissance sur les anophèles (Darriet et *al.*, 1998). Mais la plupart d'entre elles ayant été réalisées dans un contexte purement expérimental, il serait prématuré d'extrapoler leurs conclusions à des opérations de lutte à grande échelle (Darriet, 1998).

Ces d'insecticides utilisés en agriculture et santé publique pour lutter contre les ravageurs de culture et les vecteurs du paludisme ont été utilisés à forte dose ce qui a contribué à la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides notamment aux organochlorés et plus récemment aux pyréthrinoïdes.

3. La résistance d'*An. gambiae* s.l aux insecticides

Le phénomène de résistance a été défini par l'O.M.S comme « la capacité d'une population d'insectes à tolérer des doses d'insecticides qui seraient létales pour la majorité des individus dans une population normale de la même espèce» (WHO, 1998).

En effet, les insecticides sont des composés obtenus par synthèse chimique ou extraits d'organismes. Ils agissent en se combinant avec une cible moléculaire (protéine) et diminuent ou interrompent ainsi son activité physiologique normale, entraînant la mort de l'insecte. La résistance est une adaptation génétique aux modifications de l'environnement: elle est le résultat de la sélection des individus qui ont la plus grande probabilité de survivre et de se reproduire en présence d'insecticides. Cette probabilité varie entre individus d'une même population en fonction du nombre et de la nature des gènes de résistance qu'ils portent. Elle dépend aussi de la pression de sélection exercée par le milieu, c'est-à-dire de la concentration d'insecticide.

Plusieurs étapes sont nécessaires avant que la molécule d'insecticide interagisse avec sa cible physiologique (pénétration, transformation en métabolite actif, transport jusqu'à la cible et interaction avec cette dernière). Tout mécanisme qui bloque cette chaîne d'étapes conduit à une résistance.

Selon (Haubruge *et al.*, 1998), les différents mécanismes qui permettent aux insectes de résister à l'action des insecticides peuvent être regroupés en trois catégories principales: la résistance métabolique, la résistance liée à la modification de la cible et la résistance croisée à plusieurs familles d'insecticides.

3. 1. Résistance métabolique

Ces mécanismes sont basés sur les systèmes enzymatiques que possèdent tous les insectes pour assurer la détoxification naturelle des xénobiotiques. Généralement trois catégories d'enzymes interviennent dans cette fonction, à savoir les estérases, les monooxygénases à cytochromes P450 et les glutathion-S-transférases (GST).

***Les estérases**

Les estérases catalysent l'introduction d'une molécule d'eau au niveau d'une liaison ester ou amide, spécifique du substrat. Les estérases impliquées dans les résistances peuvent être réparties en deux catégories: les carboxylestérases qui ont une action directe dans la dégradation d'organophosphorés et les estérases non spécifiques qui fixent l'insecticide sans le dégrader (Haubruge *et al.*, 1998). Les carboxylestérases présentant une activité accrue ou pas à l'égard de l'ester de naphthyle jouent un rôle important dans la résistance aux pesticides. La résistance liée aux estérases peut être inhibée par l'utilisation du triphényl de phosphate qui diminue l'activité des estérases vis-à-vis de l'acétate de naphthyle (Hemingway *et al.*, 2004). Les travaux de Corbel *et al.* (2007) au Bénin ont montré la présence des estérases en forte quantité dans les populations d'*An. gambiae* issues des zones sous traitement insecticide par rapport aux zones où aucun traitement n'est fait.

Les monooxygénases à cytochromes P450

Elles appartiennent à 6 grandes familles de gènes, dont les CYP4, CYP6 et CYP9 sont les seules familles qui jouent un rôle dans la résistance aux insecticides chez les insectes. Elles sont principalement impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes (Brogdon *et al.*, 1997 ; Shrivastata *et al.*, 1970).

Les glutathion-S-transférases (GST)

Ce sont des enzymes qui conjuguent les insecticides avec la forme réduite du glutathion pour former des composés moins toxiques pour l'insecte. Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules des corps gras et des muscles. L'enzyme la plus importante de ce groupe, la DDT-ase intervient spécifiquement dans la dégradation du DDT.

3.2. Résistance liée à la modification de la cible

Le second type de mécanisme de résistance communément trouvé chez les insectes est la modification de la cible de l'insecticide. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux : canal sodium voltage dépendant (Csvd), acétylcholinestérase (AChE), et le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA).

Le canal sodium «voltage dépendant» (Csvd)

Certains insecticides provoquent chez l'insecte un effet *Knock down* (*KD*). Cet effet est dû à la fixation des pyréthrinoïdes ou du DDT sur le Canal sodium voltage dépendant (Csvd) qui est situé sur la membrane plasmique des cellules nerveuses. Ils interviennent dans la transmission de l'influx nerveux le long des axones. Ces canaux une fois activés (position ouverte) entraînent un flux d'ions sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intercellulaire, générant un potentiel d'action. Cette dépolarisation provoque l'activation des Csvd situés à proximité et se propage de proche en proche engendrant une vague de dépolarisation qui assure la transmission de l'influx nerveux (Chapman, 1969). Les pyréthrinoïdes et le DDT agissent en modifiant la cinétique d'inactivation des Csvd. L'exposition d'une souche sensible d'insectes au DDT ou à un pyréthrinoïde entraîne une paralysie très rapide ou effet knock-down (*Kd*). Une mutation ponctuelle résultant du remplacement de la leucine par la phénylalanine au niveau du sixième segment du domaine II du gène codant pour le CNaVdp (mutation *Kdr* Leu-Phe) confère la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT en Afrique de l'Ouest (Dong, 1986). En Afrique de l'Est c'est plutôt le remplacement de la leucine par la sérine à la même position qui confère la résistance aux

pyréthriinoïdes (mutation *Kdr* Leu-Ser). La modification de l'un ou des sites d'action du C_{svd} jouerait un rôle important dans le phénomène de la résistance.

L'acétylcholine estérase (AChE)

L'AChE a pour cible les organophosphorés et des carbamates. Elle joue un rôle physiologique indispensable en hydrolysant l'acétylcholine dans les synapses cholinergiques. A l'arrivée de l'influx nerveux, la terminaison pré-synaptique libère de l'acétylcholine. Ce neurotransmetteur diffuse à travers l'espace synaptique et active les récepteurs nicotiques (leur ouverture) situés dans la membrane post-synaptique: l'entrée d'ions sodium et la sortie d'ions potassium entraînent une dépolarisation locale qui déclenche un potentiel d'action assurant la propagation de l'influx nerveux. Une modification sur l'AChE aurait pour conséquence une résistance aux organophosphorés et aux carbamates.

Les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyriques (GABA_R)

Les GABA_R sont les cibles de nombreux insecticides organohalogénés, dont la dieldrine et le lindane. Tout comme dans le cas de l'AChE1, cette mutation entraîne une modification structurale du site d'action réduisant ainsi la fixation des inhibiteurs. Ces insecticides se fixent au récepteur de l'acide gammabutyrique et inhibent le fonctionnement du canal chlore qui lui est associé. L'ouverture de ce canal induit une hyperpolarisation de la membrane nerveuse et son inactivation prolongée, perturbe l'ensemble du fonctionnement du système nerveux (Haubruge *et al.*, 1998). Tout comme les cibles précédentes, la résistance est conséquente au changement de ces récepteurs.

3-3. Résistance croisée à plusieurs familles d'insecticides

La résistance croisée se produit lorsqu'un mécanisme de résistance qui a permis à l'insecte de résister à un premier insecticide, confère également la résistance à des composés de la même famille, ou d'une autre famille d'insecticides WHO (1998). Le phénomène de résistance croisée est fréquent dans les populations de vecteurs. Par exemple, le DDT et les pyréthriinoïdes sont chimiquement différents, mais les deux

agissent sur la même cible (C₅vd). La résistance croisée existe également entre certains carbamates et organophosphorés lorsque la résistance est due à l'acétylcholinestérase modifiée (figure 6).

	Métabolique			Récepteur cible		
	Estérases	Mono-oxygénases	Glutathion-S-tranfêrases	<i>kdr</i>	<i>ace-1^R</i>	<i>GABA</i>
Pyréthriñoïdes	●	●●	●	●		
Organochlorés (DDT)		●	●●	●		
Carbamates	●	●	●		●	
Organophosphorés	●●	●	●		●	
Organochlorés (Cyclodiennes)						●
Avermectines						●

Figure 6 : Mécanismes majeurs conférant la résistance aux importantes familles d'insecticides chez les moustiques adultes.

N.B : La taille du point montre les impacts relatifs du mécanisme de résistance.

Ces multiples résistances développées par les insectes notamment les moustiques ont été signalés dans la plupart des pays africains mais de façon brève et sur de petits échantillons ce qui ne permet donc pas de préciser tous les facteurs à l'origine de la résistance des vecteurs du paludisme. De plus, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides notamment aux pyréthriñoïdes pourrait être un des facteurs qui pourrait assurer de façon continue la transmission du paludisme notamment auprès des populations vivants proches des sites maraîchers et rizicoles ; zones par excellence favorables au développement larvaire.

A cet effet, il serait important qu'après cette brève revue de littérature sur la résistance des vecteurs du paludisme, de connaître les facteurs favorisant l'émergence de cette résistance, leur impact sur le développement larvaire et la transmission du paludisme. La connaissance de ces facteurs permettra de faire l'état des lieux en ce qui concerne l'utilisation des pesticides en milieu agricole et en santé publique et leurs conséquences sur la résistance des vecteurs du paludisme d'une part, et d'autre part l'impact de cette résistance sur la transmission du paludisme notamment dans les zones maraîchères.

**Chapitre II- Utilisation des pesticides chimiques et la résistance
d'*An. gambiae* aux insecticides.**

Le paludisme est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les nourrissons et les femmes enceintes (WHO, 2009). Dans l'attente d'un vaccin efficace, plusieurs initiatives ont été développées pour lutter contre cette pandémie dont la plus importante est la lutte anti-vectorielle à travers l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (WHO, 1998). Dans la décennie 1990-2000, l'introduction de moustiquaires imprégnées comme prévention contre les piqûres de moustiques a entraîné une réduction de la morbidité palustre allant de 40% à 63% chez les enfants au Kenya, en Tanzanie, en Guinée Bissau et en Gambie et a permis de sauver 5.500 vies sur 1000 en Gambie, au Kenya, au Ghana et au Burkina (Lengeler et al., 1996). Dans le projet Mekong, une protection massive de plus de 10 millions d'habitants contre les piqûres de moustiques par une combinaison de moustiquaires imprégnées et de pulvérisation intra-domiciliaire (PID) a réduit, sur une période de 10 ans, la mortalité due au paludisme de 5000 à 0 décès (D'Alexandro et al., 1995). Selon Akogbéto et al. (2010), le poids du paludisme est en nette régression en Afrique au sud du Sahara grâce à une combinaison de plusieurs mesures de lutte. Les résultats de cette recherche indiquent que dans l'île de Bioko en Guinée Equatoriale, l'utilisation simultanée de la PID, des MILD et des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisine (CTA) a conduit, en 4 ans (de 2003 à 2007), à une réduction de 90% de la positivité des anophèles en antigène *circumsporozoïtique* de *Plasmodium falciparum*. Dans la même période, la parasitémie palustre chez les enfants de moins de 5 ans a chuté de 42 à 18% et la mortalité dans le même groupe d'âge a été réduite de 70%. Au Bénin, les travaux conduits par Akogbéto et al. (2011, sous presse) ont montré une baisse du taux d'inoculation entomologique dans les zones sous traitement PID par rapport au témoin.

Ces résultats montrent que le poids du paludisme est en régression en Afrique grâce à l'utilisation des moustiquaires imprégnées et à la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide et constituent donc un espoir pour la lutte contre le paludisme. Cependant, un problème majeur limitant leur efficacité se pose: l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes, principaux insecticides

utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires et les pulvérisations intra-domiciliaires (Martinez-Torrez *et al.*, 1998).

Pour étudier l'impact des pesticides sur le développement larvaire et la résistance d'*An. gambiae* aux insecticides agricoles, nous avons déterminé le niveau de sensibilité d'*An. gambiae* à différents insecticides dans les zones à forte utilisation de pesticides (zones cotonnières à programme calendaire et à Lutte Etagée Ciblée et les zones maraîchères où les paysans font entre 4 à 6 traitements de 250g/ha/an de cyfluthrine et puis d'alpha- cyperméthrine avant la récolte) d'une part, et d'autre part dans les zones à faible utilisation (zones rizicoles où les paysans font au plus deux traitements avant la récolte à une dose de 10g/ha/an de cyfluthrine et puis d'alpha-cyperméthrine). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'une zone témoin (zones céréalières) où la nécessité d'utilisation d'insecticide n'est pas de règle à cause de l'importance des ravageurs.

Par ailleurs, en admettant que le type de mécanisme de résistance développé est fonction de la pression insecticide sur les moustiques, nous avons recherché chaque type de mécanisme (*Kdr* et *Ace- IR*) dans les différentes zones sélectionnées.

La préoccupation constante des environnementalistes par rapport aux intrants est l'impact de ces produits sur l'environnement. Nous avons abordé cet aspect pour étudier l'influence des pesticides sur le développement des larves de moustiques. En effet, la forte utilisation des pesticides dans les zones maraîchères et dans les zones cotonnières a toujours représenté un danger réel non seulement pour l'environnement mais aussi pour la santé des agriculteurs et des populations en Afrique au Sud du Sahara. Les pesticides sont souvent utilisés sans discernement par des agriculteurs ne sachant lire ni les étiquettes, ni les doses d'utilisation préconisées. Pire encore, les conditions de stockage et la distribution des pesticides dans des contenants qui sont encore réutilisés à des fins alimentaires sont sources d'intoxications alimentaires souvent graves et parfois mortels au niveau des populations les plus vulnérables en particulier les enfants et les femmes (WHO, 2009).

Au Bénin, entre mai 2007 et juillet 2008, 105 cas dont 9 décès dus à l'endosulfan ont été rapportés (Martin *et al.*, 2010).

Si l'utilisation d'insecticides agricoles crée de pertes en vies humaines dans le rang des paysans, il n'en demeure pas moins que ces pesticides qui se retrouvent dans le sol une fois utilisés par les paysans contre les ravageurs des cultures ne puissent pas avoir d'impacts sur le développement des larves de moustiques. En effet, selon Akogbéto et *al.* (2006), les traitements insecticides qui s'effectuent dans les champs cotonniers et maraîchers projettent des particules d'insecticides dont certaines restent en contact avec le sol et les gîtes des moustiques, et par conséquent avec les larves de moustiques. Selon les mêmes auteurs, la pression exercée par ces insecticides pourrait conduire au développement de la résistance des moustiques, en particulier d'*An. gambiae* vis-à-vis de ces insecticides.

Le gène *Kdr* étant le principal mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes, sa grande distribution dans plusieurs pays d'Afrique au sud du Sahara, serait due à l'utilisation massive de ces pyréthriinoïdes dans le monde agricole et en santé publique.

Dès lors la connaissance des facteurs et mécanismes favorisant la résistance d'*An. gambiae* aux pyréthriinoïdes, s'avère indispensable pour une bonne gestion de la résistance des vecteurs du paludisme.

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'impact des traitements insecticides agricoles contre les ravageurs de culture sur le développement de la résistance aux insecticides chez les populations d'anophèles dans les zones à forte et faible utilisation d'insecticide.

Pour atteindre ce but, trois objectifs spécifiques ont guidé ce travail. Il s'agit de :

- Connaître les pratiques paysannes en matière d'utilisation de pesticides agricoles.
- Déterminer le niveau de sensibilité/résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides couramment utilisés en agriculture et en santé publique (pyréthriinoïdes, carbamates et le DDT).
- Identifier les mécanismes de résistance aux insecticides agricoles chez *An. gambiae* s.l
- Evaluer l'impact des traitements insecticides sur le développement larvaire à travers une simulation indirecte de gîtes.

Thème 2.1 : Situation de la résistance d'*An. gambiae* s.l aux insecticides au Bénin

La résistance aux insecticides pyréthrinoïdes est largement répandue chez les vecteurs du paludisme dans plusieurs pays d'Afrique, dont le Bénin, où la lutte anti vectorielle contre le paludisme repose sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes (Chandre *et al.*, 2010, Yadouleton *et al.*, 2011). A l'heure actuelle, de nombreuses questions demeurent sur l'origine et avec les facteurs favorisant la sélection de la résistance d'*An. gambiae* s.l aux insecticides au Bénin.

Le présent sous-chapitre fait l'état des lieux sur l'utilisation des pesticides utilisés en milieu agricole et leur impact sur le niveau de la résistance des vecteurs du paludisme afin de répondre aux nombreuses questions liées à l'origine de la résistance des vecteurs du paludisme ci-dessus énumérées.

2-1.1. Zones d'études

Dans le but de connaître l'impact des pesticides agricoles sur la sensibilité d'*An. gambiae* s.l, des zones à forte et à faible utilisation de ces pesticides par les paysans pour lutter contre les ravageurs des cultures ont été choisies du sud au nord du Bénin.

2.1.1. 1 Zones à forte utilisation de pesticides agricoles

Dans ce travail, les zones à forte utilisation de pesticides sont les sites cotonniers à programme calendaire, à Lutte Etagée Ciblée (LEC) et les périmètres maraîchers où les paysans font entre 4 et 6 traitements de cyfluthrine et d'alpha-cyperméthrine à 250 g/ha/an avant la récolte. A cet effet, trois sites maraîchers ont été choisis dont deux au sud du Bénin (Houeyiho à Cotonou, Acron à Porto-Novo) et un au nord (Azèrèkè à Parakou) (figure 7), avec quatre sites de culture de coton (Parakou ; N'dali ; Kandi et Banikoara) dans les départements du Borgou et de l'Alibori ; ce choix a pris en compte les diverses stratégies de protection phytosanitaire contre les ravageurs des cultures (figure 7). En effet, dans les zones cotonnières de Parakou, Kandi et Banikoara, un

champ de coton à traitement calendaire (traitement qui se fait suivant un calendrier bien fixe où les paysans pratiquent 6 traitements insecticides à forte dose pendant le cycle du coton) a été choisi dans chacune de ces localités. De plus, à Kandi et à Banikoara, un champ de coton à traitement biologique (sans traitement insecticide et sans engrais chimique) a été choisi. Les champs cotonniers à LEC ont été choisis à N'dali, Kandi et à Banikoara. La méthode LEC consiste à ne traiter avec une faible dose d'insecticide les champs que lorsque le seuil d'attaque du cotonnier par les ravageurs est atteint (5 larves d'*Helicoverpa armigera* échantillonnés sur 50 plants de coton).

Selon Akogbéto (2005), l'utilisation des insecticides agricoles est très importante dans les sites cotonniers et maraîchers du Bénin à cause de dégâts des ravageurs en occurrence *Helicoverpa armigera* et *Plutella xylostella* sur les plants de coton et de chou respectivement. Les pyréthrinoïdes, en particulier la deltaméthrine et la cyfluthrine, sont les produits les plus utilisés dans la zone cotonnière à traitement calendaire, à LEC et dans les sites maraîchers.

2.1.1. 2. Zones à faible utilisation de pesticides agricoles

Dans le cadre de notre étude, ces zones se définissent comme les zones où les paysans font au plus deux traitements avant la récolte à une dose de 10g/ha/an. C'est le cas des périmètres rizicoles. Les quelques rares paysans qui utilisent des pesticides chimiques pour le contrôle des ravageurs de leurs cultures respectent les doses et prescriptions indiquées sur les notices (Akogbéto et *al.*, 2005). Cette faible utilisation de pesticides chimiques concerne beaucoup plus les zones rizicoles.

La zone rizicole de Malanville au nord du Bénin dans le département de l'Alibori a été choisie pour investigation. Cette zone rizicole est un périmètre de 70 hectares. Deux cultures de riz sont pratiquées par an dont une en contre saison. L'utilisation d'insecticide reste faible dans cette localité.

2.1.1.3. Zones témoins

Les zones céréalières ont été choisies comme zones témoins. Le choix des milieux de culture de céréales s'explique par le fait que ces produits se développent sans apport d'engrais et de pesticides chimiques ; par conséquent, la pression sélective due à l'utilisation des insecticides est très faible, d'où la possibilité que les moustiques de ces milieux soient sensibles aux insecticides.

Trois localités (Comè, Kétou et Séhouè) au sud du Bénin ont été choisies. Le choix des localités prospectées a tenu compte des conditions climatiques, des pratiques habituelles de la population en matière de protection contre les piqûres des moustiques et des pratiques paysannes pour lutter contre les ravageurs des cultures.

2.2-Méthodologie

2.2-1- Enquêtes CAP.

L'enquête CAP (Connaissance, Attitude, Pratique) a pris en compte les paysans des périmètres maraîchers, rizicoles, cotonniers et céréaliers précédemment cités. Ces paysans ont été soumis à un questionnaire quantitatif et qualitatif. La taille de l'échantillon a été déterminée suivant la méthode de Anderson (1993) et l'orientation du choix des paysans à interviewer a été faite suivant la technique de bouteille (Snedecor et *al.*, 1974). Cette technique consiste à jeter la bouteille de façon quelconque. Le bout de la bouteille indique donc le sens qu'il faut utiliser pour aller interroger les paysans.

Les questionnaires ont porté, entre autres, a) sur l'utilisation ou non de pesticides chimiques par les paysans, b) le devenir des emballages de pesticides, c) les doses d'application et les fréquences de traitement des cultures, d) les lieux d'achat.

Les outils de recueil des données qualitatives ont également porté sur l'observation directe sur le terrain et sur des entretiens individuels et collectifs (groupes de parole).

Les enquêteurs ont travaillé en binômes : pendant que l'un fait dérouler le questionnaire quantitatif, l'autre recueille les données qualitatives.

L'objectif de ce questionnaire suivi du focus group organisé a permis de connaître les divers pesticides utilisés par les paysans suivant chaque stratégie de lutte contre les ravageurs.

2.2.2 Sensibilité des anophèles aux insecticides

2.2.2.1- Echantillonnage des larves

Des prospections larvaires ont été organisées dans les diverses zones d'études tant en saison sèche qu'en saison pluvieuse de janvier 2007 à décembre 2009. Les récoltes de larves ont été effectuées selon la méthode du "Dipping" à l'aide de louches en aluminium munies de manches longues, des seaux en plastique, des gobelets, des flacons, des récipients, une toile filtrante.

Les larves récoltées ont été ramenées à l'insectarium du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) pour élevage (figure 8). Cette collection des larves est très difficile en saison sèche notamment dans les zones cotonnières du fait de la rareté des gîtes.

2. 2. 2.2. Elevage des larves.

A l'insectarium, les larves sont triées puis séparées suivant leur stade larvaire et mises dans des bacs contenant l'eau de gîte. Elles sont réparties en moyenne par lot de 100 par bac pour optimiser non seulement leur croissance mais aussi d'éviter le cannibalisme (Koenrardt et *al.*, 2004). L'utilisation de l'eau de gîte a pour but d'éviter l'influence des résidus chimiques tels que l'hypochlorite de sodium (NaOCl) sur la croissance larvaire. Les larves sont nourries avec des croquettes pour chat (5 grammes mélangé 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 minéraux. Chaque bac est recouvert de toile moustiquaire et entreposé dans une salle dont l'humidité relative varie entre 70 à 80% et la température entre 25 à 30°C. La photopériode est assurée par des lampes fluorescentes éclairant de 6:00 heure du matin à 6:00 heure du soir. A l'apparition des nymphes, elles sont prélevées et mises dans une cage cubique de 30cm de côté pour émergence des adultes.

Signalons au passage que l'insectarium du CREC (Figure 9) dispose de 3 compartiments : la salle d'élevage des larves, la salle des moustiques adultes sauvages et la salle des adultes sensibles. Les adultes issus de l'émergence des larves collectées sur le terrain et mis en cage sont nourris à une solution à 20% de saccharose. Les

femelles adultes de 2 à 5 jours sont isolées pour être soumises au test de sensibilité/résistance.

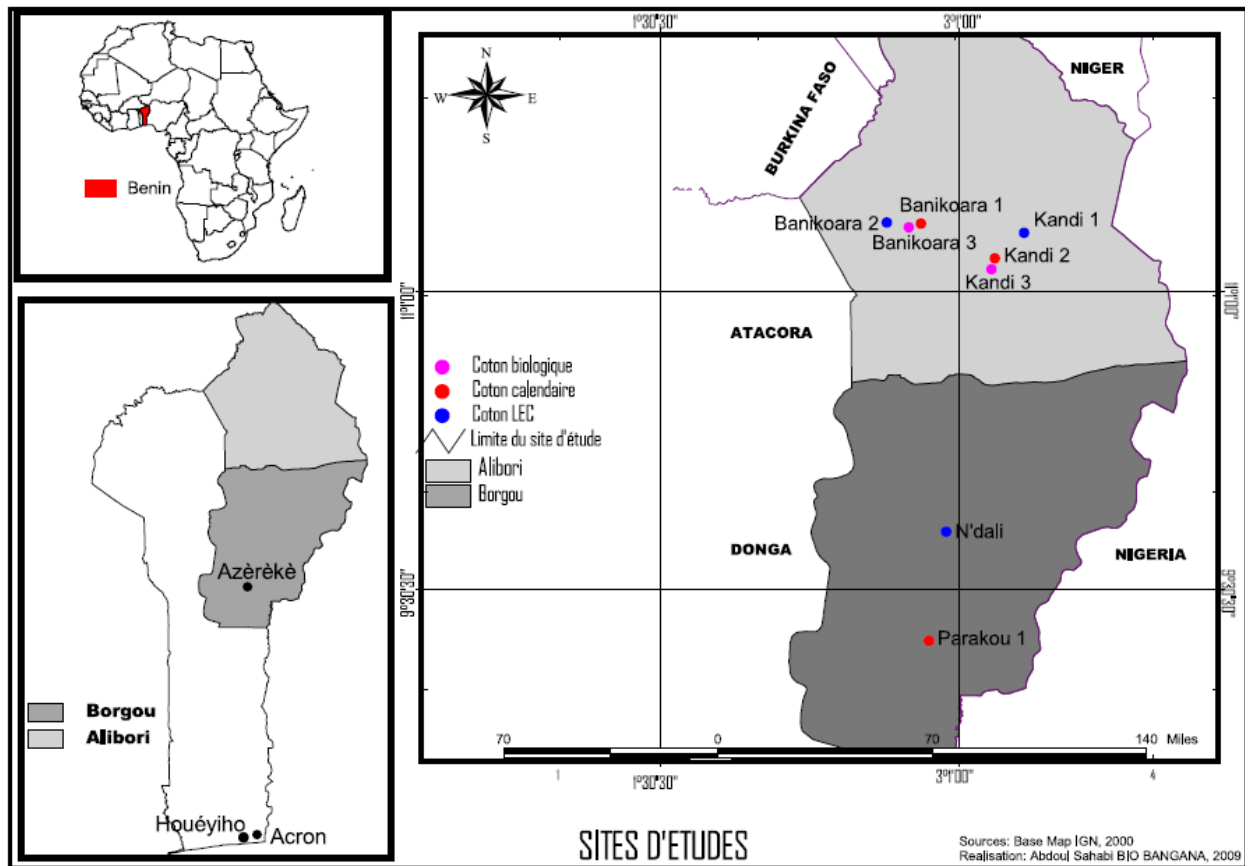


Figure 7: Carte du Bénin indiquant les sites d'étude



Figure 8 : entomologiste médical récoltant des larves d'anophèles dans les gîtes de moustiques. Source (Yadouleton, 2011)



Figure 9 - Vue de l'insectarium du CREC : lieu de rangement des bacs
Source (CREC, 2011)

2.2.3.2 Tests de sensibilité

Les larves d'*An. gambiae* récoltées ont été élevées à l'insectarium du CREC et les femelles âgées de 2 à 5 jours sont choisies pour les tests de sensibilité. Les tests sont réalisés avec des papiers imprégnés de deltaméthrine à la dose diagnostique de 0,05%. Le choix des doses diagnostiques des papiers imprégnés repose sur les recommandations de l'OMS en matière de ces tests (WHO, 1998). La sensibilité des moustiques à ce produit (delthamétrine) est comparée à celle d'un autre pyréthrianoïde : la perméthrine à 0,75% et d'un organochloré, le DDT à 4% (dose diagnostique). Nous avons testé le DDT pour vérifier s'il existe une résistance croisée entre les pyréthrianoïdes et les organochlorés. Les moustiques ont été aussi soumis aux papiers imprégnés de bendiocarb à 0,1% et les tests ont été réalisés selon le protocole OMS en tube cylindrique (WHO, 1998). Le temps d'exposition des moustiques aux papiers imprégnés est de 60 minutes et le temps d'observation avant la lecture des résultats est de 24 heures. Dès l'exposition des moustiques à l'insecticide, le nombre de moustiques "knocked-down" (*kd*), c'est-à-dire qui tombent inanimés au fond des tubes OMS est noté après 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes. Après les tests, les moustiques morts et

vivants sont conservés séparément sur du silicagel dans des tubes eppendorf et stockés à -20°C (congélateur) pour la recherche des mécanismes de résistance.

Dans le cadre de notre étude, nous avons considéré comme population sensible toute population dont la mortalité est supérieure ou égale à 96%. Lorsque la mortalité est inférieure à 90% la population est considérée comme résistante. Entre les deux valeurs, nous considérons qu'il s'agit d'une suspicion de résistance (baisse de sensibilité).

2.2.2.4. Identification des espèces, formes et mécanismes de résistance des anophèles issus des tests de sensibilité.

Identification des espèces et formes des anophèles issues des tests de sensibilité. (Annexe 1)

Les moustiques issus des tests réalisés avec la perméthrine et le DDT ont été soumis aux tests de biologie. Environ 25 à 35 femelles d'anophèles de chaque site d'étude ont été analysées à la PCR selon le protocole de Scott (1993) pour la détermination des différentes espèces de *An. gambiae* s.l, puis selon le protocole de Favia (1997) pour l'identification des différentes formes Mopti (M) et Savane (S) de *An. gambiae* s.s. Les mutations *Kdr* et *Ace-1* ont été déterminées respectivement grâce aux protocoles de Martinez et al. (1998) et de Weill et al. (2004).

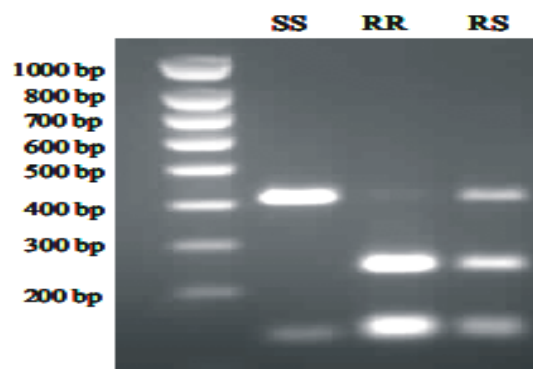


Figure 10- Figure Pcr de Weill et al. (2004) montrant le résultat du test diagnostic PCR-RFLP chez des individus uniques *An. gambiae* s.s.

N.B. Les génotypes SS (sensibles), RR (résistant), RS (hétérozygotes) sont identifiés suivant la taille de la bande. Ainsi, 195 bp = Résistant ; 137 bp = Sensible ; 166 bp = RS

2.3. Résultats

2.3.1. Enquête sur l'utilisation des insecticides et fertilisants au Bénin

La figure 11 montre que 97% des paysans interrogés qui font recours à plusieurs familles d'insecticides chimiques (Tableau I) pour traiter les champs sont ceux qui font la culture des légumes et les cotonculteurs des programmes calendaire, à LEC et quelques rares riziculteurs. Par contre, 6% des paysans qui produisent les céréales déclarent ne pas avoir recours à de telle pratique. Au cours de nos investigations, 67% des paysans déclarent se procurer des pesticides dans des structures illégales de vente de pesticides ("marché noir ") contre 33% dans les structures agréées par l'Etat (figure 12). Les emballages ou boîtes vides des pesticides ne sont souvent pas retournés aux distributeurs. En effet, plus de la moitié des personnes interrogées ont recours à l'incinération (figure 13). Les autres modes d'élimination sont très variées : soit les emballages sont jetés dans les champs (12%), ou enfouis dans le sol (14%), ou jetés dans une fosse septique (12%) (figure 13).

Dans les sites cotonniers à programme à LEC et calendaire, la plupart des paysans utilisent des herbicides juste après les semis. La quasi-totalité de ces paysans (cotonculteurs et jardiniers) déclarent appliquer l'engrais NPK (azote-phosphate-potassium) sur leurs parcelles 20 jours environ après la germination à la dose de 150 à 200 kg/ha, puis l'urée trois semaines plus tard à la dose de 1,5 kg/ ha. Par contre, dans les sites cotonniers à programme biologique, les paysans utilisent de l'engrais organique et du compost à base de déjections d'animaux (bovins et/ou caprins).

Quant à l'utilisation des pesticides chimiques, 100% les paysans interrogés (programme LEC, Calendaire, sites maraîchers) affirment que la production du coton et de légumes nécessite des traitements insecticides pour réduire les dégâts causés par les ravageurs. Dans tous les sites que nous avons parcourus (maraîchage, cotonniers), cette pratique est systématique. Les pyréthrinoïdes sont les produits les plus utilisés (Tableau 1). Au niveau des sites cotonniers à programme calendaire, 6 traitements insecticides (T1, T2, T3, T4, T5, T6) à intervalle de deux semaines à partir de la floraison (45 jours après les semis) sont effectués par les paysans:

- T1 et T2 : Endosulfan ou Thian (spirotetramat + flubendiamide)

- T3 et T4 : cyfluthrine + chlorpyriphos éthyle
- T5 et T6 : cyperméthrine + diméthoate

Le Programme LEC nécessite 4 traitements insecticides à intervalle de deux semaines quand le seuil d'infestation est atteint (5 larves de *H. armigera* sur 50 plants)

- T1 et T2 : Deltaméthrine, Endosulfan ou Tihan
- T3 à T4: Delthaméthrine

Au niveau des sites maraîchers, 70% des jardiniers utilisent des insecticides non recommandés pour le maraîchage. Cependant, dans les sites cotonniers à traitement biologique, aucun insecticide n'est utilisé. Les planteurs utilisent un mélange composé de feuilles de Neem ou de papayer auquel ils ajoutent du piment et du savon local communément appelé 'Koto'.

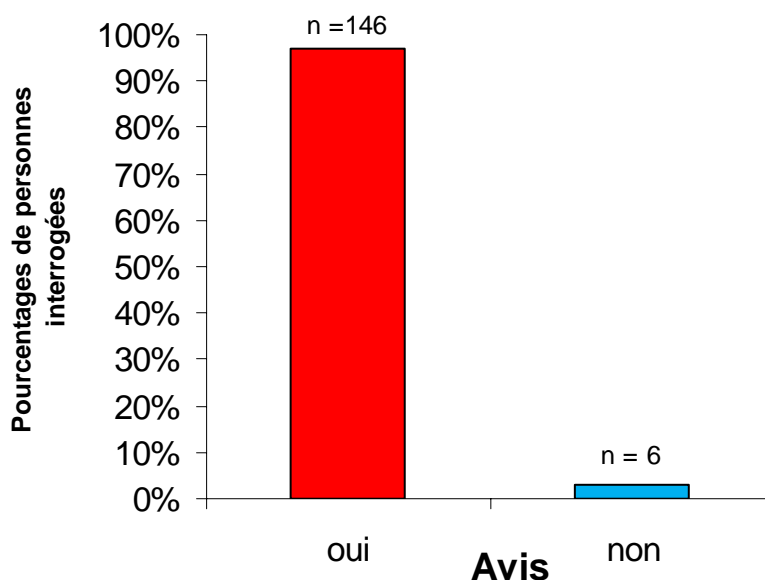


Figure 11. Utilisation des pesticides dans les sites d'études par les paysans.



Figure 12: Sources d'approvisionnement des pesticides au Bénin

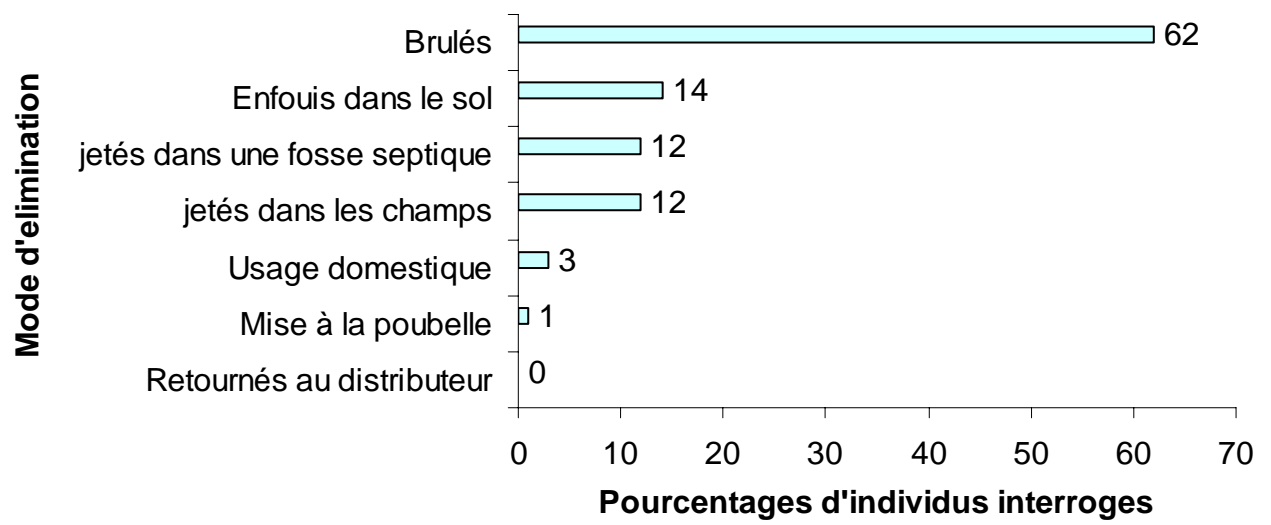


Figure 13 : Modes et voies d'élimination des emballages vides de pesticide

Tableau I : Insecticides régulièrement utilisés sur les sites maraîchers, cotonniers et rizicoles.

Nom commercial	Nom de la matière active	Famille
Cyhalone	Deltaméthrine	Pyréthriñoïde
Decis	Deltaméthrine	Pyréthriñoïde
Kinikini	Mélange Cyfluthrine+Malathion	Pyréthriñoïde + organophosphoré
Cytoate 335ec	Mélange Cyperméthrine 35 G/L +Diméthoate 300 G/L	Pyréthriñoïde + organophosphoré
Cypercal D335	Cyperméthrine	Pyréthriñoïde
Dursban B18/300	Mélange Cyfluthrine 18 G/L – Chlopyriphos Ethyle 300 G/L	Pyréthriñoïde + organophosphoré
Malathion	Malathion 500 G/L	organophosphoré
Nurelle D35/300	Mélange Cyperméthrine 35 G/L +Chlorpyriphos Méthyl 300 G/L	Pyréthriñoïde + organophosphoré
Furadan	Carbofuran	Carbamate
Orthène 50	Acéphate	Carbamate
Callisulfan 350ec	Endosulfan 350g/L	Cyclodiène

Source : MAEP, 2010

2.3.2. Sensibilité d'*Anopheles gambiae* aux insecticides

2.3.2.1. Niveau de résistance des populations d'anophèles aux insecticides

Plus de 8.800 moustiques ont été mis au contact des papiers imprégnés d'insecticide de perméthrine à 0,75%, de deltaméthrine à 0,05%, de DDT à 4%, et de bendiocarb à 0,1%. Il ressort que :

➤ a) avec la perméthrine

- En milieu maraîcher (Houéyiho, Acron et Azèrèkè), 600 femelles d'*An. gambiae* ont été testées (200 par site) aux papiers imprégnés de perméthrine. Le pourcentage de mortalité observé a été respectivement de 32%, 33% et 35% à Houeyiho, Acron et à Azèrèkè. Ces pourcentages indiquent une forte résistance des populations d'*An. gambiae* issues des milieux maraîchers à la perméthrine (figure 14).
- En zone cotonnière (Parakou, N'dali, Kandi, et Banikoara) à traitement calendaire, sur 200 moustiques testés dans chaque localité à la perméthrine, un pourcentage de mortalité de 22% en moyenne dans chacune de ces trois localités a été obtenu. Ces pourcentages indiquent une forte résistance des populations d'*An. gambiae* s.l issues des milieux cotonniers à traitement calendaire (figure 14). Le même constat a été fait dans les champs cotonniers à traitement LEC en ce qui concerne le taux de mortalité observé. En effet, on note une résistance à la perméthrine avec une moyenne de 25% de mortalité sur tous les sites. Par contre, les populations d'*An. gambiae* issues des zones cotonnières à programme biologique ont développé une suspicion de résistance avec une moyenne de 94% de mortalité.
- En zone rizicole, les populations d'*An. gambiae* s.l issues du périmètre rizicole de Malanville ont été résistantes à la perméthrine. En effet sur 200 femelles d'*An. gambiae* s.l soumises à la perméthrine, on observe un taux de mortalité 85% à la perméthrine.
- Les populations d'*An. gambiae* s.l issues des zones céréalières ont été aussi résistantes (79% de mortalité) à la perméthrine

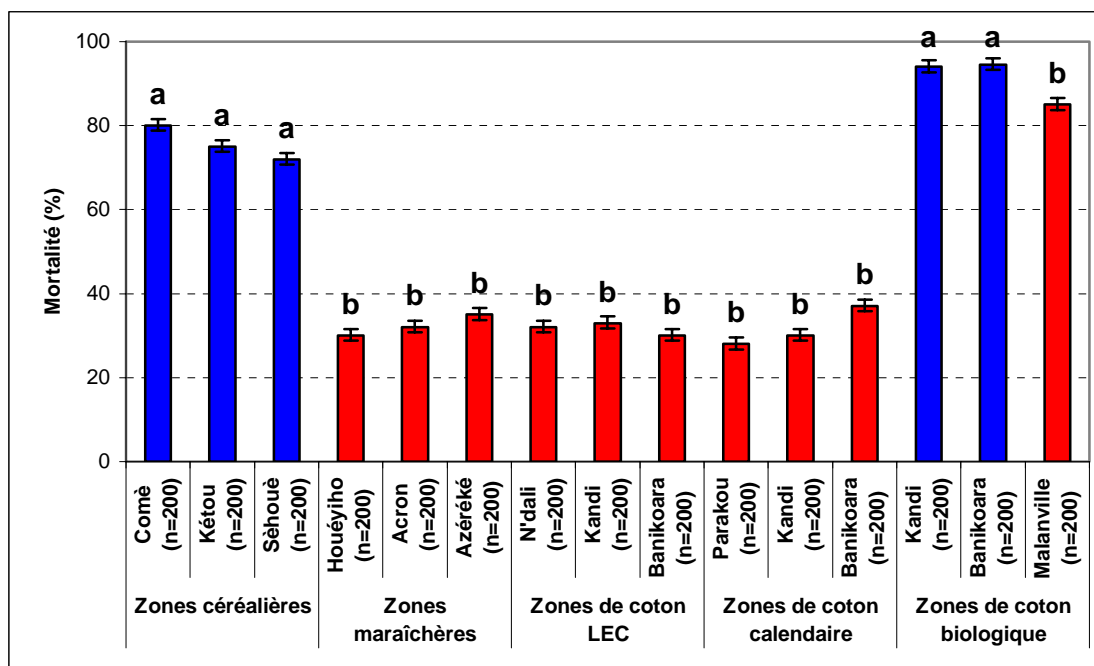


Figure 14 : Mortalité observée après exposition des populations d'*An. gambiae* à la perméthrine à 0,75% selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles. (Les taux de mortalité portant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents $P > 0,05$)

➤ **b) avec le DDT**

- Concernant le DDT à 4%, le niveau de résistance est plus élevé. A peine 20% des spécimens testés (l'ensemble des trois sites maraîchers) sont morts (figure 15).
- Dans les sites cotonniers calendaires, le niveau de résistance est plus élevé. A peine 13% des spécimens testés sont aussi morts (figure 15). Le même constat a été fait dans les champs cotonniers à traitement LEC en ce qui concerne le taux de mortalité observé avec cet insecticide. La résistance au DDT a été observée dans les populations des moustiques issues des sites cotonniers à traitement biologique mais moindre que ceux des programmes LEC et calendaires.
- On note aussi une résistance dans la zone rizicole et céréalière, avec 54% et 48% de mortalité respectivement.

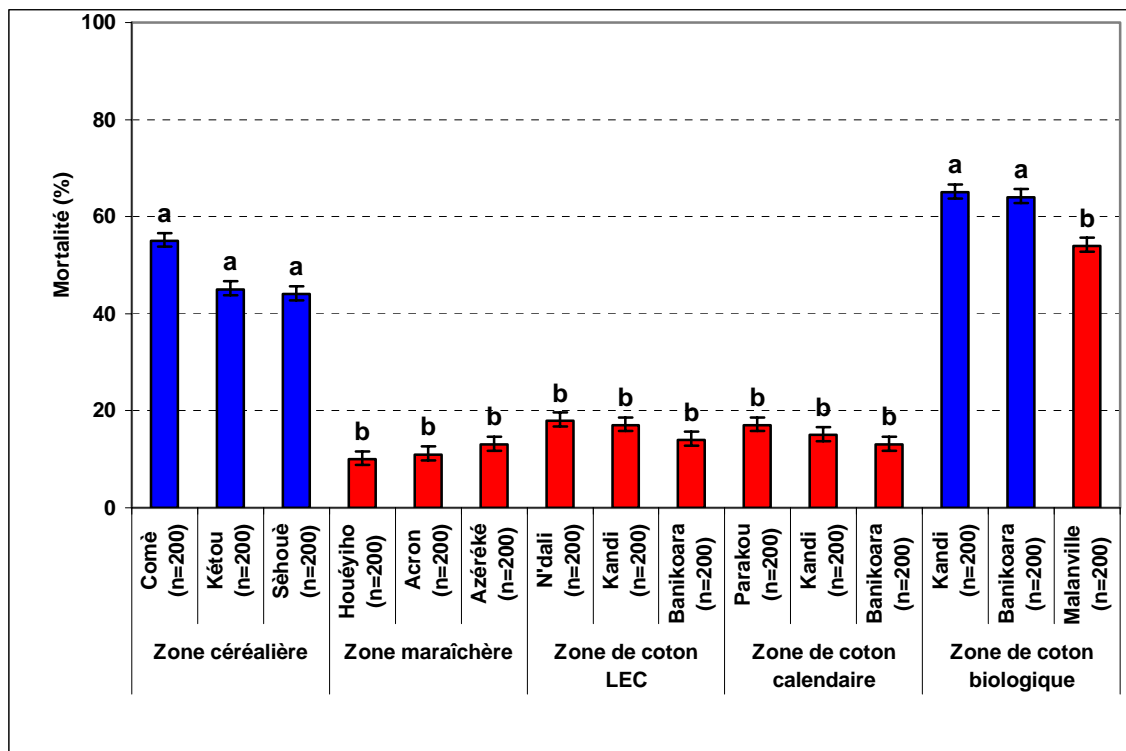


Figure 15 : Mortalité observée après exposition des populations d'*An. gambiae* au DDT 4% selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles.

➤ **c) avec le bendiocarb et la delthaméthrine**

Les populations d'*Anopheles gambiae* s.l issues des divers sites d'étude ont fait preuve d'une grande sensibilité au bendiocarb et à la deltaméthrine (figure 16 & figure 17). Sur 600 femelles d'*An. gambiae* s.l testées par insecticide, à peine 4 moustiques ont survécu.

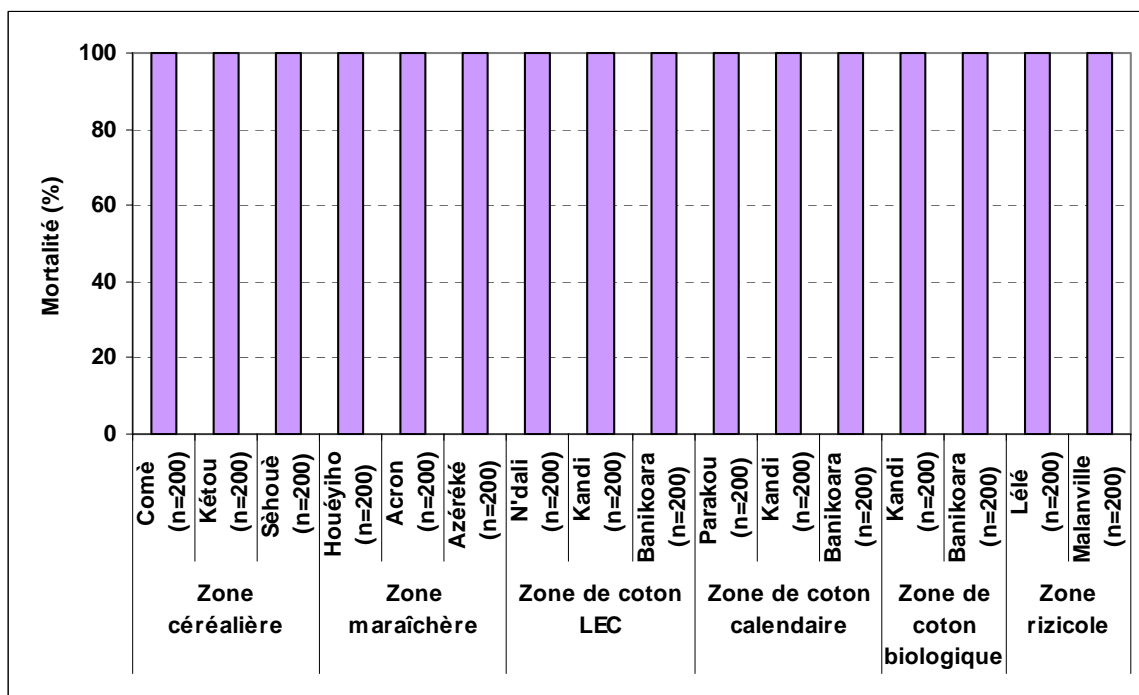


Figure 16 : Mortalité observée après exposition des populations d'*An. gambiae* à la deltaméthrine (0,05%) selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles

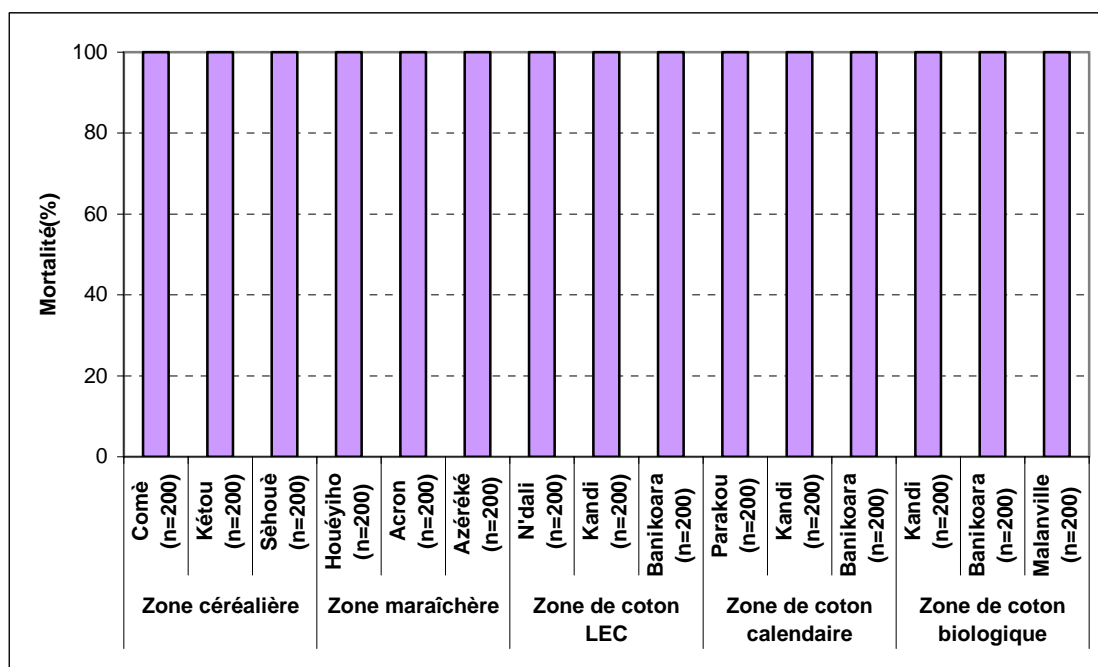


Figure 17 : Mortalité observée après exposition des populations d'*An. gambiae* au bendiocarb (0,1%) selon le milieu et la zone de culture de provenance des anophèles

3.2.2. Mécanisme de résistance : PCR espèces, formes, *Kdr* et *Ace-1*

Dans chaque localité, 200 moustiques ont été analysés pour la recherche des différentes formes d'*An. gambiae* s.l et des mécanismes de résistance *Kdr* et *Ace-1*.

- Dans les sites maraîchers (Acron et Houeyiho), céréaliers (Kétou ; Comè et Sèhouè) et rizicole (Malanville), la quasi-totalité des moustiques analysés à la Polymerase Chain Reaction (PCR) appartiennent à l'espèce *An. gambiae* s.s. et sont tous de forme M. Par contre, les populations d'*An. gambiae* s.l du site maraîcher d'Azèrèkè sont composées de 55% de forme M contre 45% de forme S. La PCR espèce révèle 65% d'*An. gambiae* s.s contre 35% d'*An. arabiensis*.
- Dans les sites cotonniers, *An. gambiae* s.s représentait en moyenne 75% contre 25% d'*An. arabiensis* avec une prédominance de la forme S (en moyenne 90%) quelle que soit la stratégie de protection phytosanitaire (Tableau II)
- ❖ Le gène *Kdr* semble être le principal mécanisme de résistance observée au sein de ces populations d'*An. gambiae* avec une forte fréquence (Tableau 2) dans les moustiques issus des sites cotonniers à traitement Calendaire (0,9 en moyenne), LEC (0,85) et dans les sites maraîchers (0,9). Les faibles fréquences de cette mutation (0,45 en moyenne) ont été observées au sein des populations de moustiques issus des sites de cultures rizicoles, céréalières et de coton biologique ne nécessitant pas l'utilisation d'insecticide.
- ❖ La mutation *Ace-1* a été également mise en évidence mais en de très faibles fréquences variant entre 0,00 à 0,06. Les quelques rares moustiques qui ont développé cette mutation ont été retrouvés dans les sites cotonniers à traitement calendaire, LEC et dans les sites maraîchers.

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

	PCR_Espèces		PCR_Forme		Pcr_ <i>Kdr</i>	Pcr <i>Ace-1</i>	
	Localités	%Aa	%Ag	%M	%S	fréquence	fréquence
Zones de cultures maraîchères	Houeyiho	0	100	100	0	0,81**	0,002
	Acron	0	100	100	0	0,80**	0,001
	Azèrèkè	35	65	55	45	0,88**	0,004
Zones de coton calendaire	Parakou	22	78	3	97	0,92**	0
	Banikoara	3	97	0	100	0,91**	0,05
	Kandi	5	95	0	100	0,92**	0,06
Zones de coton LEC	N'dali	30	70	3	97	0,84**	0,02
	Kandi	4	96	0	100	0,87**	0,02
	Banikoara	2	98	0	100	0,86**	0,03
Zones de coton Biologique	Kandi	5	95	3	97	0,56*	0
	Banikoara	8	92	6	94	0,52*	0
Zones rizicoles	Malanville	0	100	100	0	0,4*	0
Zones céréalières	Comè	0	100	100	0	0,54*	0
	Sèhouè	0	100	100	0	0,56*	0
	Kétou	0	100	100	0	0,55*	0

Aa = *An. arabiensis*; Ag = *An. gambiae* s.s. (**) La fréquence du gène *Kdr* et *Ace-1* des zones de culture cotonnières et maraîchères est largement supérieure à celle (*) des zones de culture sans insecticides (P <0,05).

2.2.4-Discussion et Conclusion.

Anopheles gambiae, principal vecteur du paludisme en Afrique, a développé une forte résistance vis-à-vis des insecticides dans les zones à forte et à faible utilisation d'insecticides agricoles (zones cotonnières, maraîchères, rizicoles et céréalières) au Bénin. Cette résistance est observée essentiellement avec la perméthrine et le DDT. Contrairement à ce à quoi nous nous attendions, cette résistance a été observée non seulement dans les zones urbaines et dans les zones rurales caractérisées par la culture de coton et du maraîchage, mais aussi dans les milieux ruraux où l'on distingue une agriculture traditionnelle de céréales qui ne nécessite ni l'usage d'insecticides agricoles, ni d'engrais. Cette résistance croisée aux Pyréthriinoïdes et au DDT observée dans les zones agricoles cotonnières (exceptées les zones à traitement biologique), zones maraîchères, céréalières et rizicoles est due à la forte utilisation d'insecticides agricoles contre les ravageurs de cultures. En effet, les pratiques paysannes en matière d'utilisation d'insecticides dans les zones maraîchères et surtout cotonnières pour lutter contre *Helicoverpa armigera* (principal ravageur du coton) et *plutella xylostella* (principal ravageur du chou) constituent un facteur de sélection d'insectes résistants non seulement au niveau des ravageurs des cultures mais aussi chez les vecteurs du paludisme (Martin et al., 2010). Après les traitements insecticides, des particules de pesticides entrent en contact avec les gîtes larvaires. Ces particules exercent soit une action létale sur les larves de certaines populations d'insectes soit une pression sélective et qui conduit progressivement à la sélection de la résistance aux insecticides chez certaines populations de moustiques notamment chez *An. gambiae*. Yadouléon et al. (2009), Akogbéto et al. (2005) ont montré que de nombreux produits chimiques sont utilisés contre les ravageurs dans les zones agricoles précédemment citées. Ces auteurs pensent que cette utilisation massive de pesticides dans le monde agricole au Bénin serait due à la libéralisation du secteur d'intrant au Bénin. Dans les années 1960, le rôle sélectif des traitements agricoles à base de composés organochlorés (OC) sur la résistance d'*Anopheles gambiae*, vecteur majeur du paludisme, a été observé au Mali dans des zones qui n'avaient jamais fait l'objet de traitements en santé publique mais où ces insecticides étaient largement utilisés en agriculture. En Côte d'Ivoire et au

Burkina Faso il a été montré à la fin des années 1990 que le niveau de résistance des vecteurs aux insecticides de la famille des pyréthriinoïdes augmentait au cours de la saison cotonnière (Chandre et *al.*, 1999). L'anophèle est un moustique qui pond ses œufs dans des petites flaques d'eau. Les populations sont importantes pendant la saison des pluies. La présence de résidus d'insecticide dans la couche superficielle des sols cotonniers est souvent suffisante pour contaminer les flaques d'eau et entraîner la sélection des moustiques au cours de leur vie larvaire. La culture du coton fait l'objet actuellement d'une stratégie de protection relativement bien contrôlée par les sociétés cotonnières et les associations paysannes en raison de la forte incidence que peuvent avoir les ravageurs sur la production et la gestion de la résistance d'*Helicoverpa armigera* aux insecticides. Pendant plus de 50 ans, les planteurs ont appliqué 4 à 6 traitements insecticides tous les 14 jours du 15 juillet au 30 octobre. Des années 1950 jusqu'au milieu des années 1980, ces traitements étaient essentiellement composés d'OC (endrine, DDT, endosulfan) d'abord seuls puis associés aux organophosphorés (OP). Les OC ont ensuite été remplacés dans ces mélanges par les pyréthriinoïdes, insecticides à large spectre d'activité, efficaces à faible dose et moins toxiques pour l'homme. Les pratiques paysannes en matière d'utilisation de ces insecticides constituent un facteur de sélection d'insectes résistants non seulement au niveau des ravageurs des cultures mais aussi chez les vecteurs du paludisme (Martin et *al.*, 2010). Or il est admis que les pyréthriinoïdes sont les seuls insecticides recommandés par l'OMS dans le cadre de l'imprégnation des moustiquaires et qui se trouvent utilisés aussi en agriculture pour le contrôle des ravageurs des cultures ce qui fait naître des problèmes de résistance chez les ravageurs et vecteurs du paludisme et complique la lutte palustre.

Au Bénin, les pyréthriinoïdes ont été introduits en agriculture depuis 1980. On ne peut donc pas exclure qu'après 30 ans d'utilisation, on n'observe pas de signes de résistance chez certaines populations d'insectes notamment *Helicoverpa armigera*. En effet, la résistance d'*Helicoverpa armigera* aux insecticides s'est accrue depuis les 1990 du fait que 2,5 millions de litres d'insecticides sont appliqués annuellement au Burkina-Faso par exemple dans les champs cotonniers (Diabaté et *al.*, 202a) pour

lutter contre ce ravageur afin de limiter les pertes de production liées au parasitisme. L'augmentation du niveau de résistance des populations d'*An. gambiae* issues des zones sous traitement insecticides par rapport à celles issues des zones sans traitement insecticide serait la preuve que l'utilisation d'insecticide pour contrôler les ravageurs des cultures est un des facteurs qui contribue à la sélection de la résistance des vecteurs du paludisme. Ce résultat rappelle les travaux de Fanello *et al.* (2003) et de Djogbénou *et al.* (2008) qui ont montré que la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT est beaucoup plus élevée dans les zones cotonnières que dans les zones de cultures vivrières.

La suspicion de résistance à la perméthrine au niveau des populations d'*An. gambiae* du programme biologique pourrait être due au fait que les sites actuels de ce programme biologique étaient, il y a dix ans des parcelles de coton à programme calendaire où d'importantes quantités d'insecticides étaient déversées pour lutter contre les ravageurs du coton.

Si la résistance au DDT a été observée dans tous les programmes, certains auteurs (Elissa *et al.*, 1993 ; Diabaté *et al.*, 2002a, Etang *et al.*, 2003) pensent que cette résistance pourrait s'expliquer par les pulvérisations massives au DDT faites dans les années 1950s dans le cadre de l'élimination du ver de Guinée et des vecteurs du paludisme en Afrique sub-sahélienne (Hougard *et al.*, 2003). Le DDT ayant une forte persistance dans le sol et dans la chaîne alimentaire, il serait évident qu'après plus de 50 années d'utilisation, cet insecticide aurait sélectionné la résistance chez les vecteurs du paludisme.

La forte fréquence du gène *Kdr* dans les sites sous traitements insecticides par rapport au témoin rappelle les résultats de Diabaté (2002a). Cet auteur a montré que la fréquence des gènes de résistance *Kdr* chez *An. gambiae* est plus élevée dans les zones cotonnières habituellement soumises à des traitements insecticides que les zones rurales où les paysans ne pratiquent que les cultures vivrières. La mutation *Kdr* serait responsable de la sélection de la résistance d'*An. gambiae* au DDT et aux pyréthriinoïdes en Afrique de l'Ouest. Ces quelques exemples sont la preuve que

l'hypothèse émise par plusieurs auteurs sur la contribution de l'agriculture dans la sélection de la résistance des vecteurs aux insecticides semble être vérifiée.

La résistance *Kdr* n'est seulement pas le seul mécanisme de résistance au sud du Bénin. Les travaux de Corbel et *al.*(2007) ; Djogbénou et *al.* (2008) ; Yadouléon et *al.* (2010a) au sud du Bénin ont montré l'existence de la mutation *Ace-1*. Même si les auteurs cités l'affirment, elle existe en de très faibles fréquences et concorde avec les travaux de Djènontin (2010b) au Bénin sur l'existence en faible fréquence de cette mutation.

L'absence de résistance phénotypique au bendiocarb qui s'est manifestée par des fréquences insignifiantes voire nulles de *Ace-1* est un espoir pour le Bénin qui s'investit dans la recherche des alternatives aux pyréthrinoïdes dans la lutte antivectorielle basée sur les aspersions intra domiciliaires de bendiocarb (Akogbéto et *al.*, 2010). Toutefois, il est souhaitable que périodiquement, l'évolution de la situation soit suivie pour détecter le moindre changement.

Thème 2.2 : Dosage des résidus d'insecticides dans les substrats de terre

Pour cette étude, nous avons procédé à un dosage direct des résidus de pesticides chimiques dans les gîtes larvaires. Les résultats devront être plus tard confirmés avec une analyse par HPLC.

2.2.1-Matériels et méthodes

2.2.1-2- Impact des pesticides sur le développement des larves d'*An. gambiae*

La méthode que nous avons utilisée n'a pas pour prétention de procéder à un dosage direct des résidus de pesticides dans les gîtes. Nous avons procédé à une évaluation indirecte afin de vérifier la présence de facteurs négatifs qui pourraient freiner le développement normal des larves de moustiques dans les gîtes larvaires. Nous avons étudié chez *An. gambiae*, le taux d'éclosion des œufs et le développement larvaire à partir de gîtes réalisés avec des substrats de terre en provenance de zones sous traitements insecticides et de l'eau de robinet selon une méthodologie développée par Akogbeto *et al.* (2005). Les résultats de ce milieu d'élevage ont été comparés à ceux d'un milieu témoin (un mélange eau de robinet + sol du CREC où aucun insecticide n'est utilisé).

Les élevages ont été réalisés avec la souche d'*An. gambiae* Kisumu de référence (La souche sensible de référence « Kisumu » est originaire du Kenya et ne présente aucun mécanisme de résistance aux insecticides) et la souche d'*An. gambiae* VKPER (La souche «VKPER» est une souche originaire du Burkina Faso (Vallée du Kou). Cette souche est fortement résistante aux pyréthriinoïdes (Darriet *et al.*, 1998) et est homozygote pour la mutation *Kdr*.

Toutes ces souches sont maintenues en élevage au CREC.

Les échantillons de substrat de terre ont été prélevés dans les trois périmètres maraîchers précédemment décrits, dans les divers champs cotonniers à programme calendaire, LEC et dans les sites céréaliers de notre site d'étude. Les milieux d'élevage sont simulés à partir des prélèvements de sols issus des sites d'étude. Chaque gîte est constitué de 100 grammes de terre mélangés à 1000 ml d'eau. Environ 200 œufs d'*An.*

gambiae de la souche sensible Kisumu sont comptés à la loupe puis transférés dans chaque gîte. La même opération est effectuée avec les moustiques provenant de la souche résistante (VKPER).

Au total, plus de 4000 œufs d'*An. gambiae* s.l. ont été mis dans les divers gîtes de provenance diverses et sont élevés. Le suivi quotidien de l'élevage a permis de noter la variation du taux d'éclosion des œufs et la fréquence d'apparition des adultes. Les données des milieux supposés contaminés ont été comparées à celles des milieux témoins pour vérifier l'existence éventuelle d'un facteur inhibant le développement des larves.

2.3. Analyse statistique

L'analyse de variance (Anova) au seuil de 5% a été utilisée pour comparer les taux d'éclosion des œufs et les taux d'émergence des larves de stade 1 et ceci suivant la provenance des gîtes. Les résultats issus de ces analyses ont permis de connaître l'impact des traitements insecticides sur le développement larvaire.

2.4- Résultats.

2.4.1. Impact des traitements insecticides agricoles sur l'éclosion des œufs d'*An. gambiae*

Le gîte constitué à partir de l'eau de robinet plus le sol du CREC (témoin) offre des conditions d'éclosion relativement favorable au développement larvaire. Lorsqu'on remplace le sol de la zone témoin par des substrats de terre prélevés dans les zones où les cultures sont associées à l'utilisation des insecticides, le taux d'éclosion chute d'au moins 40% chez la souche Kisumu et 25% chez la souche VKPER.

En effet, le taux d'éclosion (figure 18) moyen des œufs issus des gîtes témoins est de 85% (n=200) pour la souche Kisumu et 82% (n=200) pour *An. gambiae* VKPER.

Lorsque les gîtes ont été préparés avec des prélèvements provenant des sites de coton biologique et des sites céréaliers, ces taux ne sont pas statistiquement différents du témoin ($P > 0,05$). Il est respectivement de 78% et 76% pour la souche Kisumu et VKPER lorsque le substrat de terre provient des sites cotonniers à programme biologique; 77% et 75% pour la souche Kisumu et VKPER lorsque le substrat de terre provient des zones céréalières.

Par contre lorsqu'on ajoute quelques grammes (100grammes) de terres provenant d'une zone à traitement insecticide (coton LEC, calendaire et zones maraîchères), ces taux d'éclosion chutent respectivement à 8% pour la souche Kisumu et 22% pour la souche VKPER lorsque le substrat de terre provient des périmètres maraîchers. Lorsque le substrat provient des champs à traitement calendaire, on observe respectivement 6% et 18% pour la souche Kisumu et pour la souche VKPER. La différence est significative comparée au témoin ($P < 0,05$).

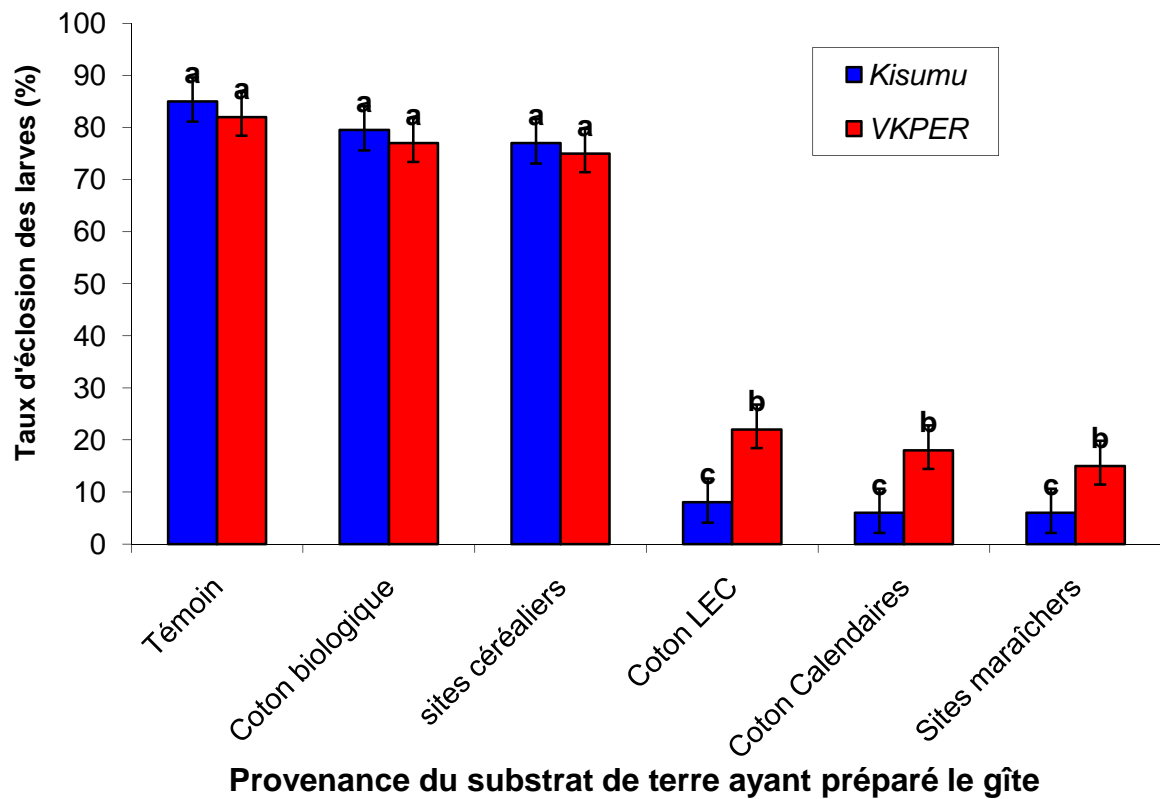


Figure 18 : Taux d'éclosion des larves d'anophèles issus des différentes simulations de gîtes

2.4.2. Impact des traitements insecticides agricoles sur le développement des larves d'*An. gambiae*.

Le développement larvaire a été mesuré en considérant la proportion des œufs qui ont atteint le stade nymphal après leur mise en eau. Ce paramètre est le meilleur indicateur d'évaluation de l'existence éventuelle d'un facteur limitant qui pourrait freiner le développement des larves au niveau des gîtes. En effet, ce paramètre prend en compte le séjour des larves dans les gîtes. Contrairement au temps très limité que met l'œuf dans l'eau pour éclore, la durée de ce séjour est suffisante pour permettre que l'effet du facteur limitant se manifeste en retardant par exemple l'éclosion des œufs.

Dans les gîtes témoins, une moyenne de 78% (Kisumu) et 74% (VKPER) des larves ont atteint le stade adulte (figure 19). Les gîtes contenant des prélèvements issus des milieux traités (insecticides) ont conduit à un développement larvaire inférieur au témoin (baisse d'au moins 25% chez Kisumu et 15% chez VKPER. Il existe une

différence significative entre les taux d'émergence des souches sensibles et résistantes lorsque le gîte est préparé à partir d'un prélèvement de sol issu de milieu sous traitement ($P < 0,05$). En effet, seulement 15% d'émergence ont été obtenus pour la souche Kisumu contre 48% pour la souche résistance VKPER en moyenne.

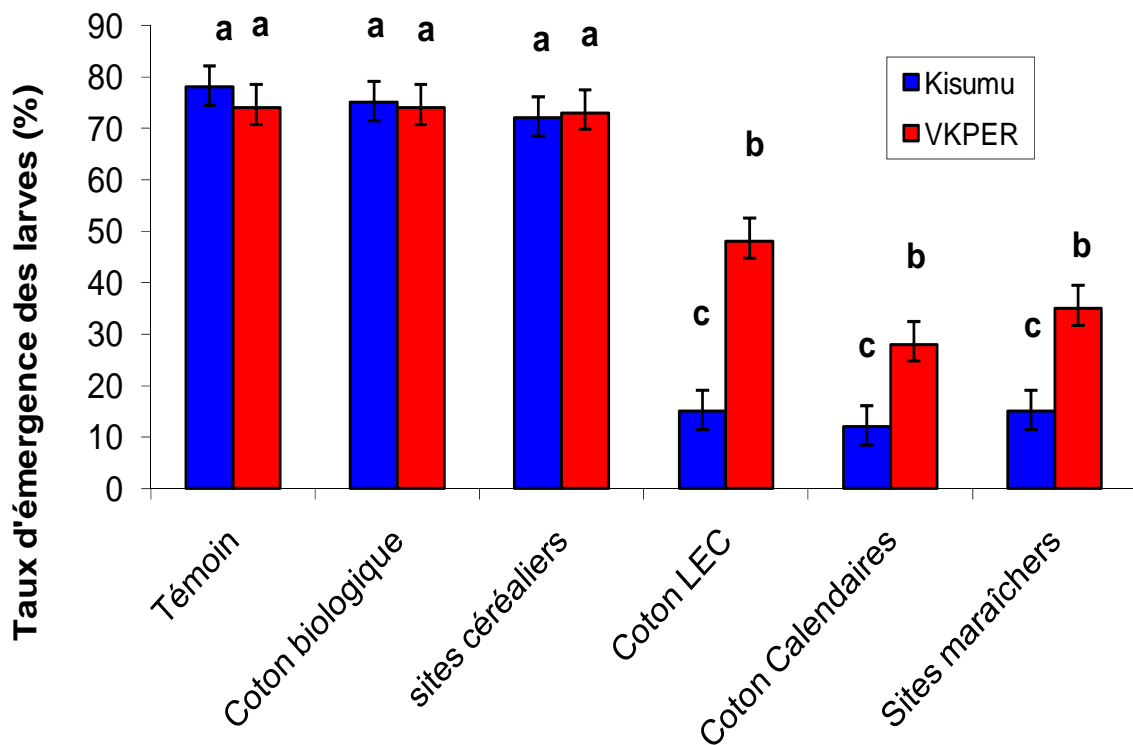


Figure 19 : Effet des insecticides sur l'émergence des larves d'anophèles

2.5 Discussion et conclusion

L'utilisation massive des produits phytosanitaires en agriculture a pendant plusieurs années provoqué la contamination de l'environnement notamment des gîtes des moustiques. A la suite de leur application, des molécules de pesticides sont susceptibles de quitter leur site d'application et se comporter comme des micropolluants organiques à l'origine de la pollution de tous les compartiments environnementaux (Carletto et *al.*, 2010). Du fait de leur écotoxicité, de leur potentiel de bioaccumulation, ces molécules présentent un risque pour l'environnement (Martin et *al.*, 2010).

Le sort réservé aux emballages des pesticides constaté lors de nos investigations n'est pas de nature à sauvegarder l'environnement. Bon nombre sont jetés dans des champs de culture. Les particules de pesticides contenues dans ces emballages pourraient être lessivées et entrées en contact avec les gîtes des moustiques pendant la saison pluvieuse. Les bidons de ces pesticides et autres matériels de pulvérisation sont souvent lavés et rincés dans les canaux d'eau et dans les ruisseaux qui souvent, servent de gîtes pour la ponte des moustiques en particulier, d'*An. gambiae* s.l (Betson et *al.*, 2009). Cette situation explique l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides constatée dans les zones de cultures sous traitement insecticide. Selon Pie et *al.* (2008) ; Chandre et *al.* (1999) et Akogbeto et *al.* (2005), la présence de résidus d'insecticide dans la couche superficielle des sols cotonniers est souvent suffisante pour sélectionner la résistance chez les moustiques. C'est ce qui explique la chute des taux d'éclosion des œufs de Kisumu et de VKPER suite à l'ajout de quelques grammes de sol provenant des sites sous traitement insecticides. En effet, les terres provenant des champs sous traitements insecticides contre les ravageurs de culture contiennent des pesticides chimiques qui se trouvent toxiques pour les larves de moustiques. Les traitements insecticides qui s'effectuent toutes les deux semaines et durent trois mois, globalement de juillet à octobre, période de développement des larves de moustiques, projettent des particules de matières actives dont certaines entrent directement en contact avec les gîtes larvaires, et par conséquent avec les larves de moustiques qui s'y développent (Akogbéto et *al.*, 2005). Les larves d'*An. gambiae* se développent dans les gîtes en bordure des champs de coton sont

directement exposées à ces traitements insecticides répétés. Cette pression d'insecticide est forte car aucune larve n'y échappe et elle s'exerce autant sur les femelles que sur les mâles (contrairement aux insecticides à usage antipaludique qui ne visent que les femelles, voire la fraction endophage ou endophile de ces femelles). La pression exercée sur les larves qui se développent dans les rigoles situées entre les planches de production de légumes, en particulier du chou, et du coton est forte à cause de la présence de *Helicoverpa armigera* et de *plutella xylostella*. Cette situation pourrait expliquer en partie la différence significative sur les souches résistantes de VKPER en passant du témoin aux autres simulations de gîtes provenant des zones sous traitement insecticide. Ce qui prouve que la mortalité est bien due aux insecticides utilisés dans les sites cotonniers, maraîchers et céréaliers.

Dans un contexte de forte résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes comme c'est le cas au Bénin, il urge de connaître l'impact de la résistance sur la transmission du paludisme à travers l'infectivité en antigène *circumsporozoïtique* par les génotypes homozygotes ou hétérozygotes. Une telle étude nécessite d'être conduite dans une zone comme celles des cultures maraîchères qui favorisent la transmission du paludisme et où les vecteurs du paludisme ont développé une forte résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT (Yadouléton et *al* ; 2010 a).

Cette connaissance de l'impact de la résistance sur la transmission dans les zones maraîchères, nécessite au préalable la connaissance de la genèse de ces sites au Bénin, les raisons qui expliquent la prolifération de ces sites maraîchers un peu partout et leur mode de gestion.

Chapitre III- Utilisation des pesticides en zones maraîchères et impacts sur la transmission du paludisme.

En Afrique sub-saharienne, plus de 500 millions de personnes vivant dans les zones tropicales sont soumises aux risques palustres (WHO, 2009). C'est une endémie extraordinairement stable dans la plupart des pays africains au sud du Sahara et dont les conséquences sont ressenties presque quotidiennement sur l'ensemble de la population (Mouchet et *al.*, 2004).

L'intensité de la transmission et la pérennité de cette maladie varient selon le faciès. Plusieurs faciès correspondant schématiquement à trois zones principales du point de vue de la transmission sont décrits : la zone à paludisme stable et à transmission intense et permanente, la zone à paludisme instable et à transmission épisodique, la zone à stabilité intermédiaire avec une transmission à recrudescence saisonnière (Fontenille et *al.*, 1990).

Deux grandes zones biogéographiques ont fait l'objet des travaux les plus importants: la zone de forêt et celle de savane. Au sein de ces zones sont observées des situations intermédiaires en fonction des conditions écologiques. C'est le cas du paludisme en milieu urbain, un milieu en pleine expansion. En effet, en 2001, près de 40% de la population africaine vivait en zone urbaine et cette proportion ira en augmentant dans les prochaines années (IFDC, 2005). Dans cet environnement apparemment homogène, la transmission n'est pas uniforme. Elle varie d'un quartier à un autre. En effet au Bénin, au centre ville, la transmission est brève. Elle a lieu à la fin de la saison pluvieuse, par contre, en périphérie elle s'étend sur une plus longue période en raison de la disponibilité des gîtes (Yadouléton et *al.*, 2010b).

Globalement, la transmission du paludisme est plus faible en ville que dans la zone rurale avoisinante (Hay et *al.*, 2005). La faible intensité du paludisme urbain s'explique par la modernisation des villes avec un bon système de drainage des eaux de ruissellement, ce qui réduit la formation des gîtes d'anophèles (Doannio et *al.*, 2002 ; Robert V et *al.*, 1998).

Mais, si plusieurs auteurs rapportent que l'urbanisation galopante des grandes villes africaines a fait baisser sensiblement le niveau de la transmission du paludisme, elle a également fait naître des activités comme l'agriculture péri-urbaine créant ainsi un milieu écologique favorable au développement des principaux vecteurs du paludisme.

L'attraction que cette nouvelle activité exerce sur l'homme lui confère son importance dans les pays de l'Afrique de l'Ouest. En effet, depuis quelques années, l'agriculture en milieu urbain se développe de façon rapide en Afrique. Cette agriculture est devenue un nouveau métier auquel s'adonnent plusieurs couches de la société : hommes, femmes, enfants, diplômés sans emploi et même les fonctionnaires en fin de semaine et pendant leurs congés. A Cotonou, capitale économique du Bénin, le phénomène est très frappant. On rencontre des périmètres maraîchers partout au cœur même de la ville. Déjà, à partir de l'aéroport, l'espace qui longe la voie qui mène au centre de la ville est occupé de part et d'autre par de nombreux jardiniers qui ont transformé une partie de la plage en site maraîcher. Un autre exemple frappant est le jardin maraîcher de Houéyiho, situé au centre de la ville de Cotonou, dans un quartier de forte densité humaine. Il s'agit d'un grand jardin de 14 hectares exploité par plusieurs maraîchers.

Cependant, beaucoup d'obstacles doivent être surmontés. Sur le plan sanitaire, la formation des planches de cultures crée de très nombreuses rigoles qui retiennent de l'eau de pluie et d'arrosage. Ainsi, pendant les saisons pluvieuses, ces rigoles constituent de véritables gîtes de moustiques, en particulier d'*Anopheles gambiae*, principal vecteur du paludisme en Afrique. En plus de ces gîtes, les jardiniers creusent des trous d'eau qui sont utilisés pour l'arrosage des cultures. Ces trous d'eau sont des endroits favorables au développement des larves d'*An. gambiae*. Par ailleurs, on rencontre sur les sites maraîchers des conteneurs pour le stockage d'eau pour diverses utilisations. Ces conteneurs généralement non couverts sont propices à la ponte des œufs de moustiques. Face à ce qui précède, il se peut que le développement des zones maraîchères aggrave l'intensité de la transmission du paludisme dans les milieux urbains.

La présente étude a été réalisée dans le but de connaître les raisons liées à la prolifération des zones maraîchères dans 3 communes (Cotonou, Porto-Novo et Parakou) en République du Bénin.

Les résultats que nous présentons ici, fournissent des informations sur : (i) les raisons liées au développement de l'agriculture périurbaine et la diversité des acteurs intervenant dans cette agriculture ; (ii) les pratiques paysannes en matière de gestion

des sites maraîchers, (iii) l'impact de cette nouvelle agriculture sur la transmission du paludisme.

Par ailleurs, sans avoir la prétention d'étudier le coût génétique de la résistance des vecteurs du paludisme dans ces zones maraîchères en pleine expansion, nous avons recherché, dans cette étude, la relation entre le portage du gène *Kdr* et l'infectivité des moustiques. Le but est de rechercher l'existence d'un éventuel impact de la résistance sur la transmission du paludisme.

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'importance du développement des zones maraîchères dans les centres urbains et péri-urbains du Bénin et leur impact sur la transmission du paludisme urbain. Ce travail vise :

- Etudier la genèse des sites maraîchers, les raisons de leur développement et les attitudes pratiques des jardiniers en matière d'utilisation des insecticides contre les ravageurs de légumes.
- Evaluer les avantages et inconvénients de cette agriculture sur le bien-être des populations et l'environnement.
- Etudier la dynamique des populations des anophèles dans les secteurs urbains de cultures de légumes.
- Comparer l'intensité de la transmission du paludisme dans les secteurs proches versus loin des zones maraîchères
- Etudier la relation entre l'infectivité d'*An. gambiae* au *Plasmodium falciparum* et le portage du gène *Kdr*.

Thème 3.1 : Genèse et développement des zones maraîchères au Bénin.

Afin de connaître la genèse des sites maraîchers au Bénin et leur mode de gestion, nous avons procédé à partir d'une enquête CAP auprès des paysans des sites maraîchers de Houeyiho, Acron (sud du Bénin) et d'Azèrèkè (au Nord du Bénin) pour mieux cerner les raisons liées au développement de cette activité depuis quelques décennies. Les résultats permettront de savoir si le développement des zones maraîchères a un impact ou non sur la transmission du paludisme.

3.1.1 Zone d'étude

L'étude a été réalisée en République du Bénin, de janvier 2007 à décembre 2008 dans les périmètres maraîchers de "Houeyiho" à Cotonou, capitale économique du Bénin, de "Acron" à Porto-Novo, capitale politique du Bénin et de "Azèrèkè" à Parakou, la plus importante ville de la région septentrionale du Bénin.

3.1.2 Le périmètre maraîcher de Houeyiho à Cotonou

Le périmètre maraîcher de Houéyihô est situé au centre de la ville de Cotonou, dans un quartier de forte densité humaine. Il s'agit d'un grand jardin de 14 hectares créé en 1972 par les missionnaires catholiques et qui aujourd'hui est divisé en 5 coopératives dont chacune est dirigée par un bureau qui a, à sa tête un président. Ce jardin regroupe plus de 300 coopérateurs qui y travaillent tous les jours.

3.1.3 Le périmètre maraîcher d'Acron à Porto-Novo

Situé au sud et dans le premier arrondissement de la ville de Porto-Novo, le périmètre maraîcher d'Acron fut le premier périmètre maraîcher en milieu urbain au Bénin. Installé par les premiers missionnaires catholiques en 1945 sur une superficie de 3 hectares avec 10 jardiniers, ce jardin compte aujourd'hui plus de 150 personnes qui travaillent tous les jours sur une superficie de plus de 20 hectares. La particularité de ce périmètre maraîcher est sa situation dans une zone marécageuse et sa proximité avec la lagune de Porto-Novo, ce qui explique la présence quasi permanente des gîtes de moustiques dans ce site.

Contrairement à ce qui est observé à Houéyiho, les maraîchers d'Acron (plus des 75%) sont pour la plupart des analphabètes ce qui pourrait avoir des conséquences dans le choix des pesticides et le respect des doses et fréquences d'application recommandées.

3.1.4 Le périmètre maraîcher d'Azêrekê à Parakou

Situé à l'entrée de la ville de Parakou, le périmètre d'Azêrekê s'étend sur une superficie de 10 hectares. Il est traversé par un grand ruisseau et un système de canalisation des eaux usées provenant des habitations urbaines.

3.2 Matériel et méthode

3.2.1-Collecte des données sur le développement des zones maraîchères au Bénin

A l'aide d'un GPS (Global Positioning System) et de la carte de la localisation de chaque commune, tous les périmètres maraîchers installés au centre et à la périphérie de Cotonou, Porto-Novo et Parakou ont été localisés et recensés. Pour mieux cerner les raisons liées au développement des zones maraîchères au Bénin, des enquêtes CAP (Connaissance, Attitude, Pratique) ont été organisées dans les trois périmètres maraîchers. La taille de l'échantillon a été déterminée suivant la méthode de Anderson (1993) et l'orientation du choix des jardiniers à interviewer a été faite suivant la technique de bouteille (Snedecor et *al.*, 1974). Un total de 150 ; 80 et 60 maraîchers respectivement à Houeyiho, Acron et à Azêrekê a été soumis à un questionnaire semi-structuré (Snedecor et *al.*, 1974). Le questionnaire avait porté, entre autres, sur l'histoire de chaque périmètre, sa superficie, le nombre de personnes qui exploitent le site, les variétés de légumes cultivés, les tranches d'âges des maraîchers, le genre, les catégories des maraîchers, le niveau d'instruction des maraîchers. Les techniques de collecte des données qualitatives ont porté sur l'observation directe sur le terrain et sur des entretiens individuels et collectifs (groupes de parole). Chaque groupe de parole (au moins 6 par périmètre) avait été interviewé deux fois sur une durée de 45 minutes chacune.

3.2 .2-Analyse des données

L'analyse des données a débuté par le dépouillement des fiches d'enquête et la codification des données. Ensuite, nous avons procédé à la saisie des données et à leur traitement statistique à l'aide des logiciels Excel et SAS version 6.1. Le principal outil statistique utilisé pour tester les hypothèses est le test du Khi-deux (χ^2) de Pearson. C'est un outil statistique qui permet de mesurer l'écart entre les fréquences observées et les fréquences théoriques. Dans notre cas d'étude, cette mesure de l'écart nous a permis d'identifier les facteurs qui ont une influence sur les variables dépendantes.

3.3- Résultats

3.3.1. Genèse et gestion des périmètres maraîchers du Bénin

La production maraîchère pratiquée pendant la période coloniale sur de petites superficies dans les agglomérations des missionnaires français et portugais pour des besoins de subsistance (Houngpodoté et Tossou, 2001) a connu depuis les années 1972 une réforme avec l'arrivée d'une Organisation Non Gouvernementale (ONG) Néerlandaise. Le premier site occupé en 1972 était un domaine inoccupé de l'ASECNA, actuel quartier Houeyiho. Ce site regroupe aujourd'hui plus de 300 coopérateurs qui y travaillent tous les jours.

Avec 35 maraîchers en 1972 à Cotonou, cet effectif est passé à 112 en 1974 avec une Superficie Agricole Utile (SAU) de 1200 m² par personne. La situation s'est accentuée avec la crise économique qui a conduit le Bénin au gel des recrutements à partir de 1987. Avec cette nouvelle donne, cette activité est devenue un nouveau métier auquel s'adonnent plusieurs couches de la société.

La ville de Cotonou qui comptait 5 périmètres maraîchers il y a une décennie, en compte aujourd'hui plus d'une cinquantaine (figure 20) dont quinze sont très importants avec un grand nombre d'exploitants qui emblavent d'importantes surfaces agricoles chaque année (figure 21).

Cette multiplication de périmètres maraîchers à Cotonou est aussi observée dans les villes de Porto-Novo et de Parakou.

Une étude statistique réalisée au Bénin dans les divers périmètres maraîchers montre que l'agriculture périurbaine rapporte plus de 300 millions de FCfa de marge brute par

an pour l'ensemble des producteurs (Houngpodoté et Tossou, 2001). Les informations réelles collectées au cours de notre investigation indiquent que cette agriculture contribue à rentabiliser aussi l'élevage de volaille en consommant près de 50 tonnes à l'hectare des fientes produites par les fermes d'élevage ; soit près d'un million de francs Cfa/ha d'achat aux aviculteurs.

Sur le plan social, l'agriculture urbaine constitue un secteur pourvoyeur d'emplois. En effet, dans les périmètres maraîchers de Cotonou, on dénombre plus de 300 chefs d'exploitation qui y travaillent de façon permanente. Des centaines de bénéficiaires indirects tels que les vendeurs d'intrants, les grossistes et détaillants des légumes frais tirent aussi des revenus substantiels de cette activité.

Aussi, bon nombre de maraîchers déclarent-ils améliorer leur condition de vie et celle de leurs familles à partir des revenus du maraîchage.

La commercialisation des légumes par les femmes constitue une activité lucrative et génératrice de revenus pour ces dernières, ce qui leur permet d'apporter leur part aux charges du ménage voire même subvenir aux charges de leur famille si elles sont chef de ménage (Houngpodoté et Tossou, 2001). Les résultats de nos investigations auprès des maraîchers dans leur ménage montrent que plus de 75% des maraîchers disposent d'un moyen de déplacement (le plus souvent d'une moto), d'une ou des maisons construites, scolarisent leurs enfants et ceci à partir des revenus que leur procure le maraîchage.

Les maraîchers peuvent être regroupés en trois catégories : les maraîchers permanents, les maraîchers à temps partiel et les maraîchers temporaires. Les maraîchers permanents représentent 75%, 85% et 90% de l'effectif total à Houeyiho, Acron et Azèrèkè respectivement et regroupent les jeunes déscolarisés et les chômeurs. Les maraîchers à temps partiel font respectivement 15%, 10% et 8% de l'effectif total à Houeyiho, Acron et Azèrèkè respectivement et regroupent les fonctionnaires, les petits commerçants, les artisans, les apprentis, des élèves ou des salariés du secteur privé. Les maraîchers temporaires se composent des individus sans emploi fixe. Ils font 10% ; 5% et 2% de l'effectif total des maraîchers de Houeyiho, Acron et Azèrèkè. Mais cette classification des maraîchers est seulement indicative, car certains peuvent se trouver dans l'un ou l'autre type selon ses besoins immédiats.

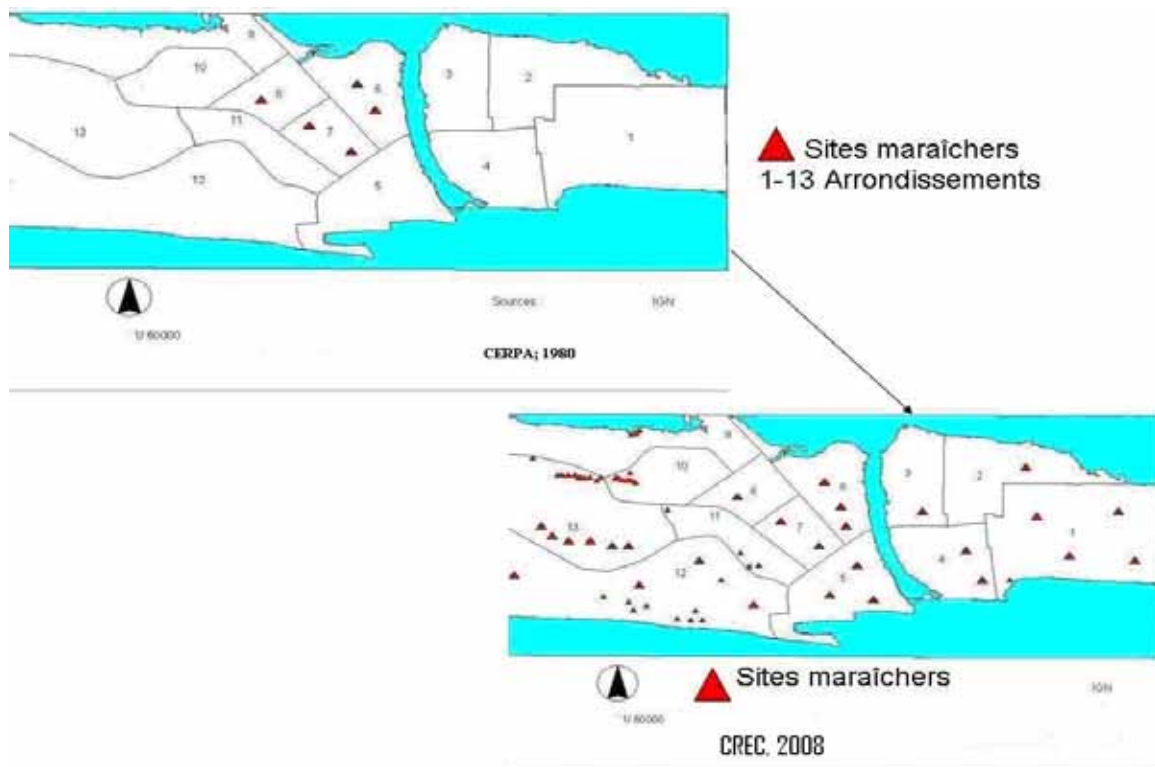


Figure 20: Carte de la ville de Cotonou illustrant la multiplication des sites maraîchers de 1980 à 2008.

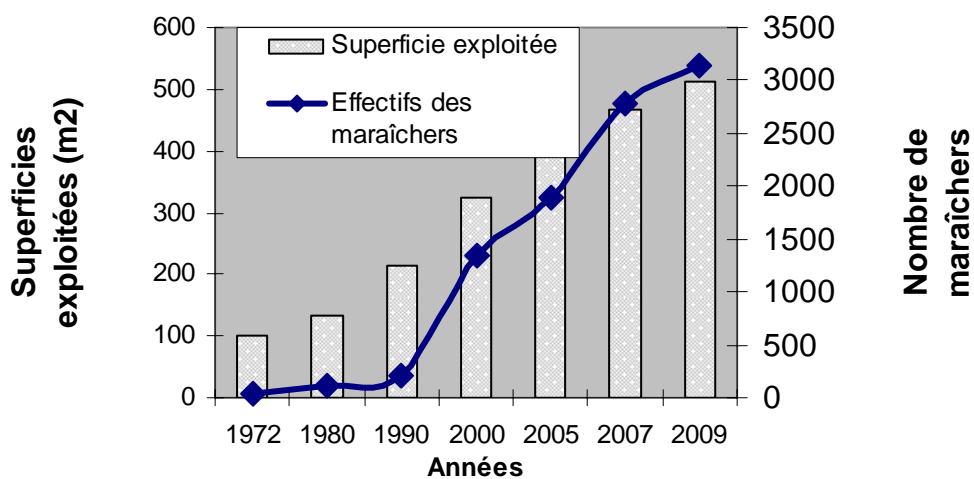


Figure 21: Evolution de l'effectif des maraîchers et de la superficie exploitée dans la commune de Cotonou de 1972 à 2009

3.3.2. Utilisation des pesticides dans les sites maraîchers

Dans les périmètres maraîchers de Houéyiho, d'Acron et d'Azèrèkè, la totalité des maraîchers interrogés ont reconnu qu'il n'est pas possible de produire les légumes sans utiliser des insecticides. Certains légumes comme le chou vert, la laitue, et l'amarante sont sensibles aux attaques des ravageurs. Ainsi, lors des traitements phytosanitaires, beaucoup de maraîchers font l'association de différents pesticides chimiques (insecticides + insecticides, insecticides + fongicides, insecticides + nématicides, etc).

Sur les sites de Houéyiho et d'Acron, les insecticides sont vendus par un magasin géré par les maraîchers et installé sur le site. Toutefois, lors de nos investigations, moins de 20% des maraîchers de Houeyiho contre 40% à Acron déclarent s'approvisionner dans une coopérative maraîchère formelle et agréée par l'Etat. A Azèrèkè, 80% des maraîchers interrogés déclarent s'approvisionner dans l'informel et 20% dans les services spécialisés du Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche (MAEP).

Sur les périmètres de Houeyiho, Acron et de Azèrèkè, moins de 15% des maraîchers respectent les doses des traitements recommandées par les encadreurs contre 60% , 63% et 70% respectivement de Houeyiho, Acron et Azèrèkè (figure 22) qui ne respectent pas du tout ces doses recommandées. En cas d'attaque avancée des cultures par les insectes, cette dose est augmentée à volonté selon certains maraîchers ou remplacées par des insecticides qu'ils qualifient de "très forts" et qui sont souvent les insecticides chimiques du coton. Parmi ces insecticides, on peut citer: Phaser, Conquest plus, Decis, Dursban et qui sont beaucoup plus utilisés par les maraîchers de Parakou, car Parakou constitue une zone réputée pour la culture du coton.

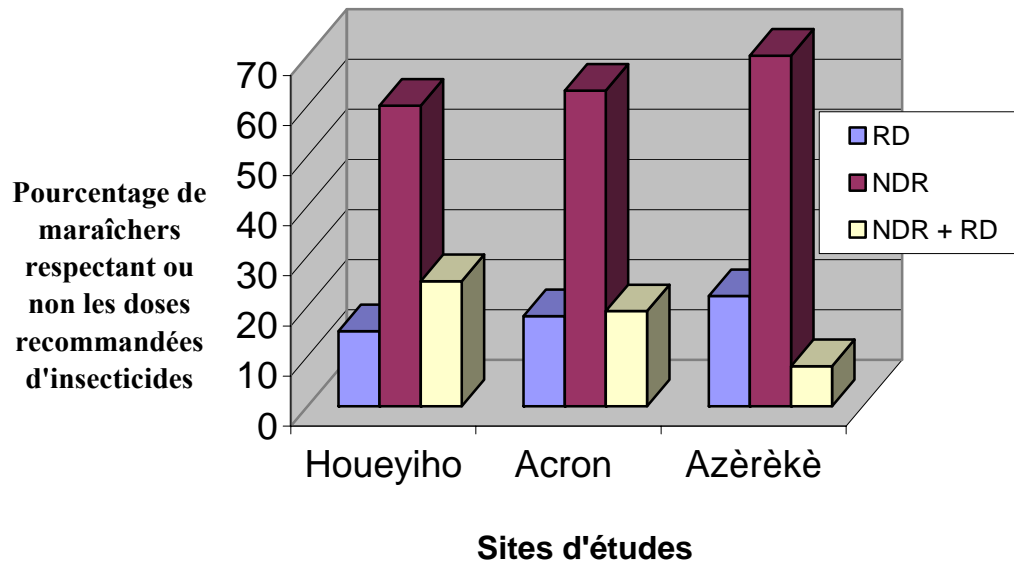


Figure 22: Pourcentage des maraîchers respectant ou non les doses d'insecticides dans les trois zones d'étude

Légende :

- RD = Respect des doses recommandées
- NDR= non respect des doses recommandées
- RD+DNR= Association des deux recommandations

3.4-Discussion et conclusion

Dans le cadre de la pratique du maraîchage, nos résultats à l'instar de plusieurs autres chercheurs confirment que le développement de la filière maraîchère fait apparaître trois types de maraîchers. Toutefois, cette classification n'est qu'une indication d'autant plus que certains maraîchers, compte tenu de leurs problèmes financiers peuvent se retrouver dans telle ou telle catégorie afin de subvenir à leurs besoins.

Cependant, malgré les multiples avantages qu'offrent les sites maraîchers, ils constituent sur le plan sanitaire, des endroits par excellence favorables au développement des gîtes larvaires, en particulier ceux d'*An. gambiae*, principal vecteur du paludisme en Afrique de l'Ouest. En effet, les travaux de Klinkenberg et al. (2008), au Ghana et de Yadouléon et al. (2010b) au Bénin ont montré que les zones maraîchères contribuent à l'augmentation de la faune culcidiennne.

Si les résultats de l'enquête ont montré que l'utilisation des insecticides agricoles est une réalité au Bénin, la plupart de ces insecticides restent non recommandés pour le maraîchage. Ceci pourrait s'expliquer par la libéralisation du secteur de vente des intrants en République du Bénin et par le coût élevé que pratiquent les magasins agréés par l'Etat et qui, malheureusement, se trouvent souvent en rupture de stocks. Cette situation ajoutée au faible niveau intellectuel de la plupart des maraîchers pourrait être une des raisons du non respect du choix des pesticides chimiques et de la mauvaise application des doses recommandées.

Ces traitements qui s'effectuent toutes les semaines envoient des particules d'insecticides dont certaines sont en contact avec le sol et les gîtes, et par conséquent avec les larves de moustiques (Akogbéto et al., 2005). La pression exercée par ces insecticides pourrait conduire au développement de la résistance des moustiques, en particulier d'*An. gambiae* vis-à-vis de ces insecticides (Akogbéto et al., 2006). Cette résistance reste et continue d'être un handicap à la lutte anti- vectorielle depuis quelques années, suite à la baisse de sensibilité observée chez *An. gambiae* aux pyréthriinoïdes. Les pyréthriinoïdes utilisés par les maraîchers sont en partie les mêmes que ceux utilisés en santé publique pour combattre les moustiques adultes. Or, ces produits sont les seuls insecticides utilisés dans l'imprégnation des matériaux

imprégnés et constituent aujourd'hui la principale arme de protection individuelle et collective contre les piqûres de moustiques (Akogbéto, et *al.*, 1999). Parmi ces pyréthrinoïdes, la Deltaméthrine reste sans doute le produit le plus utilisé dans l'imprégnation des moustiquaires mais aussi celui qui est le plus utilisé par les maraîchers. Il en est de même pour la Cyfluthrine qui est aussi utilisée contre les ravageurs de légumes en mélange avec les organophosphorés (Akogbéto et *al.*, 2006). C'est le cas de Kinikini (Cyfluthrine + Malathion) qui reste un produit largement utilisé par les maraîchers du fait de son efficacité contre les grands prédateurs des légumes et qui, parallèlement, reste très largement utilisé en santé publique dans l'imprégnation des moustiquaires sous la formulation de Solfac.

Thème 3.2 : Impact du développement des zones maraîchères sur la transmission du paludisme.

Dans ce sous-chapitre, nous avons évalué l'impact de la résistance d'*An. gambiae* s.l sur la transmission du paludisme dans les zones maraîchères ; zones par excellence caractérisées par des planches de cultures et de nombreuses rigoles qui retiennent de l'eau de pluie et d'arrosage. Ainsi, pendant les saisons pluvieuses, ces rigoles constituent de véritables gîtes de moustiques, en particulier d'*Anopheles gambiae*, principal vecteur du paludisme en Afrique.

3.2.1 Zone d'étude.

L'étude a été réalisée en République du Bénin, de janvier à décembre 2009 dans les périmètres maraîchers de "Houeyiho" à Cotonou, métropole du Bénin, de "Acron" à Porto-Novo, capitale politique du Bénin et de "Azêrekê" à Parakou, la plus importante ville de la région septentrionale du Bénin.

3.3 Matériel et Méthode

3.3-1- Dynamique de la transmission du paludisme : Collecte et traitement des moustiques sur le terrain

La collecte des données a reposé sur un suivi entomologique longitudinal réalisé de janvier à décembre 2009 grâce à des prospections larvaires et des captures de nuit sur sujets humains. Des captures mensuelles de moustiques agressifs ont été réalisées de 20h à 6h du matin, sur des sujets humains volontaires qui, au préalable, ont donné leur consentement favorable pour le déroulement de l'activité.

Dans chaque ville, 2 quartiers ont été choisis : 1 quartier situé en bordure d'un site maraîcher (zone A) et l'autre quartier (zone B) situé loin de toute zone de culture, au moins à 5 km des périmètres maraîchers.

Les captureurs ont été placés à l'extérieur et à l'intérieur de 4 habitations par quartier choisies comme points de captures. La collecte s'est déroulée à un rythme de 2 nuits consécutives par mois. Ces lieux de capture n'ont pas varié tout au long de l'étude. Les moustiques capturés ont été conservés individuellement dans des tubes à hémolyse bouchés avec du coton et gardés par tranche horaire et par point. Ces moustiques ont été identifiés le lendemain matin selon le genre et l'espèce à partir de la clé de Gillies et de Meillon (1968). En plus des captures sur appât humain, des captures au pyrèthre ont été aussi effectuées à l'intérieur des maisons pour compléter les captures sur appât humain et ceci 1 fois par mois dans 10 habitations choisies également dans les zones A et B de chaque ville. Avant les pulvérisations, toutes les ouvertures des maisons ont été fermées avec des draps de manière à réduire au maximum la sortie des moustiques. Ces habitations ont été les mêmes d'un passage à l'autre. Des draps blancs sont étalés dans les cases de façon à récupérer les moustiques qui tombent sous l'effet de la bombe utilisée. Ces moustiques ont été conservés sur du silicagel pour la recherche de l'infection par la méthode de titrage immunoenzymatique (Elisa CSP). Les formes et espèces du complexe *An. gambiae* assurant la transmission du paludisme ont été identifiées par la technique de PCR.

3.3-2- Recherche d'infection : le titrage immunoenzymatique

Le thorax des moustiques capturés sur appât humain a été utilisé pour rechercher la positivité en protéine *circum sporozoïte (C.S.)* de *P. falciparum*. La mise en évidence de l'antigène C.S. a été réalisée par la méthode d'ELISA, technique de Burkot *et al.* (1987) et modifiée par Wirtz *et al.* (1987) afin de calculer l'indice sporozoïtique avec des anticorps monoclonaux. Nous avons utilisé le monoclonal 2A10 conjugué à la peroxidase et un substrat chromogène ABTS pour détecter les puits positifs (annexe 2).

3.3-3 Identification des moustiques : PCR formes et espèces

Les *An. gambiae* s.l issues des captures sur appât humain et identifiés à partir de la clé de détermination ont été passés à la biologie moléculaire (PCR) selon le protocole de Scott *et al.* (1993). Cette recherche permet de connaître les formes et espèces qui assurent la transmission du paludisme dans les trois sites d'étude.

3.3.4. Rapport entre infectivité et mutation *kdr* chez *An. gambiae*.

Les anophèles collectés à partir des captures sur homme dans les différentes zones ont été analysées par la méthode d'ELISA. Les ailles et pattes des *An. gambiae* s.s dont les têtes hébergent la protéine *circum sporozoïte (C.S)* de *P. falciparum* et qui se sont révélées positives suite au test d'Elisa ont été conservées individuellement dans des tubes eppendorfs sur du silicagel et portant le même numéro que le tube contenant la tête. Ces ailles et pattes ont été utilisées pour la PCR *Kdr*. Après les tests moléculaires, les moustiques sont séparés en fonction du génotype *Kdr* ce qui permet de faire la relation entre l'infectivité et le portage du gène *Kdr*.

3.4. Analyse des données

La densité agressive (nombre de piqûre/ homme /nuit) (ma), l'indice sporozoïtique (Is) et le taux d'inoculation entomologique (TIE) ont été calculés en utilisant les méthodes standard décrites par Omumbo et *al.* (2005). Le taux d'inoculation entomologique (TIE) exprimé en nombre de piqûres infestées/homme/nuit a été calculé en faisant le produit du taux d'infestation par la densité agressive (TIE = ma x IS).

Le test de Fisher a été utilisé pour comparer les "ma", les "IS" et les "TIE" des anophèles issues des zones A et B.

La fréquence d'apparition des homozygotes et hétérozygotes a été faite avec le test chi square afin de connaître la probabilité de portage du gène par les génotypes homozygotes et hétérozygotes.

3.5. Résultats.

3.5. 1-Dynamique des populations d'anophèles : Variations mensuelles de la densité agressive (ma)

De janvier à décembre 2009, 71.678 moustiques adultes ont été capturés sur appât humain contre 29.295 par aspersion intradomiciliaire. Les moustiques capturés sur appât humain étaient constitués majoritairement du genre *Culex* (74%). Les 26% restants étaient constitués majoritairement de 97% de *An. gambiae* s.l et 3% de *An. pharoensis*, *An. ziemanni*, *An. funestus* (Tableau III).

Les résultats de capture sur homme montrent que les fortes densités anophéliennes (figure 23) ont été observées au cours de la grande saison pluvieuse (avril- juillet) et de la petite saison de pluie (octobre-novembre) au sud du Bénin. Au nord, elles ont été observées entre juin et octobre (figure 23). Si la densité de *An. gambiae* varie en fonction de la pluviométrie, elle dépend aussi de la proximité ou non des sites maraîchers. En effet, les populations situées près des sites maraîchers (zone A) sont exposées à des densités plus fortes ; 10,95p/h/n à Houeyiho; 7,84 à Acron et 3,04 à Azèrèkè pendant la saison sèche. Ces taux sont nettement inférieurs dans les quartiers loin des installations maraîchères (zone B) ; respectivement 2,70 p/h/n; 2,85 p/h/n; 1,41 p/h/n ($P < 0,05$).

Cependant, durant la saison pluvieuse, il n'existe aucune différence significative entre les taux d'agressivité des anophèles obtenus dans les zone A et B ($p > 0,05$) (Tableau 5).

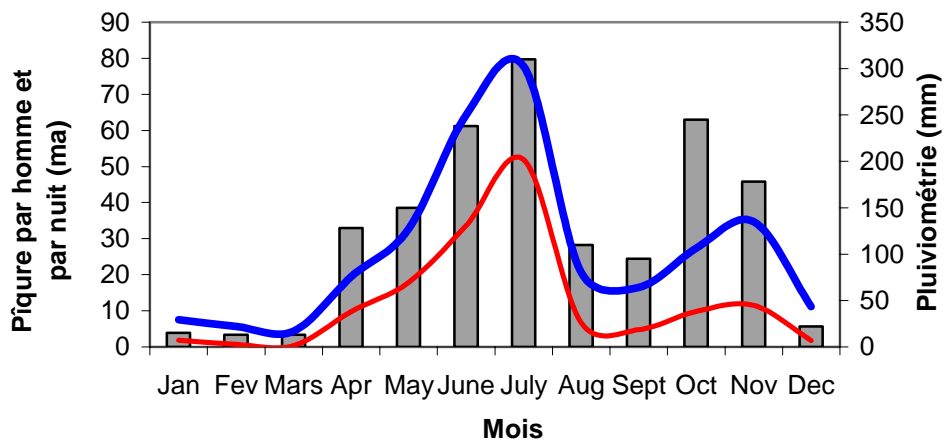
Tableau III: Composition de la faune culcidiennne récoltée à partir des captures sur appât humain et par aspersion intra-domiciliaire dans les 03 sites d'étude de janvier à décembre 2009.

Espèces	Houeyiho				Acron				Azéréké			
	Capture sur appât humain		Capture par spray		Capture sur appât humain		Capture par spray		Capture sur appât humain		Capture par spray	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
Total moustiques capturés	12.698	15.871	4.560	7.190	12.907	18.249	5.492	8.252	8.010	10.221	3.733	6.037
Nbre de séances de captures	24	24	12	12	24	24	12	12	24	24	12	
Nbre de captureurs	192	192	-	-	192	192	-	-	192	192	-	-
Total de <i>Culex</i> Spp	7.435	13.265	3.213	6.467	8.234	15.645	4.245	7.343	5.672	8.343	3.123	5.613
Total des Anopheles Spp	5.196	2.520	1.302	637	4.481	2.351	1.036	554	2.239	1.716	510	311
<i>An. gambiae s.l</i>	5084	2412	1200	556	4326	2136	850	453	2192	1578	453	232
<i>An. pharoensis</i>	32	28	38	25	38	65	110	67	12	65	29	34
<i>An. ziemanni</i>	78	80	64	56	112	150	76	34	45	73	28	43
<i>An. funestus</i>	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Total des <i>Aedes</i> spp	55	75	25	54	138	145	161	121	94	89	78	88
Total des <i>Masonia</i> spp	12	11	20	32	54	108	150	234	15	73	22	25

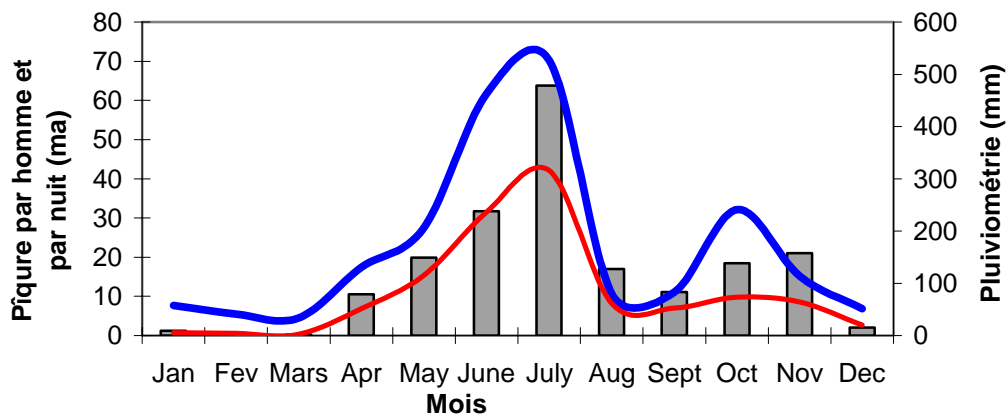
Zone A : habitations proches des sites maraichers

Zone B : habitations éloignées des sites maraichers

A



B



C

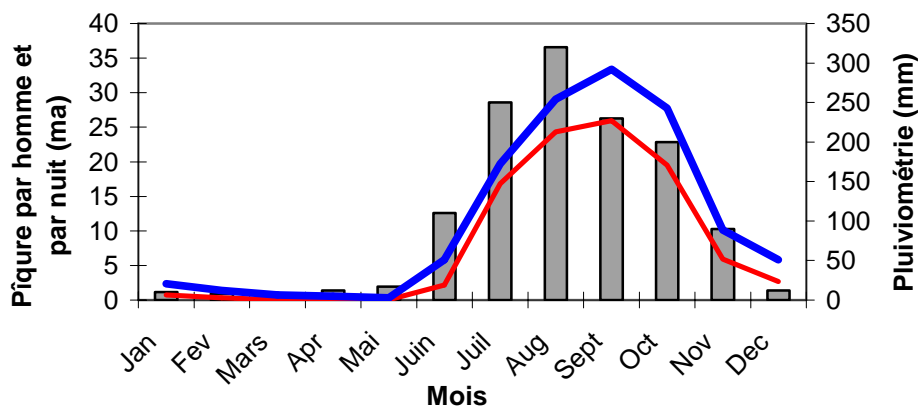



Figure 23 : Variation de la densité agressive d'*An. gambiae* s.l (ma) en fonction de la pluviométrie à Houeyiho (A), Acron (B) et à Azèrèkè (C).

— : habitations proches des sites maraichers ; — : habitations éloignées des sites maraichers ; Pluviométrie (mm) 

3.6.2-Identification des espèces et formes et chez *An. gambiae*.

L'analyse moléculaire des *An. gambiae* s.l. collectés par aspersion intradomiciliaire a montré l'existence de deux formes moléculaires M et S et deux espèces du complexe *An. gambiae* s.l: *An. gambiae* s.s et *An. arabiensis*. Au sud du Bénin (Houeyiho, Acron), sur 360 *An. gambiae* s.l analysés par localité, la quasi-totalité était de forme M. Par contre, à Azèrèkè, l'analyse moléculaire a révélé la présence de deux formes : la forme M minoritaire à 35% et la forme S majoritaire à 65% (Tableau IV). Une seule espèce d'*An. gambiae* s.l au sud du Bénin a été rencontrée: *An. gambiae* s.s contre deux espèces au nord: *An. gambiae* s.s majoritaire (85%) et *An. arabiensis* minoritaire (15%).

Tableau IV: Caractérisation moléculaire des espèces et formes d'*An. gambiae* s.l assurant la transmission du paludisme dans les trois zones d'étude

	Total tested	PCR forme		PCR Espèces		
		% S	% M	% <i>An. gambiae</i> .	% <i>An. melas</i>	% <i>An. arabiensis</i>
Houeyiho	360	-	100	100	-	-
Acron	360	-	100	100	-	-
Azèrèkè	360	65	35	85	-	15

3.6.3-Variations mensuelles de l'indice sporozoïtique (IS)

A Houeyiho, 7.496 *An. gambiae* ont été examinés dont 85 thorax positifs en protéine C.S de *P. falciparum* par ELISA CSP, soit, un indice sporozoïtique moyen de 0,011.

A Acron et Azèrèkè, l'indice sporozoïtique moyen (respectivement 0,013 et 0,014) est identique à celui de Houeyiho ($P>0,05$).

En comparant les valeurs des indices sporozoïtiques des zones A à ceux des zones B, on constate qu'il n'existe aucune différence significative entre ces indices quelle que soit la saison (Tableau V).

Tableau V: variation saisonnière de l'indice sporozoïtique des moustiques collectés en zone A et B

Houeyiho						
	Saison sèche		Saison pluvieuse		Annuel	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
Nombre de thorax analysés	982	260	4102	2152	5084	2412
Thorax CS+	26	4	33	17	51	34
IS	0,026	0,015	0,008	0,008	0,01	0,014
P	0,68		0,85		0,71	

Acron						
	Saison sèche		Saison pluvieuse		Annuel	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
Nombre de thorax analysés	741	311	3585	1825	4326	2136
Thorax CS+	25	9	36	24	57	30
IS	0,03	0,029	0,01	0,013	0,013	0,014
P	0,53		0,14		0,24	

Azèrèkè						
	Saison sèche		Saison pluvieuse		Annuel	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
Nombre de thorax analysés	341	158	1851	1420	2192	1578
Thorax CS+	17	4	30	16	33	21
IS	0,05	0,022	0,016	0,011	0,015	0,013
P	0,72		0,43		0,14	

Zone A : habitation proches des sites maraîchers

Zone B : habitations éloignées des sites maraîchers

3.6.4-Variations mensuelles du taux d'inoculation entomologique

Le taux d'inoculation entomologique (TIE) a été estimé selon la formule de Fontenille et *al.* (1990) en multipliant l'indice sporozoïtique moyen (Is) par le nombre de piqûre par homme et par nuit (p/h/n).

Au sud du Bénin, la transmission du paludisme est bimodale. Elle comprend une période qui va d'avril à juillet avec un maximum en juin (0,75 piqûres infectante/homme/nuit pour *An. gambiae* s.l. à Houeyiho et 0,68 en juillet à Acron). La seconde période se situe entre octobre et novembre avec un pic de 0,5 pi/h/n en octobre.

Au nord, la transmission est unimodale. Elle va de juin à octobre avec un maximum en septembre (0,56 pi/h/n pour *An. gambiae* s.l.).

Globalement, les populations d'*An. gambiae* s.l issues des habitations des zones A reçoivent un taux d'inoculation entomologique supérieur à celles capturées dans les zones B (Tableau VI) ($P < 0,05$).

En tenant compte de la variation saisonnière, les populations situées dans les zones A de Houeyiho, Acron et Azèrèkè reçoivent plus de piqûres infectantes respectivement, 0,43 pi/h/n ; 0,23 pi/h/n et 0,13 pi/h/n pendant la saison sèche. Ces taux sont nettement inférieurs dans les zones B, respectivement ; 0,06, 0,09 et 0,043 ($P < 0,05$).

Par contre; pendant la saison pluvieuse, il n'existe aucune différence significative entre le TIE des *An. gambiae* sl. issu des zones A et des zones B de chaque quartier ($P < 0,05$) (Tableau VI).

Tableau VI : Variation saisonnière du Taux d'Inoculation Entomologique des *An. gambiae* collectés en zone A et B

Houeyiho						
	Saison sèche		Saison pluvieuse		Annuel	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
ma	10,95	2,70	42,73	22,42	9798	4563
IS	0,026	0,015	0,008	0,008	0,01	0,014
TIE	0,28	0,041	0,33	0,19	169,2	64,64
P	0,000		0,093		0,038	

Acron						
	Saison sèche		Saison pluvieuse		Annuel	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
ma	7,84	2,85	37,34	19,01	8224	4601
IS	0,03	0,029	0,01	0,013	0,013	0,014
TIE	0,23	0,01	0,38	0,25	112,2	65,4
P	0,53		0,14		0,024	

Azèrèkè						
	Saison sèche		Saison pluvieuse		Annuel	
	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B	Zone A	Zone B
ma	3,04	1,41	23,14	17,75	6167	3000
IS	0,05	0,022	0,016	0,011	0,015	0,013
TIE	0,15	0,031	0,36	0,19	95,52	39,92
P	0,03		0,43		0,02	

Zone A : habitations proches des sites maraîchers

Zone B : habitations éloignées des sites maraîchers

3.6.5- Relation entre l'infectivité en protéine CS de *P. falciparum* et le génotype du gène *Kdr*

Les résultats du tableau VII montrent que les génotypes RR, SS et RS des moustiques issus des zones maraîchères ont le même taux d'infection. Ces taux d'infection sont en moyenne de 53,5% chez les homozygotes (RR et SS) et 53% chez les hétérozygotes (RS) dans les diverses zones d'étude.

Ces résultats indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre les génotypes homozygotes et hétérozygotes à porter l'antigène *P. falciparum*. ($P > 0,05$). Les trois génotypes ont la même probabilité de porter l'antigène CS de *P. falciparum*.

Tableau VII: distribution des *An. gambiae* positifs en antigènes CSP *falciparum* en fonction du génotype *Kdr* dans les trois zones

	Localités								
	Houeyiho			Acron			Azèrèkè		
	RR	RS	SS	RR	RS	SS	RR	RS	SS
Nombre de thorax analysés	100			100			100		
Génotypes	RR	RS	SS	RR	RS	SS	RR	RS	SS
% des génotypes portant l'antigène	32 ^a	33 ^a	35 ^a	34 ^a	33 ^a	33 ^a	35 ^a	31 ^a	34 ^a
Probabilité	0,18			0,15			0,18		

Les taux d'infection portant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$)

3.7-Discussion et conclusion.

L'étude des moustiques vecteurs et de la dynamique de la transmission est un préalable indispensable non seulement pour comprendre l'épidémiologie du paludisme mais aussi pour mettre en place un contrôle efficace et ciblé de ces vecteurs (Omumbo et *al.*, 2005). L'étude que nous avons menée dans les divers sites maraîchers a pour but d'évaluer l'impact des installations maraîchères sur la transmission du paludisme en milieu urbain.

Le suivi entomologique réalisé pendant une année dans les habitations proches (zones A) et éloignées des sites maraîchers (zones B) a permis d'identifier plusieurs espèces anophéliennes. Mais quelle que soit la zone d'étude, *An. gambiae* demeure l'espèce majoritaire qui assure la totalité de la transmission du paludisme. Selon Christophe et *al.* (2011) ; Akogbéto et *al.* (1995), la mauvaise urbanisation de certaines villes côtières, de l'Afrique de l'Ouest particulièrement à Cotonou, sans ou avec une insuffisance des canaux d'évacuation des eaux favorise la formation de gîtes larvaires d'*An. gambiae* s.l, ce qui accentue la transmission du paludisme. Cependant, selon plusieurs auteurs, le paludisme urbain est caractérisé par une faible intensité de transmission (Keiser et *al.*, 2005 ; Hay et *al.*, 2005). Ce schéma de transmission du paludisme urbain décrit par plusieurs auteurs est identique à quelques exceptions près à celui observé dans bon nombre de pays d'Afrique centrale, de l'Ouest et équatoriale (Solomon et *al.*, 2011 ; Robert et *al.*, 1998a).

Mais si les quartiers urbains dépourvus de système d'évacuation des eaux usées constituent des zones de prédilection pour le développement des larves de moustiques, les activités humaines comme le maraîchage favorisent également la création des gîtes potentiels de moustiques tout au long de l'année.

Les résultats de nos travaux de recherche montrent que la densité anophélienne est plus importante dans les zones proches des sites maraîchers par rapport à celles situées loin des périmètres maraîchers quelle que soit la saison. La présence de larves d'anophèles observée durant toute l'année dans les sites maraîchers confirme les travaux de Manga et *al.* (1997) au Cameroun et de Klinkenberg et *al.* (2008) au Ghana et de Yadouléton et *al.* (2010b) qui ont montré que les zones maraîchères constituent des zones par excellence pour le développement des larves de moustiques ce qui est

conforme à la forte agressivité anophélienne observée dans les zones A par rapport aux zones B. Cette augmentation du nombre de piqûres dans les habitations proches des sites maraîchers par rapport au témoin (éloignées des sites maraîchers) s'explique par l'existence de poches d'eau sur les sites maraîchers et qui sont continuellement entretenues par les jardiniers. Ces poches d'eau constituent des gîtes potentiels quasi permanents pour le développement des larves d'*An. gambiae* s.l.

Pendant les saisons sèches, les gîtes d'anophèles sont rares dans les zones situées loin des sites maraîchers. Ce n'est pas le cas au niveau des zones proches des sites maraîchers où les jardiniers entretiennent en permanence des trous d'eau. C'est cette situation qui explique la transmission permanente du paludisme urbain dans les quartiers situés le long des périmètres maraîchers. Ainsi, ces quartiers sont des "réservoirs de virus" pour les autres quartiers pendant les saisons sèches.

Le suivi entomologique montre une augmentation du taux d'inoculation entomologique (TIE) dans les habitations proches des sites maraîchers par rapport au témoin (Tableau 8). Cet accroissement du TIE dans une région de paludisme stable n'est pas synonyme d'une aggravation du paludisme-maladie du fait d'une saturation des piqûres infectées et de l'immunité protectrice établie auprès des personnes vivant proche des installations maraîchères. Des travaux similaires conduits par Dossou-Yovo et al. (1998), et Matthys et al. (2006) en Côte d'Ivoire dans les zones rizicoles et maraîchères ont montré que ces zones augmentent la densité de la faune culicidienne sans modifier l'incidence annuelle des accès palustres. Ces auteurs concluent que l'augmentation du nombre de moustiques associée à l'irrigation n'entraîne pas nécessairement l'accroissement de la transmission du paludisme.

Le TIE annuel à Houeyiho (169,18 pi/h/an) et à Acron (122,16 pi/h/an) est comparable aux résultats de Antagana et al. (2010) dans une zone de fortes productivités de cultures maraîchères au Cameroun. Mais dans le passé, les travaux de Fontenille et al. (1988) toujours dans le même pays indiquent un TIE annuel plus élevé (245,78 pi/h/an) dans la même zone. La diminution du TIE 12 ans après pourrait s'expliquer par l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILD), (Kelly-Hope et al., 2008) qui ont refait surface depuis quelques temps. En effet, la lutte anti-vectorielle par une utilisation généralisée des

MILD a montré que cette stratégie pouvait réduire la morbidité palustre de 50 à 60% et la mortalité générale de 20% en Afrique (Alonso *et al.*, 1991, Alonso *et al.*, 1993, D'Alessandro *et al.*, 1995, Binka *et al.*, 1996). Dans l'île de Bioko en Guinée Equatoriale, l'utilisation simultanée de la PID, des MILD et des CTA a conduit, en 4 ans (de 2003 à 2007), à une réduction de 90% de la positivité des anophèles en antigène circumsporozoïtique de *P. falciparum*. Dans la même période, la parasitémie palustre chez les enfants de moins de 5 ans a chuté de 42 à 18% et la mortalité dans le même groupe d'âge a été réduite de 70%.

Aussi, les travaux de Akogbéto *et al.* (2011, sous presse) au Bénin ont montré une baisse significative du taux d'agressivité culicidienne, du taux de gorgement des moustiques, et du TIE suite aux traitements des murs au bendiocarb et à l'utilisation des MILD.

Si pendant plusieurs années, les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes étaient efficaces (Chandre *et al.*, 2000 ; Henry *et al.*, 2005), des travaux récents ont montré qu'une baisse d'efficacité s'est amorcée dans les populations naturelles résistantes du Bénin (N'Guessan *et al.*, 2007). La mutation du gène *Kdr* est le principal mécanisme de résistance développé par *An. gambiae* au Bénin et dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest. Il est probable que les *An. gambiae* porteurs de cette mutation en particulier les génotypes *Kdr/r* et *Kdr/s* soient les plus susceptibles à transmettre le paludisme puisque résistants aux insecticides, ils sont susceptibles de vivre plus longtemps comparativement aux moustiques sensibles *Kds/s* théoriquement plus fragiles au contact des agressions extérieures (LLIN, PID). Les résultats de nos travaux ont montré qu'il n'existe aucune relation entre le portage du gène *Kdr* et l'infectivité. Les travaux de Kounbobr *et al.* (2008) au Burkina-Faso et de Awolola *et al.* (2003) au Nigéria dans une zone rizicole à forte résistance aux pyréthrinoïdes, aux organochlorés et aux carbamates, indiquent un faible niveau de transmission du paludisme. Par contre, les travaux de Baldet *et al.* (1999) au Burkina-Faso dans la zone rizicole de la vallée de Kou où la fréquence *Kdr* est $> 0,85$, un homme non protégé reçoit entre 584 à 615 pi/h/an (donc une transmission très élevée).

Ces résultats contradictoires montrent qu'il n'existe pas de relation nette entre l'infectivité et la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides.

Discussions générales - Conclusions & perspectives

Le paludisme est un problème majeur de santé publique dans de nombreuses régions du monde et plus particulièrement sévère en Afrique sub-saharienne où l'on dénombre plus de 90% des cas déclarés (WHO, 2009). Les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILD) sont présentement considérées comme l'un des outils les plus efficaces de prévention contre les moustiques vecteurs, en particulier dans les régions de forte endémicité (Betson et al., 2009 ; Chandre et al., 2000 ; Henry et al., 2005 ; Lengler et al., 1996; Hawley et al., 2003 ; Akogbéto et al., 1995). Cependant, les récents travaux de N'Guessan et al. (2007) en cases expérimentales au sud du Bénin ont montré une baisse d'efficacité des MILD contre les populations sauvages d'*An. gambiae* résistantes aux insecticides. Cette baisse d'efficacité des MILD serait due à l'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes, principaux insecticides utilisés aussi bien pour l'imprégnation des moustiquaires que pour les pulvérisations intra-domiciliaires (Seyoum et al., 2002 ; Martinez-Torrez et al., 1998).

En effet, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides a été rapportée au Bénin vers la fin des années 80 avec la résistance aux organochlorés. Ce problème de résistance des vecteurs était censé en partie être réglé avec le retrait des organochlorés au profit des pyréthrinoïdes. Cependant, la mauvaise utilisation des pyréthrinoïdes dans les sites cotonniers et maraîchers à des doses anarchiques pour contrôler les ravageurs des cultures a énormément contribué à la sélection des insectes et ravageurs résistants qui ont développé des résistances multiples et croisées aux pyréthrinoïdes et au DDT mentionnées par plusieurs auteurs.

Au Bénin comme dans d'autres pays d'Afrique subsaharienne, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est inégalement répartie. Les résultats de nos travaux de recherche dans les zones à forte et à faible utilisation d'insecticide ont montré que la plupart des populations d'*An. gambiae* s.l sont résistantes au DDT

(organochloré) et à la perméthrine (pyréthriinoïdes). Toutefois, cette résistance ne s'est pas manifestée de la même manière dans les deux zones. Elle est beaucoup plus prononcée dans les zones à forte utilisation d'insecticide (zone de coton Calendaire, coton LEC, zones maraîchères) que dans les zones à faible utilisation d'insecticide (zone rizicole, zones céréalières).

Cette résistance phénotypique des populations d'*An. gambiae* s.l au DDT et à la perméthrine (Chandre et *al.*, 2010) observée dans la plupart des pays de l'Afrique de l'Ouest sont corrélées avec la fréquence de la mutation *Kdr*, ce qui amène à suggérer, comme dans beaucoup d'autres travaux, que la mutation *Kdr* est le mécanisme majeur de résistance croisée à ces deux insecticides (DDT et perméthrine).

Au Bénin, le niveau actuel de résistance des vecteurs aux insecticides est élevé comparativement à celui des années 2000 avec des foyers de multi-résistance aux pyréthriinoïdes et aux Organophosphorés et une extension géographique dans des zones jadis de non- résistance. La mutation *Kdr* Leu-Phe, principal mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes en Afrique de l'Ouest détectée au départ dans les zones cotonnières au sein des populations de la forme moléculaire S d'*An. gambiae* à des fréquences relativement élevées, est actuellement quasi fixée dans cette forme et a amorcé son expansion dans la forme moléculaire M par introgression. Son développement est lié à la fois à la bio-écologie du vecteur et à l'intensité de la pression de sélection exercée par l'utilisation des insecticides en santé publique et en agriculture.

Outre la résistance aux pyréthriinoïdes, nous avons noté une faible résistance d'*An. gambiae* aux carbamates (*Ace-1R*) confirmant les résultats de Corbel et *al.* (2007), Djogbenou et *al.* (2008) et Djènontin et *al.* (2010) chez les moustiques issus des zones à forte utilisation d'insecticides agricoles (zones de coton LEC, coton Calendaire, zones de cultures maraîchères). Cette apparition du gène *Ace-1R* 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 intra-domiciliaires dans le cadre de ses stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme. Cette situation pourrait augmenter, les années à venir, le niveau de résistance du gène *Ace-1R*. 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-IR* 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.

Les résultats de nos recherches montrent qu'au sud du Bénin et plus précisément à Houeyiho et Acron, *An. gambiae* s.s reste l'espèce qui assure la transmission du paludisme (Yadouléton et *al.*, 2010b). Par contre au nord du Bénin, la transmission est assurée par deux espèces : *An. gambiae* s.s (espèce majoritaire) et *An. arabiensis* (espèce minoritaire). Le niveau de la transmission du paludisme urbain varie selon qu'on est proche ou éloigné des zones maraîchères. Cette variation du niveau de la transmission est beaucoup plus significative en saison sèche où les populations situées proches des sites maraîchers reçoivent un à cinq fois plus de piqûres d'anophèles par rapport à celles situées loin de ces installations maraîchères. Cet accroissement de la transmission dans une région de paludisme stable n'est nécessairement pas synonyme d'une aggravation du paludisme-maladie du fait d'une saturation des piqûres infectées et de l'immunité protectrice établie auprès des personnes vivant proches de ces installations maraîchères dès l'adolescence. Malgré cela, il faudrait prendre en compte dans l'avenir cette situation dans le cadre des programmes de lutte anti-vectorielle du fait que la transmission du paludisme est pérenne en ces milieux et que les vecteurs du paludisme favorisés par le développement de l'agriculture maraîchère ont développé une forte résistance aux pyréthrianoïdes et aux organochlorés (Yadouléton et *al.*, 2009). Face au niveau élevé de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et son évolution rapide, la mise en place des stratégies alternatives s'avère nécessaire et doit reposer sur une politique de gestion de la résistance.

Des investigations sont nécessaires pour déterminer l'impact de la résistance génétique sur l'efficacité des matériaux imprégnés. Ces investigations prendront en compte non seulement la relation entre la fréquence de la mutation *Kdr* et les résultats des tests d'efficacité qui passeront par des évaluations de l'efficacité des MILD et du statut de résistance des matériaux imprégnés, mais également les expérimentations en phase II voire les évaluations pluridisciplinaires (entomologique, parasitologique, clinique) en phase III. Les résultats de ces travaux sont d'une importance extrême sur le plan

opérationnel car ils éclaireraient sur les stratégies de gestion de la résistance à partir de bases d'information concrètes. La gestion de la résistance des vecteurs doit être abordée de façon collective et aller au-delà des modèles théoriques qui, le plus souvent évoquent peu le rôle du milieu et l'activité humaine en tant que source de pression de sélection de cette résistance. Elle doit, en plus des concepts scientifiques, regrouper tous les acteurs utilisant les insecticides aussi bien en santé publique qu'en agriculture afin de permettre de pérenniser les bénéfices des MILD le plus longtemps que possible.

Par ailleurs, l'hypothèse du retrait des pyréthriinoïdes de l'agriculture au profit de la santé publique émise par plusieurs chercheurs pourrait permettre de réduire la fréquence du gène *Kdr* et par conséquent la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides.

Les résultats des tests de sensibilité/résistance des vecteurs du paludisme issus de la zone de coton biologique (coton ne nécessitant ni d'engrais chimique, ni pesticides chimique pour son développement) sont une preuve avec de faibles fréquences de la mutation du gène *Kdr* par rapport aux zones agricoles dans lesquelles les paysans utilisent les pyréthriinoïdes pour le contrôle des ravageurs (Yadouléon et *al.*, 2011).

Or, l'économie des pays sous-développés en occurrence celle des pays de l'Afrique sub-sahélienne dépend à plus de 50% de l'agriculture qui pour sa productivité, utilise les pyréthriinoïdes pour contrôler les ravageurs des cultures. Partant de ce fait, le retrait de ces pyréthriinoïdes ne serait pas chose facile du fait que non seulement ces insecticides sont relativement moins chers mais aussi efficaces contre la plupart des ravageurs des cultures.

Des propositions pourraient porter sur une rotation concertée des insecticides afin de limiter l'extension des gènes et mécanismes de résistance à des proportions où leur utilisation n'exercerait plus une pression de cette résistance sur les populations des moustiques. Cette option n'est pas impossible car la gestion de la résistance de vecteurs aux insecticides en santé publique a été obtenue avec le Programme de lutte contre l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest (OCP) qui a pu maîtriser le développement de la résistance de *Simulium damnosium* aux insecticides à des proportions raisonnables ne remettant pas en cause l'efficacité de la lutte anti-

vectorielle (Hougard et *al.*, 1993). Toutefois, le risque d'émergence d'autres mécanismes de résistance en l'occurrence la résistance métabolique, doit orienter la recherche vers de nouvelles classes d'insecticides ou de nouvelles combinaisons (associant plusieurs insecticides à différent mode d'actions très bénéfiques) qui pourrait compléter ou remplacer les pyréthrinoides là où ceux-ci devenaient inefficaces (Pie et *al.*, 2008 ; Ranson et *al.*, 2000). La recherche d'un produit insecticide moins cher, efficace et de rémanence élevée a conduit l'OMS à susciter le retour partiel du DDT uniquement en pulvérisation intra-domiciliaires. Mais la réintroduction du DDT devrait être analysée avec précaution et se faire s'il y avait urgence, au cas par cas, suivant le contexte de résistance de chaque pays. En attendant de trouver de nouvelles molécules, l'accent devrait être mis sur le renforcement des stratégies alternatives basées sur les combinaisons de pyréthrinoides avec des non pyréthrinoides (CM/OP ou répulsifs tels DEET).

Le recours aux entomopathogènes comme *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* dans la lutte contre les vecteurs du paludisme serait d'une grande utilité en ce sens que ces derniers ont montré une efficacité intéressante contre les anophèles et présentent l'avantage de ne pas montrer de résistance croisée avec les insecticides chimiques conventionnels (Scholte et *al.*, 2004.)

Aujourd'hui, avec la volonté de nombreux partenaires financiers comme la fondation Bill et Melinda Gates, le PMI, le Global Fund à éradiquer le paludisme, de nombreux travaux de sensibilisation restent à faire pour mieux « domestiquer » la moustiquaire imprégnée perçue souvent comme un outil d'usage ponctuel ou circonstanciel. Par ailleurs, dans l'attente d'un vaccin, aucune piste respectueuse de l'éthique ne peut être perçue comme superflue. Les recherches en lutte génétique dont les résultats pourraient compléter d'autres méthodes de lutte anti-vectorielle déjà appliquées sur le terrain sont à encourager.

De nos jours, le paludisme est de plus en plus relié à l'état de pauvreté des populations et sa réduction est perçue de ce fait comme une priorité de développement socio-économique. S'il demeure une préoccupation majeure pour les spécialistes de la santé, il doit constituer une priorité appuyée par la volonté politique au niveau des décideurs.

Référence bibliographique

1. Akogbéto M, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A. (2010): Bendiocarb : a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa in *Malaria Journal*, (9) p. 204.
2. Akogbeto M C, Djouaka RF, and Kinde-Gazard DA (2006): Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings, in *Malaria Journal*, (5) p. 22.
3. Akogbeto M C, Djouaka, Noukpo H (2005): Use of agricultural insecticides in Benin. In *Bull Soc Path Exo*, (98) pp 400-405.
4. Akogbeto M and Yakoubou S (1999): Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets, Benin, West Africa. In *Bull Soc Path Exo*, (92) pp 123-130.
5. Akogbéto M (1995) : Etude de la transmission du paludisme côtier lagunaire : Cas d'un village construit sur un lac d'eau saumâtre. *Ann Soc Belge Méd Trop*, (75) pp 219-227.
6. Alonso P L et al., (1993): 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* (2) pp 37-44.
7. Alonso PL et al., (1991) : The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. *Lancet*, 337: 1499-1502.
8. Anderson N, Hobo L (1993): Sociologie des sans-abris. Paris, Nathan.
9. Atangana J et al., (2010) : *Acta Trop.* (115) pp. 131-136.
10. Awolola TS et al., (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 Hyg* (103) pp. 1139-1145.
11. Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M (2003): Absence of the kdr mutation in the molecular 'M' form suggests different pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Tropical Medicine and International Health.* (8) pp. 420-422.
12. Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M (2002) : Resistance of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* (96) pp. 849-852.

13. Baldet T, Diabaté A, Guiguendé TR (1999): Etude de la transmission du paludisme dans la zone rizicole de la vallée du kou (Bama), Burkina -Faso. *Cahier Santé*. (13) pp 55-60.
14. Betson M, Jawara M, and Awolola TS (2009): Status of insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae* s.l. from malaria surveillance sites in the Gambia. *Malar J* (8) p. 187
15. Binka FN, (1996): Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana; a randomized controlled trial. *Trop Med Int Health*, (1) pp. 147-154.
16. Brengues J, et Coz J (1973): Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles (Sp.A) et *Anopheles funestus* Giles, en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest In *Cahier ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitology*, (11) pp. 107-126.
17. Brodgon WG, Mcallister J. and Vulule J (1997): Herne peroxydase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc*, (13) pp. 233-237.
18. Bruce-Chwatt, LJ (1987): Malaria and its control: present situation and future prospects. *Annu Rev Public Health*. (b) 8, pp. 75-110.
19. Burkot TR, Graves PM, Cattan JA, Wirtz RA, and Gibson FD (1987): The efficiency of sporozoite transmission in the human malaras, *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Bull World Health Organ*, (65) pp.375-380.
20. Carletto J, Martin T, Vanlerberghe-Masutti F, Brévault T (2010): Insecticide resistance traits differ among and within host races in *Aphis gossypiti*: Pest management science, 66 (3) pp. 301-307
21. Carnevale P, and Mouchet J (1990): Vector control and malaria control. *Med Trop*, (50) pp.391-398.
22. Chandre F. et al., (2010) : *Parasit Vectors*, 3 (1), 65 pages.
23. Chandre F et al. (2000): Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol*, (14) pp. 81-88.
24. Chandre F et al. (1999): Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc*, (b) 5 pp 53-59.

25. Chapman RF (1969): The insects' structure and function. The English universities; Press Ltd London, UK: 819p.
26. Christophe AN et al. (2011): Anopheles gambiae distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, 10:154
27. Clark TB, Kellen W, Fukuda T. and Lindegren JE (1968): Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus Beauveria bassiana to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, (11) pp. 1-7.
28. Coetzee M, Craig M, and Le Sueur D (2000): Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the Anopheles gambiae complex. *Parasitol* (16) pp 4-77.
29. Coluzzi M (1993): Advances in the study of A frotropical malaria vectors. *Parassitologia*. (35) pp. 23-29.
30. Coluzzi M., Sabatini A, Petrarca V, and Di Deco MA (1985): Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg.* (73) pp. 483-497.
31. Corbel V et al. (2007): Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus from Benin, West Africa. *Acta Trop*,101(3):207-216.
32. Alessandro (d') U (1995): Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet*, (345) pp 479-483.
33. Darriet F et al. (2002) : Un outil expérimental indispensable à l'évaluation des insecticides: les cases-pièges. *Bull Soc Pathol Exot*, (95) pp. 299-303.
34. Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio JMC, Koffi AA (1998): Impact de la résistance d'Anopheles gambiae s.s. à la perméthrine et à la deltaméthrine sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées. *Méd Trop* (58) pp. 349-354.
35. Della Torre A., Tu Z, and Petrarca V (2005): On the distribution and genetic differentiation of Anopheles gambiae s.s. molecular forms: *Insect Biochem Mol Biol*, (35) pp. 755-769.
36. Dia, I., Diop, T., Rakotoarivony, I., Kengne, P., and Fontenille D. (2003): Bionomics of Anopheles gambiae Giles, An. arabiensis Patton, An. funestus Giles and An. Nili (Theobald) (Diptera: Culicidae) and transmission of Plasmodium

- falciparum in a Sudano-Guinean zone (Ngari, Senegal). *J Med Entomol*, (40) pp. 279-283.
37. Diabate A et al. (2002a): The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* (67) pp. 617-622.
 38. Diabate A et al. (2002b): First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia.* 2002b, 44, 157–158.
 39. Diabate A et al. (2002c): The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* (67) pp. 617–622.
 40. Djènontin A et al. (2009): Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malaria Journal*, (8) pp. 233
 41. - Djènontin A 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. *Parasit Vectors*, 3:83
 42. Djogbénu L et al., (2008): Identification and Geographic Distribution of the ACE-1R Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* (78) pp. 298–302.
 43. Doannio JMC, Dossou-yovo J, Diarrassouba S (2002): La dynamique de la transmission du paludisme à Kafiné, un village rizicole en zone de savane humide de Côte d'Ivoire (Afrique de l'ouest). *Bull. Soc. Path. Ex*, 95 : (1)11-16.
 44. Dong K. (1997): A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (Kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol Feb*; 27(2) pp. 93-100.
 45. Dossou-yovo J, Doannio JMC, Diarrassouba S, and Chauvancy (1998): Impact d'aménagement des rizières dans la ville de Bouaké, Côte- d'Ivoire. *Bull Soc Path Exot*, (91) pp. 327-333
 46. Elissa N, Mouchet J, Riviere F, Meunier JY, and Yao K (1993): Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med Trop*, (73) pp. 291-294.

47. Etang J et al. (2003): Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J Med Entomol.* (40) pp. 491-497
48. Fanello C et al. (2003): The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, (12) pp. 241-245.
49. Favia G et al. (1997): Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol*, (6) pp. 377-383.
50. Fontenille D et al. (1990): Malaria transmission and vector biology in Manarintsoa, high plateaux of Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*, 43 (2): 107-115.
51. Gillies MT, de Meillon B (1968): The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). Johannesburg. The South African Institute for Medical Research.
52. Gwadz R. and Collins FH (1996): Culicine mosquitoes and the agents they transmit The biology of disease vectors. Ed. Beaty B.J & Marquardt W.C, University Press of Colorado, 632p.
53. Haubruge E. and Amicho M : Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 1998, 2 :161-174.
54. Hawley WA et al. (2003): Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, (68) pp. 121-127
55. Hay S, Guerra C, Tatem A, Atkinson P, Snow R (2005): Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol*, (3) p. 81
56. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L and Ranson H (2004): The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (34) pp. 653-665.
57. Henry MC et al. (2005): Protective Efficacy of Lambda-Cyhalothrin Treated Nets in *Anopheles gambiae* Pyrethroid Resistance Areas of Ivory Coast. *Am J Trop Med Hyg.* (73) pp. 859-864.

58. Hougard JM et al. (2003): Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bulletin of the World Health Organization*, (81) pp. 324-333.
59. Hougard JM, Poudiougou P, Guillet P, Quiilévéré D (1993): Criteria for the selection of larvicides by the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. *Ann Trop Med parasitol*. 87 (5) pp. 435-442
60. Hounkpodote M, Tossou C (2001): Profil des interactions entre la problématique foncière et le développement de l'agriculture urbaine dans la ville de Cotonou et environs. Cotonou, Institut Africain de Gestion Urbaine IAGU/Chambre nationale d'agriculture du Bénin. *Rapport final d'étude*.
61. IFDC (2005) : L'état du marché des intrants agricoles au Bénin. *Technical Bulletin*. 83 pages
62. Keiser J et al. (2004): Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. *Am J Trop Med Hyg*, (71) pp. 118-127.
63. Kelly-Hope L, Ranson H, Hemingway J (2008): Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. *Lancet Infect Dis.*, 8:387 – 9.
64. Koenraadt CJM, Majambres, Hemerik, Takken W (2004): The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae of *Anopheles gambiae s.l.* *Eomologia experimentalis et applicata*; 112: 125-134
65. Klinkenberg E, McCall PJ, Michael DW, Amerasinghe FP and Martin J Donnelly (2008): Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana. *Malaria Journal*, (7) 151 p.
66. Kounbobr RD et al. (2008): Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J.* (7) p. 188.
67. Lengeler c, Cattani J. and De Savigny D (1996): Net gain. A new method for preventing malaria deaths. IDRC Ottawa OMS Genève, 189 p.
68. Manga L, Bouchite B, Toto JC and Froment A (1997): La faune anophélienne et la transmission du paludisme dans une zone de transition forêt-savane au centre du Cameroun. *Entomologie médicale*, (91) pp. 4-9.
69. Martin T, Assogba-Komlan F, Sidick I, Ahle V, Chandre F (2010): An acaricide-treated net to control phytophagous mites. *Crop Protection*, (5) pp. 470-475.

70. Martinez TD et al. (1998): Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 1998, 7:179–184
71. Matthys B et al. (2006): Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d’Ivoire. *American Journal of Tropical Medicine Hyg*, (75) pp. 1223-1231.
72. Ministère de la Santé (2007) : Annuaire des statistiques sanitaires 2006. Direction de la Programmation et de la Prospective Cotonou, 209 pages.
73. Mouchet J (2004): Biodiversité du paludisme dans le monde. *Ed. John libbey Eutotext*, 428 pages.
74. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M (2007): Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging infectious diseases*, 13(2) pp. 199-206
75. N'Guessan R (2003): Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol*, (17) pp. 19-25.
76. Omumbo JA, Guerra CA, Hay SI, Snow RW (2005): The influence of urbanisation on measures of *Plasmodium falciparum* infection prevalence in East Africa. *Acta Trop*, (93) pp. 11–21.
77. Pennetier C (2007): Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, (6) p. 38.
78. Petrarca V, Vercruyse J, and Coluzzi, M. (1987) Observations on the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal River Basin, West Africa. *Med Vet Entomol*, (1) pp. 303-312.
79. Philogene BJR (1991): L'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes: problèmes et perspectives. La lutte anti-acridienne. *Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext*, Paris, pp. 269-278.
80. Pie M et al. (2008): Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Molecular Ecology*. (5) pp. 10-11

81. Ranson H, Jensen B, Wang X, Hemingway J, and Collins FH (2000): Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the *malaria vector Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*, (9) pp. (499-507).
82. Robert V, Awono HP, Thioulouse J (1998): Ecology of larval mosquitoes, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culcidae) in market-garden wells in urban Dakar, Senegal. *J Med Entomol*, (35) pp. 948-955.
83. Robert V, Carnevale P, Ouedraogo V, Petrarca V, Coluzzi M (1988): La transmission du paludisme humain dans un village de savane du Sud-Ouest du Burkina Faso. *Ann Soc belge Méd Trop*, (68) pp. 107-121.
84. Robert V (1989) : La transmission du paludisme humain: la zone des savanes d'Afrique de l'Ouest. 1989. Thèse, Université de Paris 6^e 325pages.
85. Rodhain F. and Perez (1985) : Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine s.a, 458pages.
86. Rozendaal JA (1999) : La lutte antivectorielle - Méthodes à usage individuel et communautaire.
87. Scholte EJ, Knols BG, Samson RA, Takekn W (2004): *Entomopathogenic fungi* for mosquito control: review. *J Insect Science*, (4) : 19.
88. Scott J A., Brogdon WG, and Collins FH: Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 49: 520-52.
89. Seyoum A et al. (2002): Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. *Transactions of the royal society of Tropical Medicine and Hygiene*, (96) pp. 225-231.
90. Shrivastata SP, Georghiou GP, Metcalf RL and Fukuto TR (1970): Carbamate resistance in mosquitoes: the metabolism of propoxur by susceptible and resistant larvae of *Culex pipiens fatigans*. *Bull. World Health Organ*, (42) pp. 931-942.
91. Snedecor GW, Cochran WG (1971) : Méthodes statistiques. Edition : Association de Coordination Technique Agricole, 649 pages.
92. Solomon T, Yeshambel B, Takele T, Tesfaye M, Beyene P (2011): Malaria prevalence pattern observed in the highland fringe of Butajira, Southern Ethiopia: a

- longitudinal study from parasitological and entomological survey. *Malaria Journal*, (10) p. 153
93. Touré YT et al. (1998): M. The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parasitologia*, (40) pp. 477-511.
 94. Touré YT et al. (1994): M. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae s.s* in Mali, west Africa. *Genetica*, (94) pp. 213-223.
 95. Tripet F, Toure Y T, Dolo G, and Lanzaro GC (2003): Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am J Trop Med Hyg*, (68) pp. 1-5.
 96. Vulule JM et al. (1999): Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol*, (13) pp. 239-244.
 97. Vulule JM et al. (1994): Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Med Vet Entomol*. (8) pp. 71-75.
 98. Weill M et al. (2004): The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol*, (9) pp. 1-7.
 99. Wondji C, Simard, F, and Fontenille D (2002): 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*, (11) pp. 11-19.
 100. WHO (1998) : Evaluation de la santé. Rapport sur la Santé dans le monde. La vie au 21^e siècle, une perspective pour tous, éd. *World Health Organisation*, Genève, Suisse, pp. 43-65.
 101. WHO (2010): World Malaria Report 2009. World Health Organization, Geneva.
 102. WHO (2011) : *World Malaria Report 2010*.
 103. Wirtz RA et al (1987): Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ*. (65) pp. 39-45.

104. Yadouleton A W M et al. (2009) : Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal*, (8) p. 103.
105. Yadouleton A. W. M et al. (2010a): Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal*, (9) p. 83.
106. Yadouleton A. W. M et al. (2010b): The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin *Parasites & vectors*. (3) p. 118
107. Yadouleton A. W. M et al. (2011): Cotton pest management strategies on the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* populations in northern Benin. *Parasites and Vectors*. (4) p. 60
108. Zaim M, and Guillet P. (2002) : Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol*. (18) pp. 161-163.

Annexe 1 : protocoles PCR

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 GTGTGCCCGCTTCTCGAATG
AG CTGGTTTGGTCGGCACGTTT
AA AAGTGTCTTCTCCATCCTA
AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

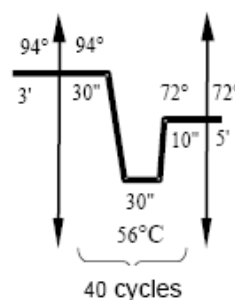
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05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

B/S int : ACCAAGATGGTTGGTTGC

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 :

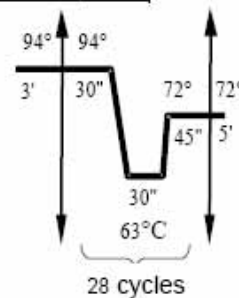
3' [30", 30", 45"]_{28c} 5' @ 63°C

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 AGACACGGATGATGAACC
D3 AATTTGCATTACTTACGACA
D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

Conditions PCR

Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207), pour un volume final de 25 µl par réaction

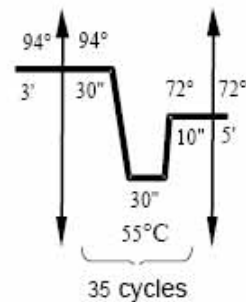
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl ₂	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer D1 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D2 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D3 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Primer D4 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 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 Résistant
D2/D4 : 137 bp 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

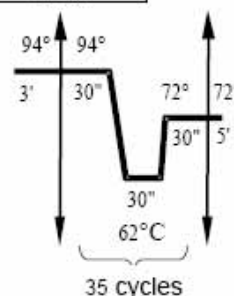
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH ₂ O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

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 138 bp



Annexe 2 : protocole Elisa

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 210</i> :	5 µl/5 ml PBS	v 210:	15 µl/15 ml PBS
<i>p. vivax 247</i> :	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 pailleasse (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 pailleasse.
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 pailleasse.
- 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. LAVÉ 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

Annexe 3 : articles publiés

1. **Yadouleton AW, Asidi A, Rousseau FD, Braïma J, Agossou CD, and Akogbeto MC: Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J*. 2009, **8**: 103.**
2. **Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Sahabi B, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Kinde G, Akogbeto MC: Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J* 2010, **9**: 83.**
- 3- **Akogbéto MC, Padonou G, Gbénou D, Irish S, Yadouleton AW: Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J* 2010, **9**:204.**
- 4- **Yadouléton AW, N'Guessan R, Allagbé H, Asidi A, Boko M, Osse R, G. Padonou, Gazard K, Akogbéto M: The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin *Parasites & vectors*. 2010b. **3**:118**
- 5- **Yadouleton AW, Martin T, Padonou G, Chandre F, Alex A, Djogbenou L, Dabiré R, Aïkpon R, Glitoh I, Akogbeto MC: Cotton pest management strategies on the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* populations in northern Benin . *Parasites and Vectors* 2011, **4**:60**
- 6- **Yadouleton Angés¹, Allagbé Hyacinthe², Padonou Gil ¹, Djouda Yves bertrand ³, Boko Michel ⁴, Akogbeto Martin ¹: Genèse et développement du maraîchage sur les sites maraîchers en République du Bénin. Accepté dans la revue *Vertigo***

Research

Open Access

Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin

Anges William M Yadouleton*^{1,2}, Alex Asidi¹, Rousseau F Djouaka³, James Braïma³, Christian D Agossou¹ and Martin C Akogbeto¹

Address: ¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604, Benin, ²University of Abomey-calavi, Benin and ³International Institute of Tropical Agriculture, 08 BP 0932 Cotonou, Benin

Email: Anges William M Yadouleton* - anges33@yahoo.fr; Alex Asidi - Alex.Asidi@lshtm.ac.uk; Rousseau F Djouaka - r.djouaka@cgiar.org; James Braïma - b.james@cgiar.org; Christian D Agossou - ddkunda@yahoo.fr; Martin C Akogbeto - akogbetom@yahoo.fr

* Corresponding author

Published: 14 May 2009

Received: 27 June 2008

Malaria Journal 2009, **8**:103 doi:10.1186/1475-2875-8-103

Accepted: 14 May 2009

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/103>

© 2009 Yadouleton et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: A fast development of urban agriculture has recently taken place in many areas in the Republic of Benin. This study aims to assess the rapid expansion of urban agriculture especially, its contribution to the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae*.

Methods: The protocol was based on the collection of sociological data by interviewing vegetable farmers regarding various agricultural practices and the types of pesticides used. Bioassay tests were performed to assess the susceptibility of malaria vectors to various agricultural insecticides and biochemical analysis were done to characterize molecular status of population of *An. gambiae*.

Results: This research showed that:

- (1) The rapid development of urban agriculture is related to unemployment observed in cities, rural exodus and the search for a balanced diet by urban populations;
- (2) Urban agriculture increases the farmers' household income and their living standard;
- (3) At a molecular level, PCR revealed the presence of three sub-species of *An. gambiae* (*An. gambiae s.s.*, *Anopheles melas* and *Anopheles arabiensis*) and two molecular forms (M and S). The *kdr* west mutation recorded in samples from the three sites and more specifically on the M forms seems to be one of the major resistance mechanisms found in *An. gambiae* from agricultural areas. Insecticide susceptibility tests conducted during this research revealed a clear pattern of resistance to permethrin (76% mortality rate at Parakou; 23.5% at Porto-Novu and 17% at Cotonou).

Conclusion: This study confirmed an increase activity of the vegetable farming in urban areas of Benin. This has led to the use of insecticide in an improper manner to control vegetable pests, thus exerting a huge selection pressure on mosquito larval population, which resulted to the emergence of insecticide resistance in malaria vectors.

Background

Malaria is one the deadliest vector-borne disease in the world with 1.5 to 3 million deaths a year [1]. More than 90% of the deaths recorded occur in Africa affecting mainly low immune response individuals, such as children under five years of age and pregnant women [2,3]. In 1992, the WHO set up sustainable strategies against malaria, focused on the proper treatment of malaria cases and the use of preventive measures against malaria vectors. Indoor residual spraying (IRS) and long-lasting insecticidal nets (LLINs) remain the two preventive measures presently used against malaria vectors. Both methods have been very effective in controlling *Anopheles* mosquitoes [4-10]. However the emergence of *Anopheles gambiae* populations carrying the *kdr* gene has become a serious threat to the future effectiveness of these control measures [3]. N'Guessan *et al* [11] recently established a clear relationship between pyrethroid resistance caused by *kdr* and the failure of LLINs and IRS in experimental huts in south Benin.

In the last decade, the emergence of resistance in populations of *Anopheles* to common class of insecticides used in public health was reported from many African countries [7,8]. Resistance affects the major vectors of malaria, *An. gambiae s.l* [4] and *Anopheles funestus s.l* [5]. The resistance of pyrethroid insecticides in *An. gambiae* has been documented in several parts of Africa [8,9,12,13] and has prompted considerable research activity to investigate mechanisms of resistance and factors contributing to the emergence of insecticide resistance [11,14]. There is currently a growing agricultural activity within and around African cities. In Benin, the urban farming has spread in almost all the major cities all over the country. Akogbeto *et al* [14,15] reported that mosquito species, *An. gambiae* in particular, lay their eggs in breeding sites located around agricultural settings. These eggs undergo a selection pressure from agricultural pesticides, which leads to the emergence of resistant strains. There is clear evidence on the implication of agricultural breeding sites in the selection of resistance in the major malaria vectors.

Indeed, a fast development of urban agriculture has recently been recorded in most settings in the Republic of Benin. At all levels of the society, people are devoted themselves to it. The reason which underpins the phenomenon is the impoverishment of the soil far from the town due to its overuse, rural exodus, unemployment, improvement of living standards, and the dietary requirement of urban population to be met.

Being ideal environments for larval growth, it has been reported that vegetable farming uses a large variety of synthetic pesticides for pest control [16]. Some of these insecticides are registered for pest treatments in vegetable

farms, whereas many are not [14-16]. During treatment, insecticide residues are washed away into the mosquito breeding sites thus exerting a selection pressure on larvae population [14,15]. This selection leads to the emergence of insecticide resistance in the population of *An. gambiae* breeding in these sites. The massive utilization of agricultural pesticides constitutes, therefore, a public health issue in tropical Africa [14,15].

This study was designed to assess the impact of the fast growing activities of vegetable farming on the resistance status of malaria vectors in three localities (Cotonou, Porto-Novo and Parakou) in Benin. The study focused on the investigation of agricultural practices in vegetable farming in urban areas, and their impact on the emergence of insecticide resistance in populations of *An. gambiae*.

Methods

Study sites

The study was conducted in the Republic of Benin, from July 2005 to February 2007 in three vegetable farms: Houeyiho in Cotonou, the economical capital of Benin, Acron in Porto-Novo, the political capital of Benin, and Azèrèkè near Parakou, in the northern part of the country.

The vegetable farm of Houeyiho, Cotonou

This farm is located at 6° 45'N and 2° 31'E in the downtown of Cotonou in a highly populated quarter. It is a 14-hectare farm shared between five cooperatives, each led by a chosen cooperative president. Each cooperative approximately consists of 300 individuals making an estimated farmer population of not less than 2,000 persons.

The vegetable farm of Acron, Porto-Novo

Located in south-eastern Benin at 6° 30'N and 2° 47'E at the outskirts of Porto-Novo, the vegetable farm of Acron is the oldest one in Benin. This site was established by missionaries in 1945. The farm consists of three hectares, initially cultivated by 10 farmers. The activities of the farm have now grown and the size has widened from three to 20 hectares. The number of farmers has also increased to about 150 individuals.

The vegetable farm of Azèrèkè, Parakou

This farm is located at 9° 22'N and 2° 40'E at the entrance of Parakou town, known as Azèrèkè site. The size of this vegetable plantation is 10 hectares. The farm is crossed by a canalization of rainfall from the main town. The vegetable farm of Azèrèkè is mostly cultivated by men of 35 to 50 years old and their children.

Collection of data on the rapid spread of vegetable farms in Benin

To generate adequate information on the fast spread of vegetable farms in Benin, knowledge-attitude-practice (KAP) studies were organized in the study sites of Houeyiho, Acron and Azèrèkè. A total number of 150 farmers were interviewed at Houeyiho, 80 at Acron and 60 at Azèrèkè. Farmers were subjected to semi-structured questionnaires focused on the history of vegetable farms, the size of farms, the number of workers, their educational levels, the type of vegetable grown, the farming techniques, the pesticides utilization in the farm. Qualitative data were recorded from direct observations, in-depth interview and focus group discussion.

Insecticide susceptibility test

To assess the impact of agricultural pesticides on the selection of resistance in malaria vectors, *Anopheles* larvae were collected from vegetable farms and reared to adults in the insectaria. Females mosquitoes aged 2–5 days old were subjected to susceptibility tests using insecticide-impregnated papers, as described by the WHO testing protocol [17]. Deltamethrin papers, impregnated at the diagnostic concentration of 0.05%, were used in this susceptibility assay. Results with this insecticide were compared with permethrin-impregnated paper (0.75%) and DDT-treated paper (4%). DDT and permethrin were both tested to detect the presence of cross-resistance between pyrethroids and organo-chlorine in *Anopheles* populations. Female *Anopheles* used in this bio-assay were exposed for one hour to insecticide-treated papers and were monitored at different time intervals (10', 15', 20', 30', 45', 60') to record "knock-down" times.

After 24-hour holding, delayed mortality was recorded. Following the WHO protocol, populations of *Anopheles* giving mortality rates below 95% after exposure to insecticide-impregnated papers were considered resistant. In this study, these criteria were slightly modified as follow:

- Mortality rates between 100-95%: the population was considered fully susceptible
- Mortality rates between 94-90%: the population was considered less susceptible
- Mortality rates below 90%: the population was considered resistant to the tested insecticides.

Based on the criteria mentioned above, data from insecticide susceptibility tests were used to characterize the susceptibility levels of *An. gambiae* populations in the three study sites. Dead and survived mosquitoes from this bio-assay were separately kept in Carnoy solution at -20°C for further molecular characterization.

Data analysis

Sociological information from focus group discussions, in-depth interviews and questionnaires conducted in studied communities were compiled and tabulated using Excel software and qualitative data were analysed by Text Base-Beta Software. Insecticide susceptibility test on the resistant strains from Houeyiho, Acron and Azèrèkè were compared and analysed using Stat-calc-Epi-info Software to get the status of resistance in the different sites investigated. A Fisher's exact test was performed to determine the differences between the three sites.

Results

Management of vegetable farms in Benin

At economical level, urban agriculture offers several advantages to farmers: quantitative and qualitative data from interviews and focus group discussion conducted in the three study sites revealed a major socio-economical impact of urban vegetable farming in households. Statistical studies conducted in vegetable farms of Benin for this research have shown that this activity produces each year more than 300 million FCFA to farmers [16,18]. This study has also shown that vegetable farming contributes to the development of husbandry by buying several end products and natural fertilizers like animal excreta. Vegetable farms consume each year more than 50 tones of natural fertilizers per hectare surface from husbandry, which represents one million franc CFA per hectare purchased to as fertilizers by aviculturist.

During investigation in the field, many pesticides were used but farmers declared that most of the insecticides were not registered for pest control in vegetable farms (Figure 1).

At social level, urban agriculture absorbs unemployed people by providing several job opportunities. In Cotonou, vegetable farms employ directly and permanently a total number of 3,600 workers, of which 600 are heads of groups and 3,000 are work members [16,18,19]. Subsequently, indirect beneficiaries, such as vegetable and pesticide sellers, also generate substantial incomes from vegetable farming. Series of training on agricultural practices are organized in these farms and are directed to unemployed youth.

Susceptibility of vectors to agricultural insecticides

5,000 three-day old female *An. gambiae* were exposed to three insecticide-impregnated papers (permethrin at 0.75%; deltamethrin at 0.05% and DDT at 4%). Mortality in control tubes was less than 5%.

Susceptibility of *An. gambiae* to pyrethroids

4,000 three- to five-day old female *An. gambiae* mosquitoes from Cotonou and Porto-Novo were exposed to per-

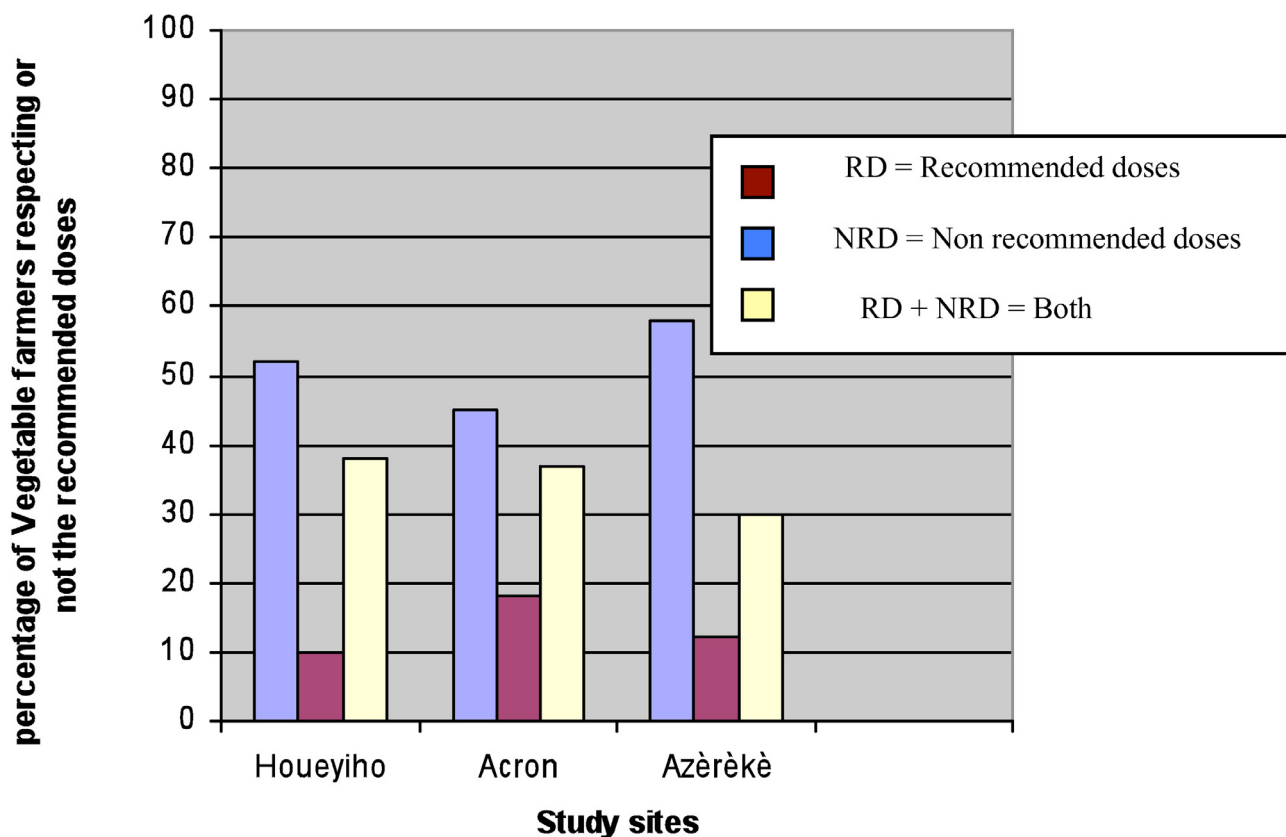


Figure 1
Doses used by vegetable farmers at the three study sites.

methrin. Mosquitoes tested with pyrethroid insecticides showed very low levels of mortalities (Table 1), which varied between 17% and 35.5% in Cotonou and 23.5% in the Porto-Novo site, respectively. The highest mortality rate (80.5%) was recorded during the rainy season with females from the vegetable farm of Houeyiho. A gradual loss of susceptibility to deltamethrin was observed with mortalities ranging from 86% to 90% in Cotonou and 91% in Porto-Novo.

A total number of 1,500 female *An. gambiae*, collected in vegetable farm of Parakou, was exposed to permethrin-impregnated papers. Mortality ranged from 76% to 80%. These mortality rates revealed the emergence of permethrin resistance in *An. gambiae* in this study site (Table 1). Concerning deltamethrin 0.05%, the mortality recorded ranged from 90.5 to 93.5%, suggesting the emergence of deltamethrin resistance in these populations.

Cross-resistance to DDT and pyrethroids

Only specimens of *An. gambiae* collected at Cotonou and Porto-Novo sites were tested with DDT. In both localities,

Anopheles were found resistant to permethrin and deltamethrin (Table 2). Low mortality rates were recorded with DDT (13.75% to 15.41%) (Table 3). This resistance observed with the DDT indicates a cross-resistance to the DDT and pyrethroids.

Determination of molecular forms and identification of species characterizing vegetable farms

Table five shows that 95% of mosquitoes analysed by PCR in Cotonou were *An. gambiae* s.s and 5% were *An. melas*. In Porto-Novo, 92% were *An. gambiae* and 8% *An. melas*. In Parakou, 85% were *An. gambiae* ss and 15% *An. arabiensis*. The characterization of molecular forms of *An. gambiae* from the northern site of Parakou gave 35% of « M » forms and 65% of « S » forms. By contrast, in the southern Benin at Houeyiho and Acron sites only « M » forms was found (Table 4).

Frequency of *kdr* mutations (*Leu-phe*) on resistant populations of *Anopheles* from vegetable farms

The PCR analysis of mosquito samples from Houeyiho (Cotonou) and Akron (Porto-novo) revealed high fre-

Table 1: Pesticides commonly used in vegetable farms at the three study sites

Commercial name	Active ingredient	Family
Cyhalone	deltamethrin	pyrethroid
Decis	deltamethrin	pyrethroid
Kinikini	mixture of cyfluthrin+malathion	pyrethroid
Rugby (Orthene)	cadufos 10 g	pyrethroid
Cytoate 335EC (Cypercil D335)	mixture of cypermethrin 35 g + dimethoate 300 g/l	pyrethroid
Furadan	carbofuran	carbamate
Malathion	malathion 500 g/l	organochlorine
Topsin-M	methylthiophanate 70%	organophosphorus
Nurelle D35/300	mixture of cypermethrin 35 g/l + chlorpyriphos methyl 300 g/l	organophosphorus
Dursban B18/300	mixture of cyfluthrin 18 g/l + chlopyriphos ethyl 300 g/l	organophosphorus
Callisulfan 350EC	endosulfan 350 g/l	cyclodiene

Source: Benin Minsitry of Agriculture; 2007

quencies of *kdr* mutation in *An. gambiae* populations: 88% in Houeyiho and 86.7% in Acron. This mutation was also found at 82.2% in samples of *An. gambiae* from Parakou (Table 5). However, analysis of *An. arabiensis* and *An. melas* collected during this study showed no *kdr* mutation. The *kdr* mutation is likely to be the main mechanism of resistance in *An. gambiae* in Benin.

Discussion and conclusion

Information collected during the interviews with farmers and the direct observations made confirmed a fast growing activity of vegetable farming and their economical impact in Benin. Urban agriculture contributes to food security and balanced diets. It provides additional incomes to populations throughout the year.

A field study conducted in Benin revealed that vegetable farming yields about 300 million FCFA annually to farmers in Benin with 30 to 40% used for direct consumption in farmers daily diet [3,15,20]. There is a clear evidence that vegetable farming activities do absorb unemployment and eventually reduce hunger [16,19-21].

Based on its numerous advantages, vegetable farming is becoming a new activity involving the various social groups: men, women, and children, educated, non-educated and even civil servants. More than 3,000 individuals are employed by urban farming and this sector is mainly man-powered by young people between 20 and 40 years of age. The massive use of pesticides in vegetable farms was confirmed during interviews with farmers. Some of

Table 2: Susceptibility of *Anopheles gambiae* s.s.* to permethrin and deltamethrin at the three study sites

	Permethrin (0.75%)		Deltamethrin (0.05%)	
	Number tested	% Mortality	Number tested	% Mortality
Houyihò	1500	18.5 ^a	1500	97.5 ^a
Acron	1500	22.5 ^a	1500	98 ^a
Azèrèkè	1500	76.5 ^b	1500	98.5 ^a

NB. Numbers in the same column with the same superscript do not differ significantly by Fisher test ($P > 0.05$)

*Tested *Anopheles* were collected from the vegetable farms of Houeyiho, Acron and Azèrèkè.

Table 3: Susceptibility of *Anopheles gambiae* s.s. to DDT at two study sites

	DDT			
	Number tested	Death after 24 h	Alive after 24 h	Mortality (%)
Houyiho	1200	165 ^a	1045 ^a	13.75 ^a
Acron	1200	185 ^a	1015 ^a	15.41 ^a

the pesticides recorded in vegetable farms were not registered, probably because of the liberalization of the pesticide sector and the elevated cost of registered pesticides (Table 1). Uncontrolled use of pesticides in Benin has resulted in the emergence of insecticide resistance in *An. gambiae* larvae breeding in vegetable farms. The emergence of pyrethroid resistance in *An. gambiae* has become a serious concern to the success of malaria control in the last decade [22,23]. This study showed that pyrethroid insecticides used in vegetable farms are similar to those used in public health against malaria vectors. Pyrethroids remain the only family of insecticides currently registered for the impregnation of bed-nets, the major control strategy against malaria vectors [6,24]. Among the pyrethroids, deltamethrin is definitely the most used in both public health and agriculture. Cyfluthrin is one of the pyrethroids used in combination with organophosphates in agriculture [14,15]. The *kinikini* (in local language), which is a combination of cyfluthrin and malathion, is widely used in vegetable farming and in public health as Solfac [14,15]. Studies on insecticide resistance have been currently on most malaria agenda in Africa because of its impact on impregnated bed-nets the major tool against malaria vectors [6,24]. The first case of pyrethroids resistance in *An. gambiae* has been reported in Africa since the 1993 [23,24]. Dieldrin and DDT resistance were reported in Burkina-Faso with populations of *An. gambiae* [23,24]. Pyrethroids resistance was reported in *An. gambiae* in Côte d'Ivoire [22,23] and later on many others cases of pyrethroid resistance in *Anopheles* vectors were detected in West [25], Central [24], Eastern [26] and Southern Africa [27].

In a recent study, a relatively high frequency of *kdr* mutations (*Leu-Phe*) was recorded in *An. gambiae* collected from cotton farms under massive insecticide treatments compared to farms with no pesticide utilization [22,23].

The *kdr* mutation is probably responsible for the emergence of resistance of *An. gambiae* to DDT and pyrethroids in West Africa. The hypothesis of the implication of the *kdr* mutation in the emergence of resistance has been confirmed in this research. In most localities where resistance was detected, the PCR analysis of samples revealed a high frequency of *Kdr* genes in localities of Cotonou and Porto-Novo. This study provides further evidence on the contribution of the overuse of insecticide in agriculture to the widespread emergence of insecticide resistance in *Anopheles* species. In addition to the *kdr* mutation, there are other existing factors, which seem to confer cross-resistance to pyrethroids and DDT, as described by Diabaté *et al* in the West African region [23].

The implication of metabolic mechanisms of resistance was not neglected in this study. Several studies are being currently conducted at CREC to determine the levels of acetylcholinesterase in *An. gambiae* after exposure to propoxur. In addition, elevated monooxygenase, esterases and glutathion-s-transferases have also been investigated. The increase number of vegetable farming in urban areas of Benin has been confirmed as a result of investigations made during this study from July 2005 to February 2007. This has led to the use of insecticide in improper manner to control vegetable pests, thus exerting a huge selection pressure on mosquito larval population leading to an emergence of mosquito resistance to insecticides.

More investigations need to be carried out in the future in order to better control the use of pesticides in vegetable farming within urban areas, especially in Benin where pyrethroid resistance has been widely reported in *An. gambiae*. These findings showed an increase emergence of resistance in *An. gambiae* populations in the vegetable farm breeding sites located not far from human dwellings. It is, therefore, important to set up insecticide manage-

Table 4: PCR determination of mosquito forms and species collected from the three study sites.

	PCR (form)			% <i>An. gambiae</i> s.s.	PCR (Species)	
	Total tested	% S	% M		% <i>An. melas</i>	% <i>An. arabiensis</i>
Houyiho	200		200	198	2	---
Acron	200	----	200	192	8	---
Azèrekè	200	35	165	185	----	15

Table 5: PCR characterization of *kdr* gene in *An. gambiae* collected from the three study sites

Study sites	PCR <i>kdr</i>							
	Survivors (Total tested per site: 200)				Dead (Total tested per site: 100)			
	RR	RS	SS	<i>Kdr</i> Frequency	RR	RS	SS	<i>Kdr</i> Frequency
Houeyiho	60	120	20	90 ^a	7	20	73	27 ^a
Acron	57	115	28	86 ^a	12	23	65	35 ^a
Azérékè	45	98	57	71.5 ^a	5	15	80	20 ^a

NB. Numbers in the same column with the same superscript do not differ significantly by Fisher's test ($P > 0.05$)

ment structures to prevent failure from malaria vector control measures using especially those pyrethroid insecticides.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AWY contributed to design of the study and conceived the protocol, the data analysis and interpretation. MCA contributed in the study design, fully involved financially and in the implementation of this research, guided the study from conception to the manuscript finalization and the write up of the manuscript. JB contributed in the study design and in the implementation of this research. AA, RFD and CDA contributed to the design of the study and substantially helped in drafting the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to the International Development Research Centre (IRDC) who through its AGROPOLIS grant programme. The author would like to thank the Malaria Research Training Center team, and IRD-Benin team, especially Dr Fabrice Chandre, for their help.

Many thanks to Vincent Ishola, Razack Ossé, Mouinath Souradjou and Gil Padonou for their technical assistance. The author is thankful to Jean-Claude Dumais, Paul Viveiros, Mark Redwood and Alison Clegg for the administrative support.

References

- Djouaka RF, Bakare AA, Bankole HS, Doannio JMC, Kossou H, Akogbeto MC: **Quantification of the efficiency of treatment of *Anopheles gambiae* breeding sites with petroleum products by local communities in areas of insecticide resistance in the Republic of Benin.** *Malar J* 2007, **6**:56.
- Danis M, Gentilini M: **Le paludisme fléau mondial.** *Revue Praticien* 1998, **48**:254-257.
- Gachot B, Bruneel F, Behr C: **Paludisme pernicieux.** *Revue Praticien* 2001, **51**:638-643.
- Akogbéto M: **Etude de la transmission du paludisme côtier lagunaire: Cas d'un village construit sur un lac d'eau saumâtre.** *Ann Soc Belge Méd Trop* 1995, **75**:219-227.
- Beach R: **International vector resistance testing.** *Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, Larch, Utah* 1997:23-27.
- Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L-H, Gazin P, Richard A, Mouchet J: **La lutte contre le paludisme par les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes au Burkina-Faso.** *Bull* 1988, **81**:832-842.
- Coluzzi M, Petrarca V: **Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and others insects.** *Ann Soc Belge Méd Trop* 1973, **33**:249-250.
- Magesa SM, Wilkest J, Minzawa AEP, Myamba J, Philip MD: **Trial of pyrethroid impregnated bed nets in area of Tanzania hole endemic of malaria. Part II. Effects on vector population.** *Acta Trop* 1990, **49**:97-108.
- Service MV, Davidson G: **A light incident of dieldrin resistance in *An gambiae* Giles from an unsprayed area in northern Nigeria.** *Nature* 1964, **203**:209-210.
- Snow RW, Rowen KM, Lindsay SM, Greenwood BM: **A trial permethrin treated bed nets prevention of malaria in Gambia children.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, **82**:838-842.
- N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin.** *Emerging infectious diseases* 2007, **13**(2):199-206.
- Hemingway J, Ranson H: **Insecticide resistance in insect vectors of human disease.** *Ann Rev Entomol* 2000, **45**:371-391.
- Burton GJ: **Observations on the habits and control of *Culex pipiens fatigans* in Guyana.** *Bull World Health Organ* 1967, **37**:317-322.
- Akogbeto MC, Djouaka R, Noukpo H: **Utilisation des insecticides agricoles au Bénin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**(5):400-405.
- Akogbeto MC, Djouaka RF, Kinde-Gazard DA: **Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings.** *Malar J* 2006, **5**:22.
- Assogba-Miguel V: **Agriculture urbaine et périurbaine à Cotonou.** *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin n°27* 1999:14-26.
- WHO: **Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides: Tenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control.** *WHO Technical Report Series, No. 737* Geneva. World Health Organization; 1986.
- PADAP. Programme d'Appui au Développement Agricole Périurbain du Sud Bénin: **Rapport de l'étude Diagnostic: demande, offre et marchés et système de production.** *Tome 2, Agrisud International* 2003:148.
- Hounkponou KS: **Agriculture et Urbanisation: Analyse de la pression foncière sur les activités de maraîchage dans le Sud du Bénin. Cas de Cotonou, Ouidah et Grand-Popo.** *Thèse d'Ingénieur Agronome, FSA/UAC. I Op* 2003.
- van Dijk PM: **Le secteur informel dans les villes et sa contribution positive à leur développement.** *Le Courrier* 1995:73.
- Dongmo T, Gockowski J, Hernandez S, Awono L, Moudon M: **L'agriculture périurbaine à Yaoundé: ses rapports avec la réduction de la pauvreté, le développement économique, la conservation de la biodiversité et de l'environnement.** *Tropicultura* 2005, **23**:130-135.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemde T, Darriet F, Bregues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, Hougard JM: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:617-622.
- Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde T, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM: **First report of the *kdr* mutation in *Anopheles***

- gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa.** *Parassitologia* 2002, **44**:157-158.
24. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: **Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon.** *J Med Entomol* 2003, **40**:491-497.
 25. N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, Koffi AA, Chandre F: **Resistance to carbosulfan in field populations of *Anopheles gambiae* from Côte-d'Ivoire based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase.** *Med Vet Entomol* 2003, **17**:19-25.
 26. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McCallister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA: **Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin impregnated nets.** *Med Vet Entomol* 1999, **13**:239-244.
 27. Hargreaves K, Koerkemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: ***Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:181-189.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



RESEARCH

Open Access

Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin

Anges W Yadouleton^{1*}, Gil Padonou¹, Alex Asidi³, Nicolas Moiroux^{1,2}, Sahabi Bio-Banganna¹, Vincent Corbel^{1,2}, Raphael N'guessan^{1,3}, Dina Gbenou⁴, Imorou Yacoubou⁵, Kinde Gazard⁶, Martin C Akogbeto¹

Abstract

Background: The emergence of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* has become a serious concern to the future success of malaria control. In Benin, the National Malaria Control Programme has recently planned to scaling up long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS) for malaria prevention. It is, therefore, crucial to monitor the level and type of insecticide resistance in *An. gambiae*, particularly in southern Benin where reduced efficacy of insecticide-treated nets (ITNs) and IRS has previously been reported.

Methods: The protocol was based on mosquito collection during both dry and rainy seasons across forty districts selected in southern Benin. Bioassay were performed on adults collected from the field to assess the susceptibility of malaria vectors to insecticide-impregnated papers (permethrin 0.75%, deltamethrin 0.05%, DDT 4%, and bendiocarb 0.1%) following WHOPES guidelines. The species within *An. gambiae* complex, molecular form and presence of *kdr* and *ace-1* mutations were determined by PCR.

Results: Strong resistance to permethrin and DDT was found in *An. gambiae* populations from southern Benin, except in Aglangandan where mosquitoes were fully susceptible (mortality 100%) to all insecticides tested. PCR showed the presence of two sub-species of *An. gambiae*, namely *An. gambiae s.s.* and *Anopheles melas*, with a predominance for *An. gambiae s.s.* (98%). The molecular M form of *An. gambiae* was predominant in southern Benin (97%). The *kdr* mutation was detected in all districts at various frequency (1% to 95%) whereas the *Ace-1* mutation was found at a very low frequency ($\leq 5\%$).

Conclusion: This study showed a widespread resistance to permethrin in *An. gambiae* populations from southern Benin, with a significant increase of *kdr* frequency compared to what was observed previously in Benin. The low frequency of *Ace-1* recorded in all populations is encouraging for the use of bendiocarb as an alternative insecticide to pyrethroids for IRS in Benin.

Background

More than 90% of recorded malarial deaths occur in Africa among the most vulnerable low immune response individuals, such as children under five years old and pregnant women [1,2]. The National Malaria Control Programmes (NMCP) in African countries currently relies on strategies targeting mosquito vector control, which involve the use of long-lasting insecticidal nets (LLINs) and/or indoor residual spraying (IRS), the two most effective preventive measures. Both methods have shown to be very effective against *Anopheles* mosquitoes

[3-8]. In 2010 in Benin, a full coverage of LLINs countrywide couple with IRS in the department of Ouémé in southern Benin will become a new tool to improve malaria prevention and control.

However, the development of pyrethroid resistance in populations of *Anopheles gambiae* has become a serious threat to the effectiveness of these two vector control measures [9]. N'Guessan *et al* [10] recently established a clear relationship between pyrethroid resistance caused by *kdr* and the failure of LLINs and IRS in experimental huts in south Benin. In the last decade, the emergence of resistance in populations of *Anopheles* to common classes of insecticides used in public health has been reported in many African countries including Kenya [11], Côte d'Ivoire [12], Benin [13-15], Niger [16],

* Correspondence: anges33@yahoo.fr

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

Burkina Faso [17,18], Mali[19], Nigeria[20], South Africa [21], and Cameroun [22].

In West Africa, the main mechanism involved in pyrethroid-resistance in *An. gambiae* is caused by target site insensitivity through a knockdown resistance (*kdr*)-like mutation caused by a single point mutation (*Leu-Phe*) in the para-sodium channel gene [23]. Preliminary surveys done in Benin southern in *An. gambiae* populations by Corbel et al [14], indicated that the *Leu-Phe kdr* mutation has been found almost only in the M form at high frequency (0.95).

Indeed, several authors reported that the use of insecticides in households and pesticides in agricultural settings has greatly increased selection pressure leading to the emergence of insecticide resistance in malaria vectors [13-15,24]. In Benin, it was reported that DDT resistance in *An. gambiae sensu lato (s.l.)* was the result of massive use of DDT house spraying applications in several districts of the country during the WHO malaria eradication campaign in the 1950s [25].

A study in Burkina Faso documented a relatively high frequency of *kdr* mutations (*Leu-Phe*) in *An. gambiae* collected from cotton farms under massive insecticide treatment compared to farms with no pesticide utilization [18]. Therefore, several studies on insecticide resistance have currently been addressing the agenda of most malaria scientists in sub-Saharan Africa and around the world to approach in different ways the crucial issues of insecticide resistance in malaria vectors which threatens the effective usefulness of ITNs and IRS for malaria prevention [6,26].

Previous resistance monitoring surveys conducted in Benin had focused on the south-north transect. It is then a priority to investigate the status of insecticide resistance in *An. gambiae* in southern Benin, because pyrethroid resistance has been reported with a clear evidence of reduced efficacy of ITNs and IRS in experimental huts [10,26]. In addition to the *kdr* mutation, which is the main mechanism of resistance to pyrethroids, it's important to address also the distribution of the *Ace.I* allele that causes resistance to organophosphates and carbamates. With support of Presidential Malaria Initiative (PMI), a large-scale programme based on free-ITN distribution in combination with IRS was implemented since 2008 in four districts in Department of Ouémé in southern Benin. To attain a better understanding of the resistance situation in Benin particularly in these localities because of the use of bendiocarb in IRS, it is important to characterize the spatial distribution of resistance in *An. gambiae* in a variety of ecological settings and then attempt to correlate this resistance with pesticide usage. The present study propose to assess the resistance status of malaria vectors to carbamates, pyrethroids and assessed the implications for

vector control strategy in a new geographical setting of an opposite east-west transect of the southern part of Benin. This area has a different bioclimatic characteristic with high rainfall (1,500 mm yearly), where insecticides are extensively used for both public health and agricultural purposes.

Methods

Study areas

The study was carried out in forty districts of southern Benin characterized by a continual practice of urban and peri-urban agriculture, with two rainy seasons (March- July and October- November) and two dry seasons (December-March and August-September). The annual mean rainfall is 1,500 mm in July, relative humidity (RH) of $70\% \pm 5$ and a minimum/maximum temperature ranging from 23 to 32°C. The choice of these environments is justified by their particular bioclimatic characteristics and the use of insecticides or fertilizers in public health and agriculture. Indeed, the presence of susceptible population of *An. gambiae* to pyrethroids and organophosphorous recorded in some districts will help to effectively use the IRS and ITNs in the study areas.

Mosquito collections

Mosquitoes were collected during the dry (from February to March) and the rainy seasons (April-July) across the forty districts selected in south Benin. Larvae and pupae were collected using the dipping on breeding sites and then kept in separated labelled bottles related to each locality. A part of the larvae samples was reared up to adult emergence at the CREC (Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Benin) insectary for further bioassay tests.

Insecticide susceptibility test

Females mosquitoes aged 2-5 days old were exposed to diagnostic doses of various insecticides for susceptibility tests using insecticide-impregnated papers, as described by the standard WHO testing protocol [27]. The following insecticides were tested: deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%). The emphasis was also put on deltamethrin, because of a nationwide distribution of PermaNets by the NMCP. The use of DDT is justified by the detection of cross-resistance between pyrethroids and organo-chlorine in *Anopheles* populations. The carbamate bendiocarb was one of the alternative insecticides to pyrethroids currently used for IRS in Benin [28].

For each treatment, five test tubes were used: one untreated paper as a control and four treated papers to expose mosquitoes. Control tubes contained filter papers impregnated with silicon oil (insecticide carrier) only,

whereas treated papers were impregnated with diagnostic doses of insecticide plus carrier.

An average of twenty-five mosquitoes was introduced into each tube. Females of *An. gambiae* used in this study were exposed for one hour to insecticide-treated papers and monitored at different time intervals (10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) to record the “knock-down” times. After one-hour exposure, mosquitoes were transferred into holding tubes and provided with cotton wool wetted with a 10% honey solution. Mortalities were recorded after 24 hours and the susceptibility status of the population was graded according to the WHO recommended protocol [27]. Dead and survived mosquitoes from this bioassay were separately kept in Carnoy solution at -20°C for further molecular characterization.

Molecular characterization of Anopheles populations using PCR analysis

In each locality, 25-35 females of *An. gambiae* samples from the WHO bioassays were analysed at the molecular level. PCR analysis for species identification [29] was performed to identify various members of *An. gambiae* complex collected in each site. The next set of PCR focused on molecular forms using PCR-RFLP [30], which involved only *An. gambiae sensu stricto* (*s.s.*). The PCR forms sub-grouped the *An. gambiae s.s.* into two molecular forms: *An. gambiae s.s. M* and *An. gambiae s.s. S* forms. The last series of PCRs determined the presence of *kdr* mutations in *An. gambiae ss*. Populations, as described by Martinez-Torres et al [31]. The PCR-RFLP diagnostic test was used to detect the presence of G119S mutation (*Ace.1* gene) as described by Weill et al [32].

Data interpretation

The resistant status of mosquito samples was determined according to the WHO criteria [27].

Following the WHO protocol

- Mortality rates is > 97%: the population was considered fully susceptible
- Mortality rates ranged between 80 > × < 97%: resistance suspected in the population
- Mortality rates < 80%, the population was considered resistant to the tested insecticides.

Mortality rates were corrected using Abbott formula when control mortality was above 5% [33]. Molecular results (PCR *Kdr* and *Ace-1*) were compared to insecticide susceptibility tests performed with the WHO method to conclude on the *An. gambiae* status in the districts surveyed.

Mapping insecticide resistance in mosquito vectors in southern Benin

Using geographical information recorded with GPS, screened localities were projected on a map of southern

Benin where mosquito larvae were collected. Resistance data were obtained from 40 districts in 6 departments (Ouémé, Plateau, Littoral, Atlantique, Mono, Couffo) and spatialized using the ESRI ArcGis Software.

Data analysis

Analysis using the computer software Excel, Fisher's exact tests was performed on the data sets gathered from the localities surveyed. Parameter for analysis included the resistance status of each tested population of *An. gambiae*. The insecticide susceptibility test on resistant strains from different districts was compared and analysed using Statcalc-Epi-info software, to compare the status of insecticide resistance in the different sites investigated. A Fisher's exact test was performed to determine if there was any significant difference between two given sites.

Results

Resistance status

Additional file 1 shows the insecticide resistance status of *An. gambiae s.l* populations from the 40 districts of southern Benin. Following the exposure of females of *An. gambiae* to permethrin impregnated papers, all 40 populations were fully susceptible to deltamethrin and bendiocarb, 39 out of 40 were resistant to permethrin and 39 out of 40 showed resistant to DDT (see Additional file 1)

Identification of molecular forms of Anopheles gambiae s.s

1,500 mosquitoes from the 40 districts were successfully analysed by species, molecular forms. PCR revealed the presence of two sub-species of *An. gambiae*: *An. gambiae s.s.*, and *Anopheles melas* with a predominance of *An. gambiae s.s* (98%). The M form was predominant over the S form (M = 98%; S = 2%).

Detection of resistance genes

Allele and genotype frequencies at the *kdr* and *Ace.1* loci are shown in Additional file 2. Results from this study showed that the *kdr* mutation was present in all *An. gambiae* populations collected from the different district. The highest frequencies were recorded in Dogbo, Lokossa and Lanta (96%, 95% and 95%, respectively) and the lowest frequency was recorded in *An. gambiae* strains from Aglandan (1%). The *Ace-1* mutation was found in *An. gambiae* populations collected from the different districts but at very low frequency (from 1% to 5%).

Mapping insecticide resistance in mosquito vectors in southern Benin

Using geographical information recorded with GPS, screened localities were projected on a map of Benin and areas of permethrin and bendiocarb resistance or

susceptibility were marked. The map generated from this study showed a spread of resistance of permethrin in most districts of South Benin (Figure 1). However, the levels of resistance registered in the following localities, Sakété, Kétou, Lokossa, Dogbo, Comè and Lanta were relatively consistent compared to other sites of the districts. On the other hand, no resistance was found in, Houeyogbé, Aglangandan, and Ifangni, districts.

Discussion

The species composition of *Anopheles gambiae* complex identified during this study did not differ from those recorded in previous studies in Benin. It was shown that, within the *An. gambiae* complex, *An. gambiae* s.s. M form was predominant (> 98%) and has as a wide distribution across southern Benin Corbel *et al* [14]. The same trend was found in some localities of Mali, Nigeria [34-36]. The absence of *An. melas* in many districts in southern Benin can be attributed to the fact

that larvae were mostly sampled from pools and puddles rather than flooded water, which is the preferred breeding site of *An. melas* [37]. No *An. arabiensis* was found in the different localities.

The study showed a wide distribution of resistance in *An. gambiae* s.l. to permethrin and DDT in southern Benin whereas all samples of *An. gambiae* tested were fully susceptible to deltamethrin and bendiocarb. The widespread resistance to DDT and permethrin in southern Benin can be explained by a long-standing, massive use of DDT house-spraying in several districts of the country during the WHO malaria eradication programme in the 1950s [25]. In addition, the rapid expansion of urban agriculture is one of the major factors that contributes to a large distribution of pyrethroid resistance in *An. gambiae* s.l. Corbel *et al* [14]. A recent report by Yadouleton *et al* [15] has confirmed that urban farming in Benin has enormously contributed to the emergence of resistance in *Anopheles* populations.

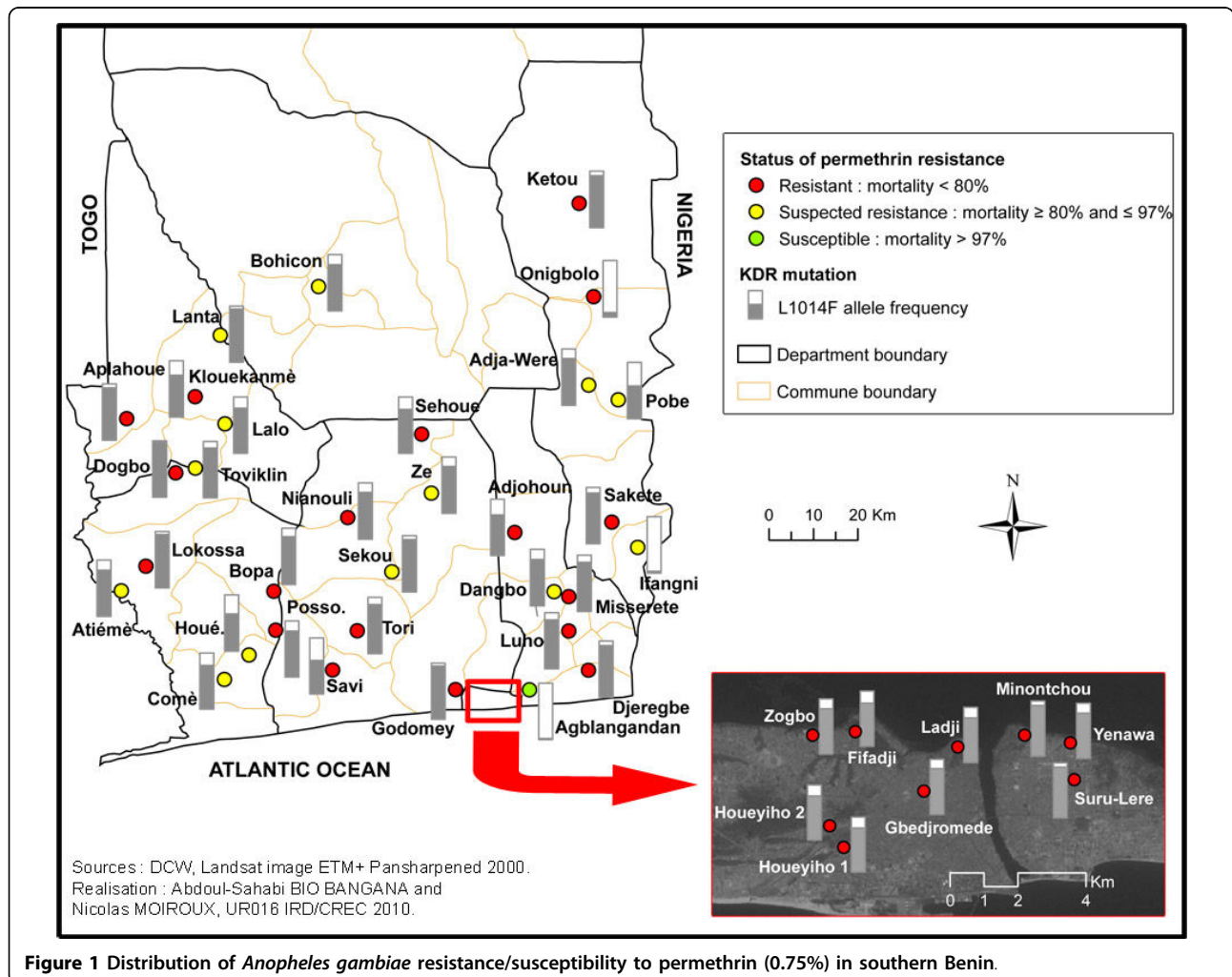


Figure 1 Distribution of *Anopheles gambiae* resistance/susceptibility to permethrin (0.75%) in southern Benin.

As reported by Akogbeto *et al* [24], some populations of *An. gambiae* lay their eggs in breeding sites containing insecticide residues. A study in vegetable farming in Benin [15] has shown that such activities in urban areas directly led to an improper use of insecticides to control vegetable pests, thus exerting a huge selection pressure on mosquito larval population. Moreover, the liberalization of the pesticide sector and the increased cost of pesticides registration have incited most of the farmers to illegally procure insecticides and an uncontrolled use of these chemicals in Benin. This factor has also contributed to the emergence of insecticide resistance in *An. gambiae* populations [15,24].

However, the absence of pyrethroid-DDT cross resistance in *An. gambiae* from Aglangandan in the Département of Ouémé can be explained by the absence of agriculture activities in this area. Recently, qualitative data were collected from direct observations, in-depth interview and focus group discussions to confirm this hypothesis [15].

Some populations of *An. gambiae* have developed low resistance to bendiocarb in southern Benin. This can be explained by the fact that in these areas, carbamate and organophosphorous insecticides were mostly used by farmers for crop protection [38]. The results confirm those of Corbel *et al* [14] and Djogbenou *et al* [39] that previously showed a low frequency of the Ace1 allele in malaria vectors populations in Benin. This is particularly relevant to strengthen vector control campaigns using Indoor Residual Spraying based on carbamate and/or organophosphate as alternatives to pyrethroids, which are currently used by the NMCP in several areas of Benin.

Conclusion

The emergence of pyrethroid resistance in *An. gambiae* has become a serious concern for the success of malaria control in the last decades. To date, pyrethrinoids remain the only family of insecticides currently recommended by the WHO for the impregnation of bed nets. This study showed a relatively wide distribution of insecticide resistance in *An. gambiae*, especially to permethrin and DDT. The current findings will help for decision-making in the National Malaria Control Programme especially in the choice of insecticide to use during the next campaigns of Indoor Residual Spraying (IRS) in Benin.

Additional file 1: Percentage of dead *Anopheles gambiae* observed after 1 hour exposure to permethrin (0.75%), bendiocarb (0.1%), DDT (4%), deltamethrin (0.05%) in 6 departments in southern Benin.

Additional file 2: Species identification, molecular forms and frequency of the *kdr*, and *Ace.1* alleles and genotypes in *Anopheles gambiae* s.l.

Acknowledgements

This work was supported by the Presidential Malaria Initiative and Bill/Melinda Gates and I am grateful to the CREC's team for technical assistance during laboratory bioassays and field collections.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, République du Bénin. ²Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs, 01 BP 4414 RP Cotonou, République du Bénin. ³London School of Tropical Medicine and Hygiene, London, UK. ⁴WHO-Benin. ⁵National Malaria Control Programme, Benin. ⁶Faculté des Sciences de la Santé, Benin.

Authors' contributions

AWY contributed to design of the study and conceived the protocol, proceed data analysis and interpretation. MCA, DG, KD, IY contributed to the study design, provided funding and coordination. GP, contributed in the study design and in the implementation of this research. BB and NM contributed to the mapping. AA, NR, VC contributed to manuscript drafting. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 September 2009 Accepted: 24 March 2010

Published: 24 March 2010

References

1. Lindblade KA, Walker ED, Onapa AW, Katungu J, Wilson ML: **Highland malaria in Uganda: prospective analysis of an epidemic associated with El Nino.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, **93**:480-487.
2. Malakooti MA, Biomndo K, Shanks GD: **Reemergence of epidemic malaria in the highlands of western Kenya.** *Emerg Infect Dis* 1998, **4**:671-676.
3. Akogbeto M: **Etude de la transmission du paludisme côtier lagunaire: Cas d'un village construit sur un lac d'eau saumâtre.** *Ann Soc Belge Méd Trop* 1995, **75**:219-227.
4. Beach R: **International vector resistance testing.** Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, Larch, Utah 1997, 23-27.
5. Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L-H, Gazin P, Richard A, Mouchet J: **La lutte contre le paludisme par les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides au Burkina-Faso.** *Bull Soc Path Exot* 1988, **81**:832-842.
6. Coluzzi M, Petrarca V: **Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and others insects.** *Ann Soc Belge Méd Trop* 1973, **33**:249-250.
7. Magesa SM, Wilkest J, Minzawa AEP, Myamba J, Philip MD: **Trial of pyrethroid impregnated bed nets in area of Tanzania hole endemic of malaria. Part II. Effects on vector population.** *Acta Trop* 1990, **49**:97-108.
8. Service MV, Davidson G: **A light incident of dieldrin resistance in *Anopheles* Giles from an unsprayed area in northern Nigeria.** *Nature* 1964, **203**:209-210.
9. Santolamazza Federica, Calzetta Maria, Etang Josiane, Barrese Elena, Dia Ibrahim, Caccione Adalgisa, Donnelly JMartin, Petrarca Vincenzo, Simard Frederic, Pinto Joao, Torre Alessandra della: **Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa.** *Malar J* 2008, **7**:192.
10. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:199-206.
11. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McCallister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA: **Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin impregnated nets.** *Med Vet Entomol* 1999, **13**:239-244.
12. Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K: **Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire.** *Ann Soc Belge Méd Trop* 1993, **73**:291-294.
13. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, Hougard JM, Guillet P: **Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance.** *Malar J* 2004, **3**:22.

14. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougaard JM, Rowland M: **Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.
15. Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin.** *Malar J* 2009, **8**:103.
16. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB: **Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation.** *Malar J* 2009, **8**:189.
17. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Hougaard JM: **First report of the *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa.** *Parassitologia* 2002, **44**:157-158.
18. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbéto M, Guiguemde RT, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Graham JS, Hougaard JM: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **61**:7-622.
19. Fanello C, Petrarca V, Della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, Allouche A, Curtis CG, Toure YT, Coluzzi M: **The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2003, **12**:241-245.
20. Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M: **Resistance of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:849-852.
21. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: ***Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:181-189.
22. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: **Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon.** *J Med Entomol* 2003, **40**:491-497.
23. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P: **Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*.** *Bull World Health Organ* 1999, **77**:230-234.
24. Akogbéto M, Djouaka R, Noukpo H: **Use of agricultural insecticides in Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**:400-405.
25. Joncour G: *Lutte anti-palustre au Dahomey* Rapport no 13: Ministère de la Santé Publique 1959.
26. Magesa SM, Wilkest J, Minzawa AEP, Myamba J, Philip MD: **Trial of pyrethroid impregnated bed nets in area of Tanzania hole endemic of malaria. Part II. Effects on vector population.** *Acta Trop* 1990, **49**:97-108.
27. WHO: **Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides.** *Tenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control.* Geneva. WHO Technical Report Series, No: 737 World Health Organization 1986.
28. RTI International: **Indoor Residual Spraying (IRS) Indefinite Quantity Contract (IQC).** PMI, USAID 2008.
29. Scott J, Brogdon W, Collins F: **Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by PCR.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
30. Favia G, Della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: **Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation.** *Insect Mol Biol* 1997, **6**:377-383.
31. 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**:179-184.
32. 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 Mol Biol* 2004, **13**:1-7.
33. Abbott WS: **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** *J Am* 1987, **3**:302-303.
34. Awolola TS, Oyewole IO, Amajoh CN, Idowu ET, Ajayi MB, Oduola A, Manafa OU, Ibrahim K, Koekemoer LL, Coetzee M: **Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria.** *Acta* 2005, **95**:204-209.
35. Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M: **The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa.** *Parassitologia* 1998, **40**:477-511.
36. Wondji C, Simard F, 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.
37. Diabate A, Baldet T, Chandre C, Dabire KR, Kengne P, Guiguemde TR, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Hougaard JM: **KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa.** *J Med Entomol* 2003, **40**:195-198.
38. IFDC: **L'état du marché des intrants agricoles au Bénin.** *Technical Bulletin, IFDC-T70* 2005, **83**.
39. Djogbéno L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougaard JM, Chandre F: **Identification and geographic distribution of the *ace-1r* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:298-302.

doi:10.1186/1475-2875-9-83

Cite this article as: Yadouleton et al.: Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal* 2010 **9**:83.

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

Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa

Martin C Akogbéto¹, Gil Germain Padonou¹, Dina Gbénou³, Seth Irish² and Angès Yadouleton*¹

Abstract

Background: *Anopheles gambiae*, the main malaria vector in Benin has developed high level of resistance to pyrethroid insecticides, which is a serious concern to the future use of long-lasting insecticidal nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS). In this context, one of the pathways available for malaria vector control would be to investigate alternative classes of insecticides with different mode of action than that of pyrethroids. The goal of this study was to evaluate under field conditions the efficacy of a carbamate (bendiocarb) and an organophosphate (fenitrothion) against pyrethroid-resistant *An. gambiae s.s.*

Methods: Wild populations and females from laboratory colonies of five days old *An. gambiae* were bio-assayed during this study. Two pyrethroids (deltamethrin and alphacypermethrin), an organophosphate (fenitrothion), a carbamate (bendiocarb) and a mixture of an organophosphate (chlorpyrifos + a pyrethroid deltamethrin) were compared in experimental huts as IRS treatments. Insecticides were applied in the huts using a hand-operated compression sprayer. The detergency, exophily, blood feeding rate and mortality induced by these insecticides against *An. gambiae* were compared to the untreated control huts.

Results: Deltamethrin, alphacypermethrin and bendiocarb treatment significantly reduced mosquito entry into the huts ($p < 0.05$) compared to untreated huts. Blood feeding rates in huts treated with fenitrothion and the mixture chlorpyrifos/deltamethrin were reduced from 10.95% respectively to 3.7% and 4.47% three months after treatment and from 10.20% to 4.4% and 2.04% four months after treatment. Exophily rates in huts with deltamethrin, alphacypermethrin and the mixture chlorpyrifos/deltamethrin were significantly higher than in the huts with fenitrothion. Deltamethrin and alphacypermethrin had the lowest mortality rate while fenitrothion killed 100% of *An. gambiae* (in the first month) and 77.8% (in the fourth month). Bendiocarb and the mixture chlorpyrifos/deltamethrin mortality rates ranged from 97.9 to 100% the first month and 77.7-88% the third month respectively.

Conclusion: After four months, fenitrothion, bendiocarb and the mixture chlorpyrifos/deltamethrin performed effectively against pyrethroid-resistant *Anopheles*. These results showed that bendiocarb could be recommended as an effective insecticide for use in IRS operations in Benin, particularly as the mixture chlorpyrifos/deltamethrin does not have WHOPEs authorization and complaints were mentioned by the sleepers about the safety and smell of fenitrothion.

Background

In Benin, malaria is one of the most frequently recorded diseases in health centres. The incidence for both uncomplicated and complicated cases in 2006 was 139 per 1,000 inhabitants [1]. During the same year, malaria was the

primary cause of mortality and morbidity in health centres in the departments of Ouémé and Plateau [1]. Over the past few years, the National Malaria Control Programme (NMCP) has implemented control interventions to reduce the contact between malaria vectors and human hosts. The major control strategies applied at national level were the scaling up of long-lasting insecticidal nets (LLINs) throughout the country and indoor

* Correspondence: anges33@yahoo.fr

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

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

residual spraying (IRS) in one of the cities of Benin (Cotonou). Despite these tremendous efforts made by the NMCP, the results obtained were less encouraging than expected. Resistance was suspected to be one of the reasons of the failure of malaria vector control programmes in Benin. In 1963, the World Health Organization reported that 32 species of *Anophelinae* were resistant in Africa to DDT and dieldrin [2]. After, Elissa reported the first case of pyrethroid resistance in *An. gambiae* in Côte d'Ivoire [3]. In other regions of Africa, numerous cases were documented in Kenya [4], Burkina Faso [3,5], South Africa [6], Côte d'Ivoire [3], Mali [7] and Cameroon [8]. In Benin, the knockdown gene implicated in resistance to DDT and pyrethroids was detected at high frequency ($kdr > 0.9$), especially in the urban areas of Cotonou [9-11]. A recent study by N'guessan *et al* in an experimental hut study showed a reduced efficacy of lambda-cyhalothrin-treated nets against *An. gambiae* in Ladj, an outskirt area of Cotonou [12].

Despite these reports on pyrethroid resistance in Bénin, the National Malaria Control Programme decided to undertake, in 2008, a distribution of LLINs and to implement IRS in the department of Ouémé particularly in the districts of Sèmè-Kpodji, Dangbo, Misséré-té and Adjohoun. The increasing emergence of resistance leads to an urgent need to investigate alternatives to pyrethroid insecticides [13] and a continual monitoring of resistance before the implementation of any vector control programme. The widespread pyrethroid resistance is becoming a major problem faced by several National Malaria Control Programmes throughout Africa, particularly in Benin where failure of ITNs and IRS has been reported in experimental huts [12]. Experimental hut studies have shown that certain organophosphates and carbamates were particularly effective on wild populations of pyrethroid resistant vectors [14]. Field trials with the carbamates propoxur and bendiocarb for indoor residual spraying treatment have been very effective against pyrethroid resistant malaria vectors [15]. Over the past few years, there was an increasing interest in testing these insecticides for public health purposes as alternatives to pyrethroids. In the present study, we compare under semi field conditions in experimental huts the efficacy of the carbamate bendiocarb, the organophosphate fenitrothion and a mixture of chlorpyrifos (organophosphate) and deltamethrin (pyrethroid) for IRS treatment against pyrethroid resistant mosquitoes.

Methods

Study site

The study was carried out in experimental huts located in Akron at the outskirt of Porto Novo, [15], a swampy area used annually for vegetables cropping. There are many *An. gambiae* and other culicinae breeding sites around

the vegetable plots. Porto Novo is situated at 6. 33 N, 2.37 E in the southern part of Benin, about 30 kilometres from the Atlantic Ocean. The composition of *An. gambiae s.l.* is 100% *An. gambiae s.s.* M form (Padonou, unpublished) the main malaria vector in this area. This vector is present all year-round and has developed a strong resistance to pyrethroid insecticides with a high frequency of *kdr* gene at 86.7% [16].

Experimental huts

The study was conducted in experimental huts (Figure 1), which are designed for the standard WHO Phase II evaluation of insecticide-treated nets and IRS [17]. Experimental huts were originally used to study the behaviour of mosquitoes inside houses, but also used to evaluate the effect of IRS [18]. The experimental huts used were the West African type, of the Darriet model, that allows the entry of mosquitoes through the slits but not their exit. Each hut was 2.5 m long, 1.75 m wide, and had an interior ceiling 2 m high. The walls were made of concrete blocks covered with cement. The roof was made of corrugated iron. A tarpaulin was stretched under the roof to reduce heat in the hut and facilitate the capture of mosquitoes.

A 10 cm wide moat filled with water surrounded each hut to prevent the entry of scavengers such as ants and spiders. Six identical huts were built at the station. Five huts were treated with insecticides using a backpack sprayer and the sixth was left untreated as a control. The absorption of the walls was 112 ml of insecticide per m² and that of the ceiling (polyethylene), the entry slits, and the door (painted metal) was in total 53.13 ml/m². The area of the walls to treat was 15 m² and that of the roof, the doors, and the entry slits was 5.1 m². To treat the walls of the huts, 1.7 L of water was used. For the rest of the huts, 270.8 ml of water was used. Using these measures, the five huts were treated according to WHO recommendations [19];



Figure 1 Experimental huts, Akron station. Courtesy CREC (September 2007).

Hut 1: Bendiocarb (800 g/kg) at 200 mg/m²;
Hut 2: Deltamethrin (250 g/kg) at 25 mg/m²;
Hut 3: Alphacypermethrin (50 g/kg at 30 mg/m²
Hut 4: Fenitrothion (400 g/kg) at 2 g/m²
Hut 5: Mixture of chlorpyrifos 250 g/L + deltamethrin 12 g/L at 560 mg/m² and 25 mg/m², respectively
Throughout the study, sleepers slept under untreated bed nets.

Biological materials

The behaviour of mosquitoes in the presence of insecticidal treatments was analysed on two samples of *An. gambiae*: The wild populations of Akron area attracted to sleepers inside experimental huts and wild *An. gambiae* emerged from field collected larvae which were released into the experimental huts. This last sample of mosquitoes was released during the period where there was insignificant density of mosquitoes entering the huts. The released *An. gambiae* were collected as larvae from the study site, and reared at the same place, so that the tested mosquitoes are not different from the wild population entering the huts. On average 20-27 not-blood-fed females of *An. gambiae* were released three times a month at 20:00 hours for a total number of 60-80 *An. gambiae* per hut.

Sleepers and mosquito collection

Before the beginning of the evaluation, a blank collection of mosquitoes was carried out during two weeks in the experimental huts to compare the natural attractiveness between huts. Sleepers spent the same number of nights in each hut. The collections were done by six volunteer adult men, recruited by the CREC from the study area. The collectors were rotated between the huts, sleeping under a mosquito net from 21:00 hours to 06:00 hours. At 06:00 hours, mosquitoes were collected in the hut, using a mouth aspirator in the veranda and the hut room. By 08:00 in the morning, collection in huts was completed. All mosquitoes were put in netted plastic cups and transferred to the laboratory for identification. Mosquitoes were identified into species using Coluzzi key [20] and recorded as dead or alive, fed or unfed. Live mosquitoes were held in plastic cups and delayed mortality was recorded after 24 h. The effects of each treatment were expressed relative to the control in terms of:

- Deterrence rate: percentage of reduction in the number of mosquitoes caught in treated hut relative to the number caught in the control hut;
- Exophily rate: percentage of mosquitoes that have escaped the hut and have taken refuge in the veranda trap divided by the total number of mosquitoes collected in the hut;
- Blood-feeding rate: percentage of blood fed mosquitoes collected divided by the total of mosquitoes collected in verandah and hut;

- Immediate mortality: percentage of dead mosquitoes collected in the morning compared to total mosquitoes collected in the hut;
- Overall mortality: general mortality: immediate mortality + delayed mortality recorded after 24 h.

Collection of qualitative data

Over the course of the study, interviews were conducted to identify any side effects of insecticide treatments on the collectors. These interviews were conducted at the end of the first and fourth month of collection.

Statistical analysis

The statistical analysis was conducted using SPSS (Version 16.0). The effect of treatments was evaluated using analysis of variance (ANOVA) to compare treatments to the control.

Ethical approval

The present study received a formal approval from the Ministry of Health of Benin and the Entomological Research Centre of Cotonou (CREC). The consent of all volunteers was required before their participation in the study. Malaria prevention and curative treatments were provided to all sleepers in the huts who showed symptoms of the disease.

Results

Attractiveness of huts before treatment

The homogeneity of attractiveness of the experimental huts was verified using ANOVA on the numbers of mosquitoes caught in each hut prior to treatment. This analysis showed (Figure 2) that the individual huts did not differ significantly in terms of the number of mosquitoes entering ($p = 0.228$ for *An. gambiae* and $p = 0.257$ for culicine mosquitoes).

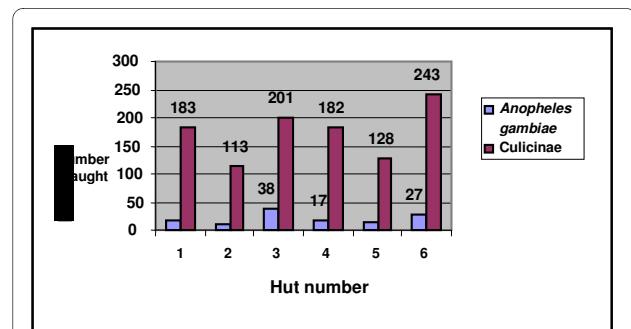


Figure 2 Number of *An. gambiae* and culicine mosquitoes collected in the experimental huts (September 5-17, 2007) before insecticidal treatment (Sleepers spent the same number of nights in each hut).

Table 1: Data of wild *Anopheles gambiae* collected 2 months post-treatment IRS (September to November 2007)

Treatments	Month	Number of females caught	Detergency (%)		Exophily (%)		Blood feeding (%)		Immediate mortality (%)		Overall mortality (%)	
				Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	
Control	1	80	-	12,5^a	-	31,25^a	-	0^a	-	3,7^a	-	
	2	101	-	19,80 ^a	-	29,70 ^a	-	0 ^a	-	2,97 ^a		
Bend	1	70	12,5	28,6^a	[14,49-42,30]	20^a	[12,13-31,85]	57,14^c	[48,65-69,86]	92,85^c	[85,76-99,65]	
	2	80	20,79	22,50 ^a	[9,80-28,85]	12,50 ^b	[3,05-19,05]	25 ^{bc}	[10,93-41,82]	68,75 ^c	[56,42-81,80]	
Delta	1	55	31,25	45,4^b	[25,31-74,95]	18,18^a	[6,28-33,91]	32,72^b	[18,40-51,46]	72,72^b	[58,79-84,06]	
	2	76	24,75	26,31 ^a	[15,86-37,36]	23,68 ^a	[7,04-50,63]	15,78 ^b	[6,81-29,32]	31,57 ^b	[22,81-40,33]	
A-Cyper	1	61	23,8	42,6^b	[24,62-61,36]	19,67^a	[6,65-33,45]	27,86^b	[16,29-44,95]	77,04^b	[59,85-95,52]	
	2	89	11,88	22,47 ^a	[15,18-31,77]	13,48 ^a	[6,88-21,50]	19,10 ^b	[10,98-29,85]	39,32 ^b	[34,33-44,32]	
Féni	1	85	0	24,7^a	[13,16-39,70]	9,41^b	[3,03-17,35]	91,76^d	[84,30-96,87]	100^c	[100-100]	
	2	95	5,94	22,10 ^a	[14,20-28,93]	12,63 ^b	[4,14-20,38]	40 ^{cd}	[30,73-52,55]	73,68 ^c	[64,41-82,95]	
Chlor- Delta	1	85	0	17,6^a	[8,95-25,94]	10,58^b	[3,01-22,59]	95,3^d	[89,20-101,36]	100^c	[100-100]	
	2	70	30,69	25,71 ^a	[15,05-39,97]	11,42 ^b	[4,02-17,35]	44,28 ^d	[27,12-74,50]	78,57 ^c	[62,06-95,00]	

Bend: Bendiocarb; Delta: Deltamethrin; a-Cyper: Alpha-cypermethrin; Féni: Fenitrothion; Chlor- Delta: Chlorpyrifos + Deltamethrin.

Conf Lim: 95% confidence limits

For a same parameter of the table, values which carry different letters in expositant were significantly different (p < 0. 05).

Results of collections after insecticide treatment

Deterreny and induced exophily

During the course of the first month after treatment, the huts treated with deltamethrin and alphacypermethrin had a significant deterreny for *An. gambiae* of 31.3% and 23.8%, respectively compared to the control hut (Table 1), and for culicinae of 46.2% and 38.4% (Table 2). The deterreny of the huts treated with bendiocarb, fenitrothion, and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture were not significantly different from the control hut ($p > 0.05$). However, during the second month, the huts with deltamethrin and the mixture of chlorpyrifos and deltamethrin had shown a deterreny for *An. gambiae* of 24.8% and 30.7%, respectively (Table 2).

In addition to reduction of entry, the huts treated with deltamethrin and alphacypermethrin induced significant levels of exophily ($p < 0.05$) on wild *An. gambiae* (Table 1), as well as those released in the huts (Table 3). This was not the case with other treatments, which were not significantly different from the control ($p > 0.05$). However, a significant increase in exophily was noted with bendiocarb, fenitrothion and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture ($p < 0.05$). In the third and fourth months, the exophily in huts treated with alphacypermethrin and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture increased from 42.3 to 55.9% and from 35.8 to 57.1%, respectively.

Blood feeding

The blood feeding rates of wild Anopheles entering the huts treated with deltamethrin, alphacypermethrin, and bendiocarb were not significantly different from the control hut during the first month ($p > 0.05$) (Table 1). Contrary to what was observed with wild Anopheles, with the culicine and the released *An. gambiae*, the blood feeding rates in all five insecticide treatments were significantly less than that of the control ($p < 0.05$). In the second

month, the blood feeding rates of mosquitoes in the Bendiocarb, fenitrothion and chlorpyrifos-deltamethrin mixture huts were significantly less than the control hut ($p < 0.05$). Over the third and fourth months, blood feeding in the chlorpyrifos-deltamethrin mixture and fenitrothion huts remained lower than that of the control ($p < 0.05$).

Immediate mortality

During the first two months, the immediate mortality rates of mosquitoes in huts treated with deltamethrin and alphacypermethrin were significantly higher than the control ($p < 0.05$). During the second month (Table 3), the mortality of released *An. gambiae* in hut treated with alphacypermethrin (39.0%) was significantly higher than that treated with deltamethrin ($p < 0.05$). For bendiocarb, the immediate mortality during the first month was clearly higher than that of deltamethrin and alphacypermethrin, but less than that of those of fenitrothion and the mixture of chlorpyrifos and deltamethrin. During the second month, the immediate mortality in the chlorpyrifos-deltamethrin hut (44.3% for wild *An. gambiae*, Table 1) remained unchanged. The released *An. gambiae*, in fenitrothion and the mixture chlorpyrifos-deltamethrin huts resulted in highest rates of immediate mortality, giving 74.4% and 70.6%, respectively. During the third and fourth months, there was a complete decline of the immediate mortality in huts with deltamethrin (6.4%) and alphacypermethrin (3.1%). However, the insecticidal effects of fenitrothion 68.6% and 71.1%, chlorpyrifos-deltamethrin 61.2% and 28.6%, alphacypermethrin 3.4% and 29.4%, and bendiocarb 69.5% and 10.9% remain continually high (Table 3).

Overall mortality

Over the first month, deltamethrin and alphacypermethrin showed good performance with high overall

Table 2: Data of wild *Culex sp.* and *Mansonia sp.* one month after IRS treatment (September to October 2007).

Treatments	Number of females Catches	Deterreny (%)		Exophily (%)		Blood feeding (%)		Immediate mortality (%)		Overall mortality (%)	
		Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim
Control	975	-	30,76 ^a	-	19,48 ^a	-	0,30 ^a	-	2,56 ^a	-	-
Bend	550	43,58	27,27 ^a [23,00-32,53]	16,36 ^b	[14,22-19,00]	19,09 ^c	[15,84-23,02]	38,36 ^c	[35,46-41,35]		
Delta	525	46,15	33,33 ^a [28,67-38,33]	14,28 ^b	[9,58-20,07]	8,5 ^b	[7,07-10,10]	20,95 ^b	[17,74-23,79]		
α-Cyper	601	38,35	33,44 ^a [31,74-35,72]	16,63 ^b	[9,24-24,02]	11,81 ^b	[5,57-18,05]	24,29 ^b	[14,57-33,72]		
Féni	805	17,43	21,73 ^a [18,41-24,63]	14,90 ^b	[13,91-15,77]	31,18 ^e	[27,80-34,13]	53,41 ^d	[50,14-56,37]		
Chlor- Delta	850	12,82	27,05 ^a [25,10-29,01]	14,11 ^b	[12,79-15,45]	23,64 ^d	[22,26-24,86]	52,11 ^d	[49,22-55,21]		

Bend: Bendiocarb; Delta: Deltaméthrin; α-Cyper: Alpha-cyperméthrin; Féni: Fénitrothion; Chlor- Delta: Chlorpyrifos + Deltaméthrin.

Conf lim: 95% con fiance limits

For a same parameter of the table, values which carry different letters in exposant were significantly differents ($p < 0, 05$).

Table 3: Data of *Anopheles gambiae* collected during 4 months after IRS treatment (September 2007 to January 2008)

Treatments	Month	Number of females caught		Exophily (%)		Blood feeding (%)		Immediate mortality (%)		Overall mortality (%)
		Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	Rate	Conf Lim	
Control	1	62	16,12 ^a	-	32,25 ^a	-	0 ^a	-	3,22 ^a	-
	2	73	27,39 ^a	-	13,69 ^a	-	0 ^a	-	2,73 ^a	-
	3	73	6,84 ^a	-	10,95 ^a	-	0 ^a	-	4,10 ^a	-
	4	49	42,85 ^a	-	10,20 ^a	-	0 ^a	-	6,12 ^a	-
Bend	1	60	25 ^b	[21,92-28,16]	25 ^b	[21,92-28,16]	50 ^e	[43,86-56,31]	81,66 ^d	[76,23-87,20]
	2	48	33,33 ^b	[28,28-38,31]	10,41 ^a	[2,43-18,19]	72,91 ^d	[67,44-78,50]	81,25 ^d	[68,78-94,14]
	3	72	51,38 ^e	[45,40-57,37]	8,33 ^a	[8,33-8,33]	69,44 ^c	[63,47-75,40]	77,77 ^c	[71,79-83,76]
	4	46	63,04 ^d	[54,68-71,42]	4,34 ^a	[-5,11-14,01]	10,86 ^b	[1,82-19,85]	47,82 ^d	[35,72-60,11]
Delta	1	60	38,33 ^c	[29,55-47,26]	16,66 ^d	[7,31-19,24]	25 ^b	[21,92-28,16]	66,66 ^b	[62,45-70,95]
	2	52	71,15 ^d	[68,80-73,47]	9,61 ^a	[1,57-17,60]	7,69 ^b	[-0,9385-16,4]	67,30 ^c	[59,88-74,76]
	3	63	23,80 ^b	[23,81-23,81]	6,34 ^a	[-0,48-13,17]	6,34 ^a	[-0,48-13,17]	22,22 ^b	[15,39-29,05]
	4	32	46,87 ^{ab}	[40,44-53,49]	9,37 ^a	[8,09-10,70]	3,12 ^a	[-10,00-16,07]	28,12 ^b	[24,26-32,09]
α-Cyper	1	60	35 ^c	[30,70-39,42]	18,33 ^c	[10,71-26,02]	26,66 ^b	[22,15-31,11]	78,33 ^c	[71,68-81,75]
	2	82	59,75 ^c	[57,66-61,82]	12,19 ^a	[7,60-16,73]	39,02 ^c	[34,39-43,65]	60,97 ^b	[56,34-65,60]
	3	78	42,30 ^d	[42,31-42,31]	5,12 ^a	[-0,37-10,63]	3,84 ^a	[3,85-3,85]	24,35 ^b	[18,85-29,86]
	4	34	55,88 ^{bcd}	[38,81-73,31]	5,88 ^a	[-6,97-19,10]	29,41 ^c	[14,60-44,47]	35,29 ^c	[31,01-39,70]
Féni	1	70	27,14 ^b	[22,70-31,53]	24,28 ^b	[18,65-29,90]	42,85 ^c	[40,28-45,47]	85,71 ^d	[80,54-90,96]
	2	43	67,44 ^d	[58,43-76,49]	11,62 ^a	[1,95-21,23]	74,4 ^d	[65,25-83,63]	83,72 ^d	[75,62-91,99]
	3	54	22,22 ^b	[19,18-25,34]	3,7 ^b	[-4,31-11,73]	68,51 ^c	[56,65-80,65]	90,74 ^d	[76,47-105,37]
	4	45	51,11 ^{bc}	[41,55-60,66]	4,44 ^a	[-5,11-14,01]	71,11 ^d	[61,55-80,66]	77,77 ^f	[65,99-85,11]
Chlor- Delta	1	80	25 ^b	[20,89-29,07]	26,25 ^b	[24,84-27,68]	46,25 ^d	41,64-50,86]	81,25 ^d	[72,79-89,80]
	2	68	58,82 ^c	[53,40-64,26]	8,82 ^a	[8,28-9,40]	70,58 ^d	[66,09-75,15]	82,35 ^d	[76,92-90,67]
	3	67	35,82 ^c	[33,56-38,09]	4,47 ^b	[4,19-4,77]	61,19 ^b	[55,50-66,89]	88,05 ^d	[81,93-94,21]
	4	49	57,14 ^{cd}	[45,17-60,66]	2,04 ^b	[-6,88-11,05]	28,57 ^c	[20,57-36,53]	63,26 ^e	[60,07-66,41]

Bend: Bendiocarb; Delta: Deltaméthrin; α-Cyper: Alpha-cyperméthrin; Féni: Fénitrothion; Chlor- Delta: Chlorpyrifos + Deltaméthrin.

Conf Lim: 95% confidence limits

For a same parameter of the table, values which carry different letters in expositant were significantly different ($p < 0, 05$).

mortality of 72.1% and 77.0 on wild *An. gambiae* (Table 1). Fenitrothion and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture had the highest mortality rates with 81.3% and 85.7%, respectively on wild *An. gambiae* (Table 3) and 52.1% and 53.4% on culicine (Table 2). A higher overall mortality rate was found in the hut treated with bendiocarb (92.8%), the chlorpyrifos-deltamethrin (100%), and fenitrothion (100%) on wild *An. gambiae*. During the second month, the effect of deltamethrin and alphacypermethrin was reduced to 31.6% and 39.3%, respectively. However, the residual effects of carbamates and organophosphates remained high until the third month with mortality rates of 77.8% for bendiocarb, 90.7% for fenitrothion and 88.1% for the mixture chlorpyrifos-deltamethrin. Over the fourth month, the overall mortality with deltamethrin treatment declined to 28.1% while fenitrothion had the highest rate at 77.7%, followed by the chlorpyrifos-deltamethrin mixture, bendiocarb, and alphacypermethrin.

Side effects of the treatment on sleepers

A regular follow up of side effects of the insecticide treatments on sleepers was conducted using a questionnaire. Certain complaints were registered during the first months when the sleepers spent the night in the huts treated with fenitrothion and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture. The effects noted were irritating action to the eyes and nose.

But no negative effects were noted during the fourth month. However, the sleepers noticed that the treatments were reducing the biting nuisance of mosquitoes in the treated huts than in their own homes or the control hut. In response to the question "Would you like to continue the experiment?" all responded "yes."

Discussion

The initial collections before the insecticide treatments in the huts revealed that the huts were not significantly different in their attractiveness. However, huts 2 and 5 collected the fewest mosquitoes. Hut 6 caught the most culicinae and hut 3 caught the most *An. gambiae*. These effects were probably due to the proximity of the huts to the larval sites.

The deterency or reduction of entry rates for both *An. gambiae* and culicinae was the most evident factor observed in huts treated with the pyrethroids, alphacypermethrin and deltamethrin. As for fenitrothion and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture, the reduction was very low and this may probably due to the fact that organophosphates have not repellent action compared with pyrethroids (deltamethrin and alphacypermethrin) [21]. However, the entry rate in the hut treated with bendiocarb was reduced compared to that of organophosphates. Natural exophily (in the control hut) of *An. gambiae* varied throughout the study. The lowest

rate (6.8%) was observed in 3rd month after treatment and the highest rate the following month (42.8%). It is very difficult to explain this variation in behaviour as both rates take place during the same period. These months correspond to the beginning of the dry season and do not seem to result from changes of behaviour in humans or mosquitoes.

The induced exophily (in the treated hut) of wild *An. gambiae* was the highest in huts where walls were treated with alphacypermethrin and deltamethrin as a result of the repellent effect pyrethroids, which was not observed with carbamates and organophosphates. In contrast, the induced exophily on released *An. gambiae* in huts treated with fenitrothion and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture was relatively high. The strong exophily due to the carbamates and organophosphates on these specimens might be explained by the fact that the *An. gambiae* released in the huts had lost their vigour after being reared in the insectary. The effect of the chlorpyrifos-deltamethrin mixture could be explained by a synergy between the two products. Similar results were found when testing combinations of non-pyrethroid insecticides and a repellent (DEET), an organophosphate (chlorpyrifos methyl) and an oxadiazine (Indoxacarb) alone or in combination with pyrethroids on resistant mosquitoes [22-25].

The treatment of the huts with insecticide did not prevent a proportion of mosquitoes from taking a blood meal. This blood meal was facilitated by the fact that the mosquito nets used to protect sleepers were not treated. The fact that deltamethrin, alphacypermethrin, and bendiocarb did not significantly reduce blood feeding compared to the control might be explained by the significant immediate mortality in the other two insecticides during the first month, fenitrothion (91.7%) and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture (95.3%) ($p < 0.05$). In these cases, mosquitoes entering the huts could also have been killed before being able to blood feed.

The mortality of culicinae was only 53.4% with fenitrothion in the first month; this can be explained by the resistance of culicinae, largely *Culex* and *Mansonia* spp. Resistance to organophosphates, carbamates, and pyrethroids has been reported in *Culex quinquefasciatus* in West Africa [9]. Moreover, in Ladj (south of Bénin) high frequencies of resistance to permethrin, DDT and carbosulfan were recorded in *Cx. quinquefasciatus* [26]. However, the *An. gambiae* were strongly affected by fenitrothion, the mixture of chlorpyrifos-deltamethrin, and bendiocarb. The difference between carbamates, organophosphates and pyrethroid insecticides can be explained by the current emergence and widespread resistance of *An. gambiae* s.l. to pyrethroids that we mentioned earlier [10]. Other than the complaints about fenitrothion and the chlorpyrifos-deltamethrin mixture

that caused certain minor problems in the beginning of the first month, there was no other complaints recorded about the pyrethroids or bendiocarb afterwards. These experiences were noted and confirmed by the sleepers. It should be noted that chlorpyrifos is not recommended by the WHO for indoor residual spraying [20].

Conclusion

After four months experiment of indoor residual spraying treatments in experimental huts, fenitrothion, chlorpyrifos-deltamethrin mixture, and bendiocarb were shown to be effective insecticides for controlling pyrethroid-resistant *Anopheles*. They showed to be effective alternatives to pyrethroids for indoor residual spraying. Bendiocarb decayed in less than four months, showing a short-life on cement walls, but still seems a promising insecticide to control resistant vectors. A micro-encapsulation formulation of bendiocarb will make it last longer in treated supports. Reports from Equatorial Guinea, Namibia, Mozambique, Mexico, and India showed good performance of bendiocarb as an indoor residual spraying treatment against mosquito vectors. The mixture of chlorpyrifos and deltamethrin is not yet registered with the WHO and cannot be imported for public health purposes. Fenitrothion was an effective product, but the side effects were not appreciated by the sleepers, however reports on fenitrothion indicated its better personal protection effects than Bendiocarb.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MCA conceived and designed the study, supervised fields and laboratory procedures, data analysis and interpretation, revised the manuscript and gave final approval for the version to be published. **GGP** carried out field experiments, collected, analysed, interpreted data and wrote the first draft of the manuscript. **SI** helped with translation of the manuscript and contributed to the design of the study. **DG** and **AY** contributed to the design of the study and substantially helped in drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to the PMI (President Malaria Initiative) which supported financially this study through USAID and RTI. The authors would like to thank especially Dr Alex Asidi of London School of Hygiene & Tropical Medicine in Cotonou (CREC) for his helpful suggestions and correction made to the manuscript. Many thanks to Djènontin Armel and Azondékon Roseric for their technical assistance.

Author Details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin 06 BP: 2604, ²London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, WC1E 7HT, UK and ³World Health Organization Office, Cotonou, Bénin

Received: 11 December 2009 Accepted: 14 July 2010

Published: 14 July 2010

References

1. de la Santé Ministère: **Annuaire des statistiques sanitaires 2006**. Direction de la Programmation et de la Prospective Cotonou 2007:209.

2. Darriet F: **La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies**. Editions Karthala 1998:111.
3. Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K: **Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire**. *Ann Soc Belge Méd Trop* 1993, **73**:291-294.
4. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Roberts JM, Mount DL, Mwangi RW: **Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya**. *Med Vet Entomol* 1994, **8**:71-75.
5. Diabaté A: **Evaluation de la résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoïdes au Burkina Faso**. Thèse de 3e cycle Université de Ouagadougou 1999:128.
6. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: ***Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa**. *Med Vet Entomol* 2000, **14**:181-189.
7. Fanello C, Petrarca V, Della Torre A, Santolamazza F, Allouche A, Coulibaly M, Dolo G, Curtis C, Touré YT, Coluzzi M: **The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further evidence of reproductive isolation within *An.gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2003, **12**:241-245.
8. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: **Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon**. *J Med Entomol* 2003, **40**:491-497.
9. Chandre F: **Résistance d'*Anopheles gambiae* Giles et de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles**. Thèse de Doctorat. Université de Paris XIIE; 1998:112.
10. Akogbéto M, et Yakoubou S: **Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest**. *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **2**:123-130.
11. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbéto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P: **Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l.** *Bull World Health Organ* 1999, **77**:230-234.
12. N'guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin**. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:199-206.
13. Zaim M, Guillet P: **Alternative insecticides: an urgent need**. *Trends Parasitol* 2002, **18**:161-163.
14. Kolaczinski JH, Fanello C, Hervé JP, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CP: **Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance**. *Bull Entomol Res* 2000, **90**:125-132.
15. Carnevale P, Mouchet J: **Vector control and malaria control**. *Med Trop* 1990, **50**:391-398.
16. Yadouleton AWM, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbéto CM: **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.
17. World Health Organization: **Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets**. :60. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3
18. Wharton RH: **The behaviour and mortality of *Anopheles maculatus* and *Culex fatigans* in experimental huts treated with DDT and BHC**. *Bull Entomol Res* 1951, **42**:1-20.
19. Najera JA, Zaim M: **Lutte contre les vecteurs du paludisme. Critères et procédures de prise de décision pour une utilisation raisonnée des insecticides**. OMS Genève; 2004.
20. Coluzzi M: **Morphological divergences in the *Anopheles gambiae* complex**. *Riv Malariologia* 1964, **43**:197-232.
21. Darriet F: **Evaluation sur le terrain de l'efficacité de trois pyrèthrinoïdes dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme**. *Parassitologia* 1991, **33**:111-119.
22. N'guessan R, Corbel V, Bonnet J, Yates A, Asidi A, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Rowland M: **Evaluation of Indoxacarb, an Oxadiazine insecticide for the control of Pyrethroid-Resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae)**. *J Med Entomol* 2007, **44**:270-276.
23. Pennetier C: **Interactions entre insecticides non pyrèthrinoïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae*: mécanismes,**

efficacité et impact sur la sélection de la résistance. Thèse Doctorat de l'Université de Montpellier; 2008.

24. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM: **Combining a non-pyrethrinoid insecticide and a repellent: a new approach for controlling Kdr resistant mosquitoes.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:739-744.
25. Asidi AN, N'guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, Corbel V, Darriet F, Zaim M, Rowland MW: **Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes.** *Malar J* 2005, **4**:25.
26. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.

doi: 10.1186/1475-2875-9-204

Cite this article as: Akogbéto *et al.*, Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa *Malaria Journal* 2010, **9**:204

**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

The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin

Anges Yadouléton^{1*}, Raphael N'Guessan^{1,2}, Hyacinthe Allagbé³, Alex Asidi¹, Michel Boko³, Razack Osse¹, Gil Padonou¹, Gazard Kindé⁴, Martin Akogbéto¹

Abstract

Background: Urban agricultural practices are expanding in several cities of the Republic of Benin. This study aims to assess the impact of such practices on transmission of the malaria parasite in major cities of Benin.

Method: A cross sectional entomological study was carried out from January to December 2009 in two vegetable farming sites in southern Benin (Houeyiho and Acron) and one in the northern area (Azèrèkè). The study was based on sampling of mosquitoes by Human Landing Catches (HLC) in households close to the vegetable farms and in others located far from the farms.

Results: During the year of study, 71,678 female mosquitoes were caught by HLC of which 25% (17,920/71,678) were *Anopheles* species. In the areas surveyed, the main malaria parasite, *Plasmodium falciparum* was transmitted in the south by *Anopheles gambiae* s.s. Transmission was high during the two rainy seasons (April to July and October to November) but declined in the two dry seasons (December to March and August to September). In the north, transmission occurred from June to October during the rainy season and was vehicled by two members of the *An. gambiae* complex: *Anopheles gambiae* s.s. (98%) and *Anopheles arabiensis* (2%).

At Houeyiho, Acron and Azèrèkè, the Entomological Inoculation Rates (EIRs) and the Human Biting Rates (HBRs) were significantly higher during the dry season in Households Close to Vegetable Farms (HCVF) than in those located far from the vegetable areas (HFVF) ($p < 0.05$). However, there were no significant differences in HBRs or EIRs between HCVF and HFVF during the rainy seasons at these sites ($p > 0.05$).

The knock-down resistance (*kdr*) mutation was the main resistance mechanism detected at high frequency (0.86 to 0.91) in *An. gambiae* s.l. at all sites. The *ace-1^R* mutation was also found but at a very low frequency (< 0.1).

Conclusion: These findings showed that communities living close to vegetable farms are permanently exposed to malaria throughout the year, whereas the risk in those living far from such agricultural practices is limited and only critical during the rainy seasons. Measures must be taken by African governments to create awareness among farmers and ultimately decentralize farming activities from urban to rural areas where human-vector contact is limited.

Introduction

The geographical distribution of malaria so far described in sub-Saharan Africa is diverse. This ranged from savannah malaria, forest, highland, urban and hydro-agricultural malaria [1]. Currently, the need to

investigate urban malaria has become urgent due to the resurgence of the disease and the agro-economical interest by populations in developing subsistence activities in urban and suburban areas of major cities in sub-Saharan Africa [2-6]. In recent studies by Robert *et al.* [3] and Warren *et al.* [7] it was shown that urbanization decreases malaria prevalence as a results of a drastic reduction in *Anopheles* breeding sites better access to treatment and improved (mosquito-proof) housing

* Correspondence: anges33@yahoo.fr

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, République du Bénin, Tél. (+229) 21330825

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

measures (overview in [8]). It is therefore important to emphasize the role played by urbanization in reducing malaria transmission by twofold [9]. Furthermore, agricultural activities play an important role in malaria transmission in both urban and peri-urban zones [6]. Indeed, poverty, food insecurity and malnutrition have become urban issues in sub-Saharan Africa. While meeting these challenges in cities of sub-Saharan Africa is critical, it represents a serious issue of public health [10]. Agro-economic practices involving vegetable farming is now common in many urban areas and this provides suitable breeding sites for mosquitoes with potentially higher epidemiological risk of malaria in urban than rural areas.

The general trend in practice now is that, usually non-used spaces (marshland, road edges, beaches etc) are increasingly transformed into vegetable farms comprising different kinds of crops. In Cotonou the capital city of Benin, peri-urban agriculture consists of belts of vegetable farming surrounding the city.

The advantages of urban agriculture are considerable. They contribute to improve the living conditions of citizen by supplying food, income and employment [11].

However, the economic and social value of urban and peri-urban agriculture is hindered by a number of factors including the proliferation of mosquito breeding sites. Many studies have reported the relationship between malaria and rice production, but little is known about the link between malaria transmission and urban agriculture. A recent study conducted by Robert *et al.* [8] has shown that vegetable farming in urban areas of Dakar, (Senegal) might not be the suitable breeding sites for larval development.

However, Matthys *et al.* [12] found that peri-urban agriculture created more breeding sites for *Anopheles* and therefore increased malaria risk in the city. An entomological study conducted in Ghana showed higher *Anopheles* biting rates in urban areas with agriculture compared to urban areas without such practice [13]. Another study in Kenya found no association between urban farming at household level and vector breeding sites [14].

In Benin, there are few data available that investigate the association between malaria transmission and urban vegetable farming.

The present study was conducted in three major sites of urban farming in Benin with the aim of investigating the entomological aspects of malaria transmission in relation to seasonal variations of vector populations in these areas of Benin.

Specifically, the study aimed to determine (a) the distribution of *Anopheles* mosquito species throughout the year at these sites, (b) their human biting pattern, (c) the infectivity rates of malaria vectors and (d) the

entomological inoculation rates and malaria transmission in the three study areas.

Methods

Study area

The study was conducted in Benin, from January 2009 to December 2009 in three vegetable farms (Figure 1):

(i) Houeyiho in Cotonou, (economic capital city of Benin). The vegetable farm is located at 6°45'N and 2°31'E in a highly populated zone. The farm is 14-hectares in size and shared between five local cooperatives of approximately 2,000 farmers.

(ii) Acron in Porto-Novo, (administrative capital city of Benin)

The vegetable farm is at 6°30'N and 2°47'E, at the outskirts of Porto-Novo and has the longest history of vegetable farming in the region. Initially it consisted of three hectares but has recently expanded up to 20 hectares. The number of farmers has also increased to about 150 individuals.

(iii) Azèrèkè, Parakou. This farm is located at 9°22'N and 2°40'E at the vicinity of Parakou city, known as the Azèrèkè site. The size of this vegetable plantation is 10 hectares.

Agricultural practices in those farms create numerous trenches that retain rain and water from irrigation systems. These stagnant waters provide suitable breeding sites for mosquitoes, particularly *Anopheles gambiae*, the main malaria vector in the areas.

Field mosquito collection

Indoor collections of adult mosquitoes were carried out monthly from January to December 2009. Collections were organized in Households Close to Vegetable Farms (HCVF) and in others Far from the Farms (HFVF) where there is no agricultural practice.

Adult mosquitoes were collected using two sampling methods:

(1) Indoor and outdoor Human Landing Catches (HLC) performed monthly over two consecutive nights (8:00 PM to 6:00 AM), in 4 randomly selected compounds;

(2) Indoor Pyrethrum Spray Catches (PSC) in 4 other selected compounds; the same compounds in each sampling method being consistently used throughout the study. Collectors gave prior informed consent and received anti-malaria prophylaxis and yellow fever immunization. They were organized in teams of two for each collection point and they rotated between location within houses every two hours. Mosquitoes from HLC were used to evaluate the sporozoite infection rate of each molecular form. Knocked down mosquitoes falling on white bed sheets were preserved for identification at molecular level using PCR analysis for their resistance

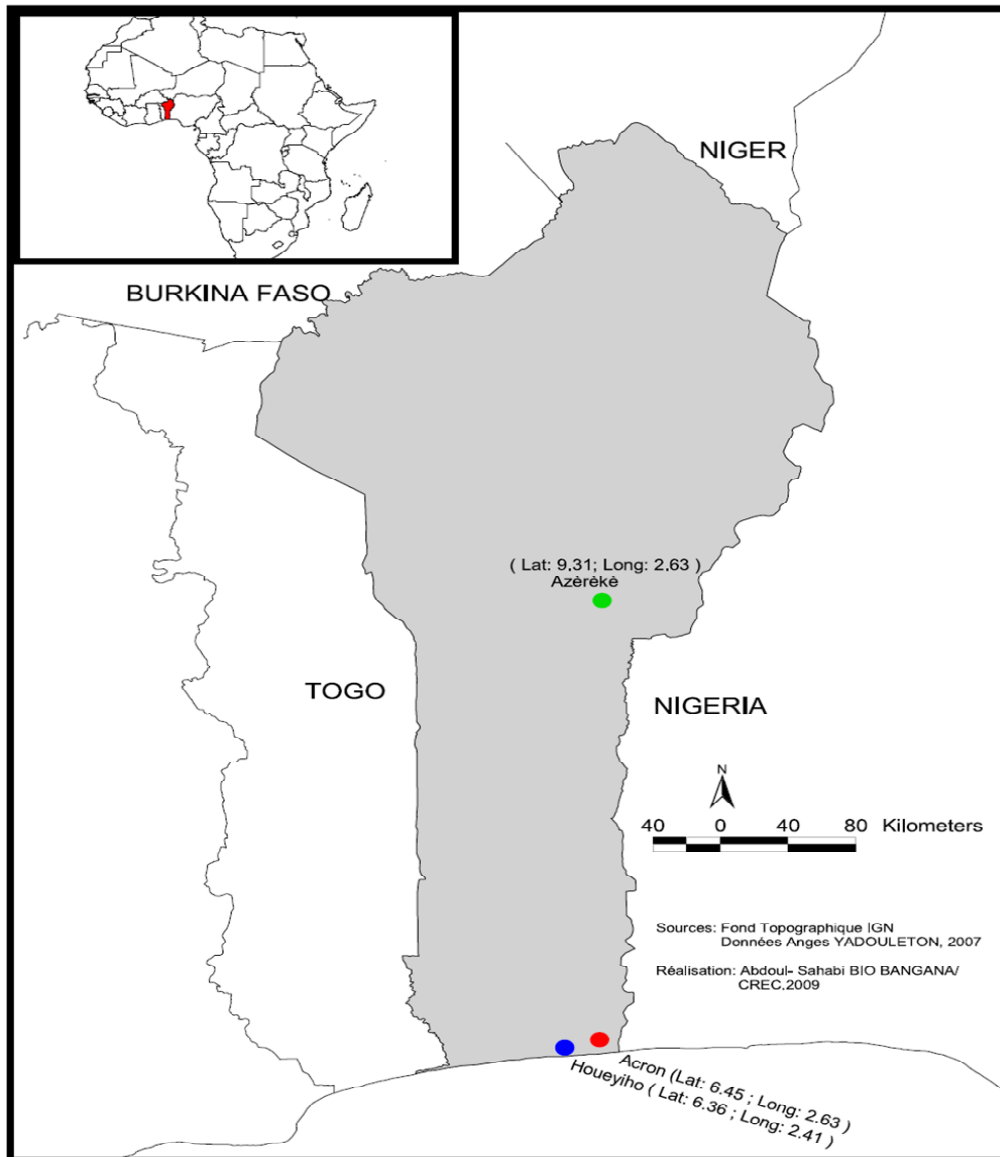


Figure 1 Map of Benin showing the three study sites.

status as described by Martinez-Torres *et al.* [15]. The PSC were carried out monthly from December to January and used to establish the temporal dynamics of mosquito density and the molecular forms of *An. gambiae*.

All mosquitoes were kept separately in labelled tubes containing silica gel and frozen at -20°C for further laboratory analysis.

Laboratory processing of mosquitoes

Based on morphological characters using standard identification keys [16], all female mosquitoes referring to *An. gambiae* complex were identified. The head-thoraces of these females from the human landing catches were tested for the presence of CircumSporozoite Protein (CSP)

of *P. falciparum* using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as per Wirtz *et al.* [17]. Identification of species and characterization of molecular forms within the *An. gambiae* complex were performed using PCR-RFLP [18].

Entomological parameters

The entomological indicators of malaria parasite transmission intensity at the sites were:

(1) the human biting rate (HBR), which is the number of mosquitoes biting a person during a given time period (bites/p/t) (time being night, month or year);

(2) the CSP rate is the proportion of mosquitoes found with *Plasmodium falciparum* CSP over the total number of mosquitoes tested:

(3) the Entomological Inoculation Rate (EIR), expressed as the number of infective bites of anopheline per person per unit of time (bi/p/t) and calculated as the product of the HBR by the CSP rate.

Data analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the entomological estimates (HBRs, EIRs) between the seasons at the sites in the North and south Benin.

The resistance allele frequency at the *kdr* and *Ace-1* locus was calculated using Genepop software (version 3.3) as described by Raymond and Rousset [19].

Ethical considerations

Ethical approval for this study was granted by the Ethical Committee of the Ministry of Health in Benin. Verbal consent was asked to the head of each household for the spray catches and consent of collectors was obtained prior to HLC. In case of refusal, permission was sought from the next household.

Results

Mosquito fauna composition

A total number of 71,678 mosquitoes were collected from HLC and 29,295 from PSC at the three study sites (Table 1). The majority was *Culex spp* (74%). Of the remaining 26%, 97% were *Anopheles gambiae s.l.* and 3% were *An. pharoensis*, *Anopheles ziemanni*, and *An. funestus* all together.

Dynamic of the molecular forms

PCR species from *An. gambiae s.l.* collected revealed the presence of two members of *An. gambiae s.l.* at Azèrèkè: *An. gambiae s.s.*, and *An. arabiensis* (Table 2). At Houeyiho and Acron, the entire mosquito population was *An. gambiae s.s.* of the M molecular form throughout the year. However, at Azèrèkè, *An. gambiae s.s.* predominates at 85%. Despite the presence of both *An. gambiae* and *An. arabiensis* identified at Azèrèkè, the

PCR analysis revealed two molecular forms in *An. gambiae s.s.* only, with proportions of 65% for the M and 35% for the S form.

Seasonal abundance and biting rates

The Annual Human Biting Rate (HBR) was estimated from the Human Landing Catches (HLC). The highest bites of *An. gambiae s.l.* during the rainy seasons was found in July (80 bites/p/n) in southern Benin and September (100 bites/p/n) in the northern part of the country as well (Figure 2).

The results from this study showed that the average HBR of *An. gambiae s.l.* was 10.95 bites/p/n at Houeyiho; 7.84 bites/p/n at Acron and 3.04 bites/p/n at Azèrèkè during the dry season in HCVF. These bites from HCVF were significantly higher than in HFVF at Houeyiho (2.70 bites/p/n), Acron (2.85 bites/p/n) and Azèrèkè (1.41 bites/p/n) ($P < 0.05$).

The human population living in HCVF received about one to five times higher bites of *An. gambiae s.l.* than those who lived in HFVF. However, there was no significant difference between the HBRs during the rainy season in HCVF and HFVF at Houeyiho, Acron and Azèrèkè ($P > 0.05$ for the three sites). The average annual HBR from January through December was significantly higher in HCVF than that from HFVF at the three sites ($P < 0.05$) (Table 3).

Sporozoite rate and EIR

A low percentage of *Anopheles* caught from the HLC (1.6%) was circumsporozoite protein positive at the three study sites. The main malaria parasite was *P. falciparum* transmitted by *Anopheles gambiae s.l.* in the southern sites surveyed. Transmission at these sites was high during the two rainy seasons (April to July and October to November) and low during the two dry seasons (December to March and August to September) (Figure 2). In the north of the country, transmission occurred during the rainy season (June to October), with at least two members of *An. gambiae s.l.*: *An. arabiensis* (15%) and *An. gambiae s.s.* (85%) transmitting *P. falciparum*.

The EIRs were significantly higher in the dry season in HCVF at Houeyiho (0.28 bi/p/n), Acron (0.23 bi/p/n) and at Azèrèkè (0.15 bi/p/n) than in HFVF at the same sites Houeyiho (0.041 bi/p/n); Acron (0.01 bi/p/n) and Azèrèkè (0.031 bi/p/n) ($P < 0.05$).

The trend in average annual EIRs at the three sites was similar to that observed in the dry season, with significantly higher EIR in HCVF than in HFVF at the three sites ($P < 0.05$) (Table 4). However, during the rainy season, there was no significant difference between the EIRs from HCVF and HFVF ($P > 0.05$ for the three sites).

Distribution of the *kdr* and *ace-1R* mutations

An average of 30 mosquitoes from indoor resting fauna were analysed every month for the Leu-Phe *kdr* and

Table 1 Mosquitoes collected by human landing catches (HLC) and pyrethrum spray catches (PSC) at the study sites.

Species	Houeyiho		Acron		Azèrèké	
	HLC	PSC	HLC	PSC	HLC	PSC
Total mosquitoes caught	28,654	9,879	25,852	10,495	17,172	8,921
Total <i>Culex</i> Spp	20,7	8,6	19	9,1	13,2	7,4
Total <i>Anopheles</i> Spp	7,8	1,3	6,7	1,2	3,8	1,4
<i>An. gambiae s.l.</i>	7,6	1,2	6,5	1,1	3,8	1,2
<i>An. pharoensis</i>	60	23	38	18	12	29
<i>An. ziemanni</i>	158	45	112	76	45	28
<i>An. funestus</i>	2	0	5	1	0	0
Total <i>Aedes</i> spp	130	34	138	61	94	78
Total <i>Mansonia</i> spp	23	20	54	56	15	22

Table 2 Summary results of PCR analysis of *An. gambiae* s.l. collected at the study sites.

	PCR form			PCR Species		
	Total tested	%S	%M	% <i>An. gambiae</i>	% <i>An. melas</i>	% <i>An. arabiensis</i>
Houeyiho	360	-	100	100	-	-
Acron	360	-	100	100	-	-
Azèrèkè	360	65	35	85	-	15

- = Not found

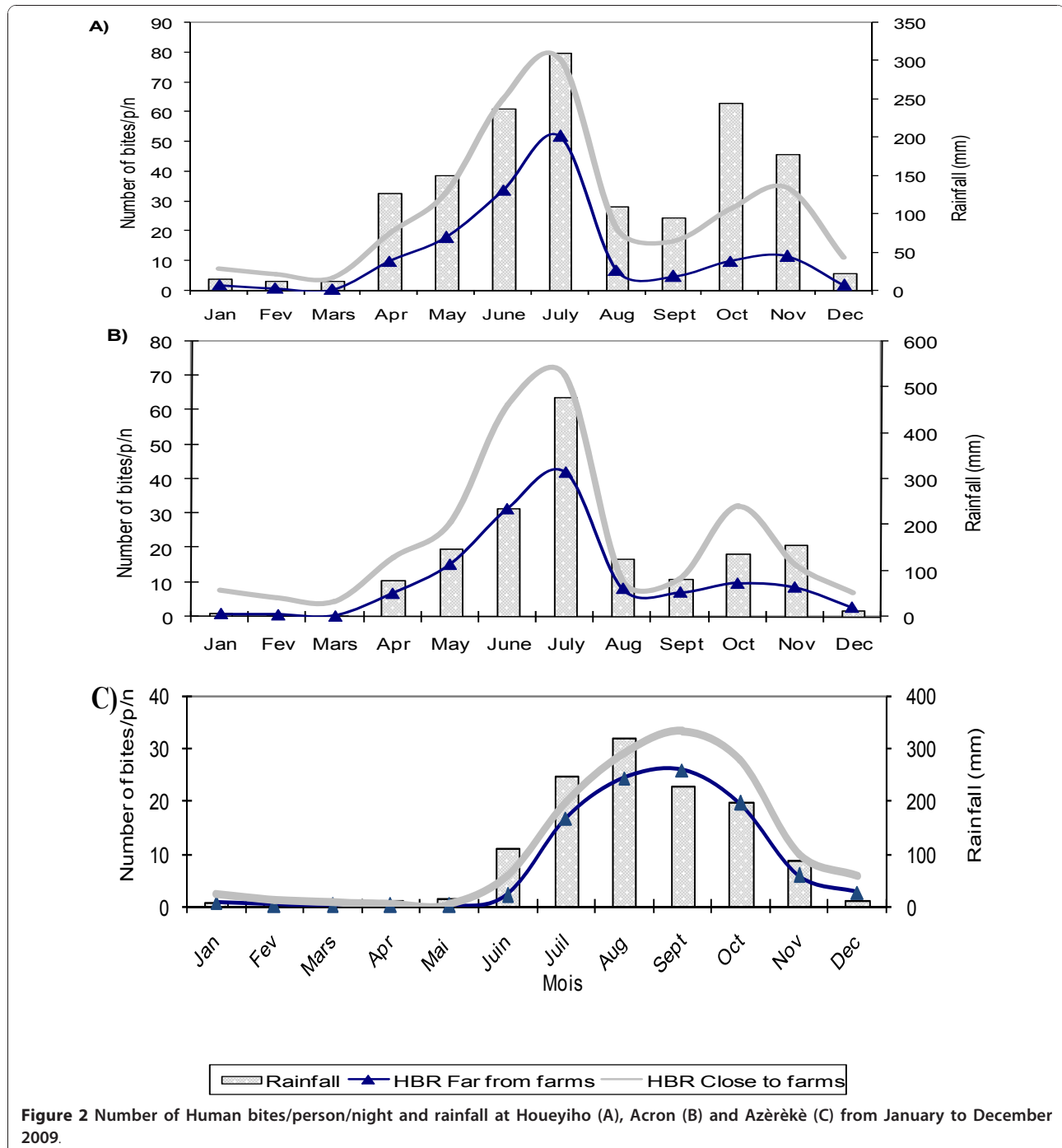


Table 3 Mean number of *An. gambiae* s.l. bites per person per night (Mean bi/p/n) during the seasons and annually, as determined by human landing Catches (HLC) at the study sites

	Houeyiho			Acron			Azèrèkè		
	Dry season	Rainy season	annual	Dry season	Rainy season	annual	Dry season	Rainy season	annual
Mean bites/p/n*	10.95	42.73	9,798	7.84	37.34	8,224	3.04	23.14	6,1671
Mean bites/p/n**	2.70	22.42	4,563	2.85	19.01	4,601	1.41	17.75	3,000
P value	0.015	0.115	0.091	0.033	0.137	0.024	0.033	0.428	0.025

* = close to farms

** = far from farms

ace-1^R mutations (Table 5). In southern Benin, the *kdr* mutation was found in all M form of *An. gambiae*, with a frequency of 0.89 at Acron and 0.91 at Houeyiho.

At Azèrèkè, in the north, *Kdr* occurred both in the M and S forms but at a higher frequency in S (75%) than M form (25%) ($P < 0.05$).

The *ace-1^R* mutation was also found at all sites surveyed but at a very low frequency. It was 0.02 at Houeyiho, 0.01 at Acron and 0.04 at Azèrèkè (Table 5).

Discussion

The findings from the present study showed a clear evidence of the dynamics of malaria transmission in urban or sub-urban areas of Benin where vegetable farming activities have grown extensively.

The abundance and fluctuations in larval and adult densities of samples collected were inherent to the environmental and ecological characteristics related to each site assessed [20].

Indeed, the diversity of anopheline species found in this study either in the south or northern part of Benin showed that apart from *Anopheles gambiae* s.s., the major vector of malaria parasites in West Africa, *An. arabiensis* should also be considered as a secondary transmitter in northern Benin though at a lesser extent. Yadouleton et al. [10] reported the presence of *An. arabiensis* in the Northern part of Benin at low frequency. Furthermore, within the *An. gambiae* complex, the S form was only found at the Azèrèkè site in the North (Sudano-guinean ecotype) while the M form was identified at Houeyiho and Acron in the coastal area of Cotonou (guinean ecotype) and the northern sub-urban areas. Corbel et al. [21] in Benin and Awolola et al. [22] in Nigeria reported that the geographical distribution

correlated with the ecological or climatic factors as the M form is more adapted to the dry environment and breeds along irrigated fields than the S form which is commonly found in humid forest areas and temporary pools. The predominance of *An. gambiae* s.l. in the study area is consistent with its distribution throughout Africa.

The presence of higher biting rates (Figure 2) and sporozoite infective *Anopheles* (Table 4) in households close to vegetable farms than in those on the far side of the farms have shown that malaria parasite transmission was permanent during the year and was reinforced by the presence of breeding sites in urban vegetable farming. In fact, results from this study showed that in the three study sites, people who lived nearby the vegetable farms received during the dry season one to five times more bites than those who lived farther, but during the rainy season, there was no significant difference between HCVF and HFVF. The increased number of biting (HBR) and EIR recorded during the dry seasons in houses close to the vegetable farms compared to those far from the farms could be explained by the presence of permanent pools and puddles maintained during watering of vegetable crops.

These findings showed that communities living close to vegetable farms are permanently exposed to malaria throughout the year whereas the risk in those living far from such agricultural practices is limited and only critical during the rainy seasons.

The main mechanism conferring resistance in *An. gambiae* to pyrethroids (*Leu-Phe kdr* mutation) in West Africa was found in mosquito samples collected in different sites.

The allelic frequency of this mutation among populations collected near or far from the vegetable farms was

Table 4 Entomological Inoculation rates (EIR) recorded at the study sites

	Houeyiho			Acron			Azèrèkè		
	Dry season	Rainy season	annual	Dry season	Rainy season	annual	Dry season	Rainy season	annual
EIR (bi/p/n)*	0.28	0.33	169.18	0.23	0.38	112.16	0.15	0.36	95.52
EIR (bi/p/n)**	0.041	0,194	64.64	0.01	0.25	65.39	0.031	0.19	39.92
P value	0.000	0.093	0.038	0.033	0.137	0.024	0.033	0.428	0.025

* = number of infective bites per person per night in households close to farms

** = number of infective bites per person per night in households far from farms

Table 5 PCR analysis of the *kdr* and *ace-1* allelic frequency in *An. gambiae* s.l. collected at the study sites

	Total tested	<i>kdr</i>				<i>ace-1</i>			
		RR	RS	SS	frequency	RR	RS	SS	frequency
Houeyiho	360	305	48	7	0.91	0	2	0	0.002
Acron	360	298	45	17	0.89	0	1	0	0.001
Azèrèkè	360	285	53	22	0.86	0	3	0	0.004

high (> 0.90). This could be the direct consequence of the extensive use of pesticides for cotton crop protection in the south and northern Benin [23,24] or the use of the same pesticides by local farmers against vegetable pests [10]. The gene frequency being already too high in both situations, it appeared difficult to separate the effect of the local farming practices from that of the old history of cotton production and pesticides on resistance selection in the areas surveyed. Distinguishing the impact of the two agricultural practices will require sampling and testing of mosquitoes in areas where *kdr* is still on its moderate form in Western Africa.

Acknowledgements

This work was supported by the ADDRF and WHO through its TDR/RCS re-entry grant. We are grateful to villagers of Houeyiho, Acron and Azèrèkè assisted in the implementation this study.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, République du Bénin, Tél. (+229) 21330825. ²London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, WC1E 7HT, London, UK. ³Université d'Abomey-calavi, Department of Geography, Cotonou, République du Bénin. ⁴Faculté des Sciences de la Santé, Université Nationale du Bénin, République du Bénin.

Authors' contributions

AY carried out field experiments, collected, analysed, interpreted data and wrote the manuscript. NR and AA contributed to the design of the study and revised the manuscript for intellectual content, BM, KD contributed to the design of the study. GP and RO and HA helped with the field activities. MA conceived, designed the study, and revised the manuscript for intellectual content.

All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 September 2010 Accepted: 12 December 2010

Published: 12 December 2010

References

- Henry MC, Roger C, Nzeyimana I, Assi SB, Dossou-Yovo J, Audilbert M, Mathonnat J, Keundjian A, Akodo E, Teuscher T, Carneval P: **Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in savannah of Côte-d'Ivoire.** *Trop Med Int Health* 2003, **8**:449-458.
- Keiser J, Utzinger J, De Castro MC, Smith TA, Tanner M, Singer BH: **Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**:118-127.
- Robert V, MacIntyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC: **Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:169-176.

- Hay S, Guerra C, Tatem A, Atkinson P, Snow R: **Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:81-90.
- Omumbo JA, Guerra CA, Hay SI, Snow RW: **The influence of urbanisation on measures of Plasmodium falciparum infection prevalence in East Africa.** *Acta Trop* 2005, **93**:11-21.
- Donnelly MJ, McCall PJ, Lengeler C, Bates I, D'Alessandro U, Barnish G, Konradsen F, Klinkenberg E, Townson H, Trape JF, Hastings IM, Mutero C: **Malaria and urbanization in sub-Saharan Africa.** *Malar J* 2005, **4**:12.
- Warren M, Billig P, Bendamane DB, Wijetaratne P: **Malaria in urban and peri-urban areas in sub-Saharan Africa.** *EHP activity report* 1999, **71**.
- Robert V, Awono-Ambene HP, Thioulouse J: **Ecology of larval mosquitoes, with special reference to Anopheles arabiensis (Diptera: Culicidae) in market-garden wells in urban Dakar, Senegal.** *J Med Entomol* 1998, **35**:948-955.
- Phillips DR: **Urbanization and human health.** *Parasitology* 1993, **106**: S93-S107.
- Yadouléon AW, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of Anopheles gambiae in urban areas of Benin.** *Malar J* 2009, **8**:103.
- PADAP: **Programme d'Appui au Développement Agricole Périurbain du Sud Bénin. Rapport de l'étude Diagnostic: demande, offre et marchés et système de production. Tome 2, Agrisud International** 2003, 148.
- Matthys B, Vounatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EGG, Gosoni L, Cisse G, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J: **Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote-D'Ivoire.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:1223-123.
- Eveline Klinkenberg, PJ McCall, Wilson DMichael, Amerasinghe PFelix, Donnelly JMartin: **Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana.** *Malar J* 2008, **7**:151.
- Keating J, Macintyre K, Mbogo C, Githeko A, Regens J, Swalm C, Ndenga B, Steiberg L, Kibe L, Githure J, Beier J: **A geographic sampling strategy for studying relationships between human activity and malaria vectors in urban Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:357-365.
- 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**:179-184.
- Gillies MT, De Meillon B: **The Anophelinae of Africa South of the Sahara.** *South Africa Institute of Medical Research Johannesburg, South Africa* 1968.
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG: **Comparative testing of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum sporozoites for ELISA development.** *Bull World Health Organ* 1987, **65**:39-45.
- Favia G, Della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti, Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: **Molecular identification of sympatric chromosomal forms of Anopheles gambiae and further evidence of their reproductive isolation.** *Insect Mol Biol* 1997, **6**:377-383.
- Raymond M, Rousset F: **Genepop (version 1.2), a population genetics software exact tests and ecumenicism.** *J. Heredity* 1995, **86**:248-249.
- Dossou-yovo J, Doannio JMC, Diarrassouba S, Chauvancy G: **Impact d'aménagement des rizières dans la ville de Bouaké, Côte-d'Ivoire.** *Bull Soc Path Exot* 1998, **91**:327-333.
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus from Benin, West Africa.** *Acta Trop* 2007, **101**(3):207-216.
- Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M: **Resistance of the malaria vector Anopheles gambiae s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:849-852.
- Yadouléon W, Anges, Padonou Gil, Asidi Alex, Moiroux Nicolas, Banganna Sahabi, Corbel Vincent, N'guessan Raphael, Gbenou Dina, Yacoubou Imorou, Gazard Kinde, Akogbeto CMartin: **Insecticide resistance status in Anopheles gambiae in southern Benin.** *Malar J* 2010, **9**:83.
- Akogbeto M, Djouaka R, Noukpo H: **Use of agricultural insecticides in Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**:400-405.

doi:10.1186/1756-3305-3-118

Cite this article as: Yadouléon *et al.*: The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin. *Parasites & Vectors* 2010 **3**:118.

RESEARCH

Open Access

Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin

Anges Yadouleton^{1*}, Thibaud Martin², Gil Padonou¹, Fabrice Chandre³, Alex Asidi¹, Luc Djogbenou⁴, Roch Dabiré⁵, Rock Aïkpon¹, Michel Boko⁶, Isabelle Glitho⁷ and Martin Akogbeto¹

Abstract

Background: Pyrethroid insecticides, carbamate and organophosphate are the classes of insecticides commonly used in agriculture for crop protection in Benin. Pyrethroids remain the only class of insecticides recommended by the WHO for impregnation of bed nets. Unfortunately, the high level of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l., threatens to undermine the success of pyrethroid treated nets. This study focuses on the investigation of agricultural practices in cotton growing areas, and their direct impact on larval populations of *An. gambiae* in surrounding breeding sites.

Methods: The protocol was based on the collection of agro-sociological data where farmers were subjected to semi-structured questionnaires based on the strategies used for crop protection. This was complemented by bioassay tests to assess the susceptibility of malaria vectors to various insecticides. Molecular analysis was performed to characterize the resistance genes and the molecular forms of *An. gambiae*. Insecticide residues in soil samples from breeding sites were investigated to determine major factors that can inhibit the normal growth of mosquito larvae by exposing susceptible and resistant laboratory strains.

Results: There is a common use by local farmers of mineral fertilizer NPK at 200 kg/ha and urea at 50 kg/hectare following insecticide treatments in both the Calendar Control Program (CCP) and the Targeted Intermittent Control Program (TICP). By contrast, no chemicals are involved in Biological Program (BP) where farmers use organic and natural fertilizers which include animal excreta.

Susceptibility test results confirmed a high resistance to DDT. Mean mortality of *An. gambiae* collected from the farms practicing CCP, TICP and BP methods were 33%, 42% and 65% respectively. *An. gambiae* populations from areas using the CCP and TICP programs showed resistance to permethrin with mortality of 50% and 58% respectively. By contrast, bioassay test results of *An. gambiae* from BP areas gave a high level of susceptibility to permethrin with an average mortality of 94%.

Molecular analysis identified *An. gambiae* s.s., and *An. arabiensis* with a high predominance of *An. gambiae* s.s (90%). The two molecular forms, M and S, were also determined with a high frequency of the S form (96%).

The *Kdr* gene seemed the main target-site resistance mechanism detected in CCP, TICP, and BP areas at the rates ranging from 32 to 78%. The frequency of *ace-1R* gene was very low (< 0.1).

The presence of inhibiting factors in soil samples under insecticide treatments were found and affected negatively in delaying the development of *An. gambiae* larval populations.

Conclusions: This research shows that *Kdr* has spread widely in *An. gambiae*, mainly in CCP and TICP areas where pyrethroids are extensively used. To reduce the negative impact of pesticides use in cotton crop protection, the application of BP-like programs, which do not appear to select for vector resistance would be useful. These results

* Correspondence: anges33@yahoo.fr

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

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

could serve as scientific evidence of the spread of resistance due to a massive agricultural use of insecticides and contribute to the management of pesticides usage on cotton crops hence reducing the selection pressure of insecticides on *An. gambiae* populations.

Background

Malaria remains a major public health problem in Africa. It is reported to be the most significant cause of morbidity and mortality, resulting in a critical loss of working days [1].

More than 2 billion people in the world are at risk of contracting malaria and one million deaths are recorded yearly of which 90% occur in Sub-Saharan Africa [1]. In Benin, malaria is still the most important disease leading to 67% consultations in local health centres [2]. The strategy of the National Malaria Control Programme (NMCP) is based on effective case management and vector control with Insecticide-Treated Nets (ITN) and Indoor Residual Spraying (IRS). The development of new insecticides for public health use is limited and requires enormous capital and time, making industry reluctant to embark on such ventures. Novel compounds or alternatives are to be sought in the agricultural pesticide pipeline. Several reports have recently shown evidence that the main African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.l., has developed a high level of resistance to pyrethroid insecticides as well as to other classes of public health insecticides. While resistance is now spreading throughout Sub-Saharan Africa, reports from Benin and the West African region indicated the highest recorded frequencies of the resistance genes [3-6].

The development of pyrethroid resistance in the primary malaria vectors, *An. gambiae* s.l. and *An. funestus* [7] is a serious concern. In the last decade, the emergence of resistance in populations of *An. gambiae* to common classes of insecticides used in public health has been reported in many African countries including Kenya [8], Côte d'Ivoire [9], Benin [10-14], Niger [15], Burkina Faso [16,17], Mali [18], Nigeria [19], South Africa [20], and Cameroun [21]. In the 1960s, the role of selective treatment with organochlorines (OC) in agriculture on resistance of *An. gambiae* was observed in Mali [22]. Evidence of an association between agricultural use of insecticides and the emergence of resistance in malaria vectors has been repeatedly reported. In Côte d'Ivoire and Burkina Faso, N'Guessan *et al.* [23] reported that the level of vector resistance to pyrethroid insecticides increased during the cotton growing season. Higher frequencies of *kdr* alleles were observed in the more intensely farmed cotton production areas of Côte d'Ivoire [9]. In Burkina-Faso, a survey of *kdr* alleles in *An. gambiae* field populations showed also a higher frequency of *kdr* alleles in older cotton areas with a decreasing gradient to non treated areas [17].

Cotton crop protection represents 90% of the insecticide use in West Africa. The control strategies implemented against cotton pest especially *Helicoverpa armigera* required a regular repeated applications of insecticides during the cotton plant growing cycle. As recommended by the Institut National des Recherches Agronomiques du Benin (INRAB), six consecutive treatments are applied at two weeks interval to protect the crop against bollworms, leafworms and sucking pests. These insecticides are essentially composed of pyrethroids (PYs), organophosphates (OPs) which are also the main classes used in public health and a cyclodiene. The majority of cotton farms observed in northern Benin are located in the upland landscape while the lowland covers the major mosquito breeding sites. Thus run-off has been assumed to be the mechanism by which insecticides from agricultural sites reach malaria vector breeding sites, where they exert a huge selection pressure on larval stages of *An. gambiae* s.l. The main malaria vector *An. gambiae* breeds in puddles, stagnant pools and various sites around or within the lowland. During the rainy season, insecticide residues are washed downwards into mosquito breeding sites thus affecting larval population [24]. According to Akogbeto *et al.* [25] in Benin, insecticide treatments against cotton pests are applied twice a month, for a timeframe of three consecutive months (between July and October) each year. These treatment periods coincide with the rainy season and correspond to the period of high mosquito densities. The evidence supports the hypothesis that breeding sites contamination is the result of the coincidence of agricultural pesticide application and seasonal rainfall/runoff.

Alternatively, integrated pest and vector management (IPVM) strategies based on the rational use of chemical protection, has undoubtedly reduced the negative impact of pesticides on humans, and their environment, including the breeding sites of malaria vectors.

This study aimed to assess the impact of control strategies used against cotton pests (relative amount of insecticide) on the frequency and spread of insecticide resistance in *An. gambiae* populations. The study, conducted in northern Benin, compared the BP cotton cultivation sites (absence of pesticides use) with the CCP and TICP cotton cultivation sites where insecticides are extensively used. The study focused on the investigation of agricultural practices using pesticides for the control of cotton pests and their impact on the insecticide

susceptibility of *An. gambiae* populations from surrounding breeding sites.

Methods

Cotton pests control strategies

Three pest management and control strategies are officially recommended in Benin:

(1) The Calendar Control Program (CCP) is based on the conventional treatment which systematically uses the full dosage of insecticides.

(2) The Targeted Intermittent Control Program (TICP) is based on two steps of crop protection [26,27]. The first step is a protection which follows a conventional pesticide application schedule (every 14 days from the appearance of floral organs), but only the half dose of insecticide are usually applied. The second step includes a modification of the first treatment meaning that the half-dose left over during the earlier observation made the day before treatment would suggest that the pest populations exceed the economic thresholds of damage. The program was established five years ago.

(3) In the biological control program (BP), no chemical is used for plant protection. That program started over the past five years.

The area of the farms applying CCP and TICP was about 4 hectares and usually farmers ploughed sometime individually or work in groups of farmers' organizations. However, in BP sites of 1 hectare, farmers worked under the supervision of technicians from the Beninese Organization for Organic Farming Promotion (OBEPAP) who assisted in the implementation and the survey of good agricultural practices on organic cotton. These areas were characterised by a continual production of cotton crop.

Study sites

The study was conducted in the cotton areas around 8 cities in Benin (Figure 1). The choice of these areas took into account the various strategies of pest control. Semi permanent breeding sites were found in cotton fields where farmers used:

- the CCP around Parakou (2°62 E, 9°33 N), Kandi (2°95 E, 11°16 N) and Banikoara (2°59 E, 11°31 N). This pest management program started thirty years ago and was the main strategy against pest control used by more than 95% of the cotton farmers.

- the TICP around N'dali (2°70 E, 9°84 N), Kandi (3°08 E, 11°27 N) and Banikoara (2°41 E, 11°31 N) started five years ago and applied by 4% of cotton farmers.

- the BP around Kandi (2°92 E, 11°09 N) and Banikoara (2°52 E, 11°29 N) started five years ago and practiced by 1% of cotton farmers.

The annual mean rainfall recorded was about 1,300 mm yearly and characterized by a Sudanian climate with one

rainy season (middle of May to October) and one dry season (November-May).

KAP Study on the use of insecticides in cotton farms

To generate adequate information on the use of insecticide on cotton fields, Knowledge Attitude-Practice (KAP) surveys were organized in the study sites. In each site, leaders of farmer's organizations were interviewed using semi-structured questionnaires that focused on the treatment strategies, and the use of insecticides in the farms. Further, qualitative data was collected through direct observations, in-depth interviews and focus group discussions.

Mosquito collections

Mosquito larvae were collected during the rainy season as well as before and during the period of insecticide treatments. The treatment periods started from July to October. During pest control, insecticide residues contaminate mosquito breeding sites whereby they diffuse into the water applying a selection pressure on mosquito larvae. Larvae were collected in the breeding sites of each site and transported to the laboratory of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Benin (CREC) for resistance testing. The adults were tested after emergence. A laboratory susceptible strain of *An. gambiae* Kisumu was used as a reference strain to compare the susceptibility levels of the field populations.

Insecticide susceptibility tests

Mosquitoes collected were assayed using WHO discriminating dosages of four insecticides: permethrin (0.75%), DDT (4%), deltamethrin (0.05%) and bendiocarb (0.1%). Four batches of 25 unfed females, aged 2-5 days, were exposed to the diagnostic doses of insecticide treated papers for 1 hour. The twenty five females of *An. gambiae* were introduced into each tube and monitored at different time intervals (10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) the number "knocked-down" recorded. After one hour exposure, mosquitoes were transferred into holding tubes and provided with cotton wools wet with a 10% honey solution. Mortalities were recorded after 24 hours and the susceptibility status of the population was graded according to the WHO protocol [28]. Dead and surviving mosquitoes from this bioassay were separately kept in Carnoy solution at -20°C for further molecular analysis.

Molecular characterization

All *An. gambiae* s.l. were identified to species using PCR [29] and as M and S forms by PCR-RFLP [30]. To detect the presence of *Kdr* mutation in the samples collected from each study site, polymerase chain reaction diagnostic test for detection of *kdr* "Leu-phe" genes was carried out on *An. gambiae* mosquitoes from each study site as

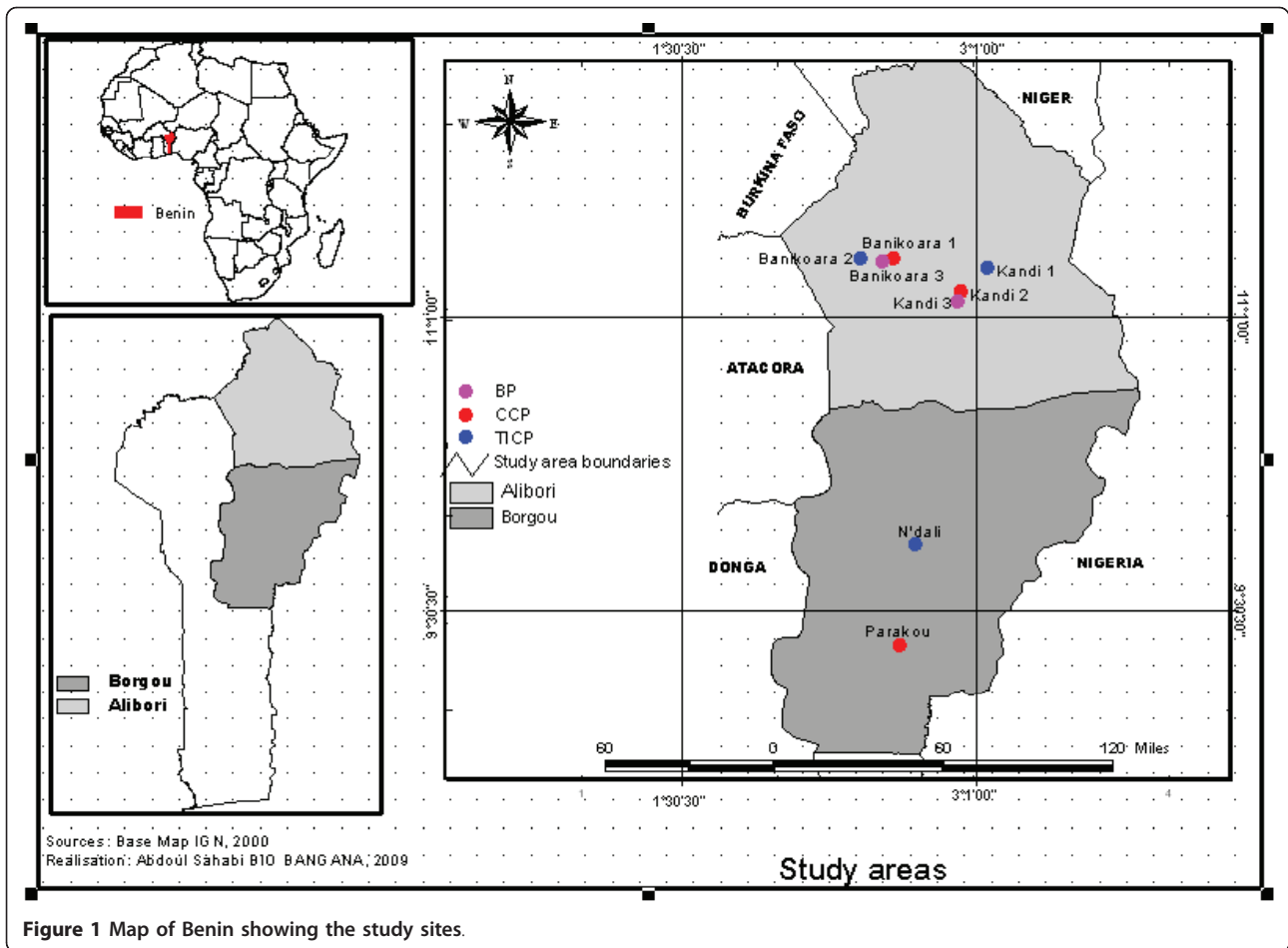


Figure 1 Map of Benin showing the study sites.

described by Martinez-Torres *et al.* [31]. The PCR-RFLP diagnostic test was used to detect the presence of G119S gene (*Ace-1* gene) as described by Weill *et al.* [32].

Screening of pesticide residues in soil from agricultural settings

This investigation was performed using indirect bioassays focused on factors which can affect the normal growth of mosquito larvae in cotton breeding sites. The hatching rates of *An. gambiae* eggs and the larval survival during rearing period were assessed in artificial breeding sites made of soil samples collected from different cotton areas. The pyrethroid-susceptible Kisumu strain and the resistant VKPER strain were used to test the presence of insecticide residues in the soil samples by means of mortality rates after exposure. The testing method was based on an artificial breeding site made of a mixture of soil from cotton sites (BP, TICIP and CCP programs) and CREC soil used as a control. 100 g of each soil was weight and mixed in 1,000 ml of water. 200 eggs of the susceptible *Kisumu* strain were placed in each artificial breeding site and compared with 200 eggs of VKPER.

Larvae in all artificial breeding sites were fed with similar quantity and type of food (well ground cat biscuits mixed with yeast powder). Daily observation was done in order to record the number and the instars of larvae. This experiment was replicated three times per month.

Data interpretation

The resistant status of mosquito samples was determined according to the WHO criteria [33]:

- Mortality rates is > 97%: the population was considered fully susceptible
- Mortality rates ranged between 80 > × < 97%: resistance suspected in the population
- Mortality rates < 80%, the population was considered resistant to the tested insecticides.

The knockdown times for 50% and 95% of tested mosquitoes (*KdT50* and *KdT95*) were estimated using a log-time probit model [34].

The resistance allele frequency at the *kdr* and *Ace-1* locus was calculated using Genepop software (version 3.3) as described by Raymond and Rousset [35].

A Fisher's exact test was performed to compare the resistance allele frequency at the *kdr* and *Ace-1* among the mosquitoes from the different strategies.

An analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the percentage of hatching eggs in the different treatments in order to know the impact of insecticide on the normal growth of mosquito larvae in cotton breeding sites.

Results

Knowledge-Attitude -Practice (KAP) investigations

Results from our KAP investigations from June to September 2008 in the cotton growing areas showed a common use by farmers of mineral fertilizer NPK at about 200 kg.ha⁻¹ and urea at about 50 kg.ha⁻¹ in both the CCP and the TICP sites. By contrast, in BP areas, all farmers in this group used organic and natural fertilizers which included animal excreta. In the CCP sites, about 6 pesticide treatments were applied by farmers 45 days after seeding and at two week intervals from flowering. Endosulfan or Tihan[®] (mixture of spirotetramat + flubendiamide), were sprayed in the first two treatments followed by the mixtures of cyfluthrin + chlorpyrifos ethyl for the 3rd and the 4th treatment and then cypermethrin + dimethoate applied for the last two treatments. In TICP sites, the same treatments at intervals of two weeks were made either at half dose or at a complete full dosage when the threshold of infestation was reached (5 of *H. armigera* larvae observed on 50 plants). In areas practicing Biological Program, farmers apply a mixture of neem or papaya leaves with added chilli and local soap three times before the harvest.

Resistance to insecticides

A total of 1,313 females of *An. gambiae* collected from different sites around Parakou, N'dali, Kandi, and Bani-koara were exposed to papers impregnated with discriminating doses of permethrin (0.75%), deltamethrin (0.05%), DDT (4%) and bendiocarb (0.1%).

The knockdown times (*KdT50*, *KdT95*) of *An. gambiae* populations from CCP and TICP sites were significantly longer than that of the susceptible strain Kisumu ($p < 0.05$). However, the *KdT50* for *An. gambiae* from BP site around Kandi was not significantly different from Kisumu (Table 1). Data recorded before and during the period of treatments showed a higher resistance to DDT and permethrin in populations from the CCP and TICP sites compared with those from the BP sites (Figure 2 and Figure 3). All populations of *An. gambiae* mosquitoes were resistant to DDT with an average of 33%, 42% and 65% of mortality respectively for CCP, TICP and BP sites. The mortality difference associated with the different pesticide application strategies was highly significant between BP and CCP programs ($P < 0.05$) but not

significant between BP and TICP program ($P = 0.56$). However, *An. gambiae* populations from BP, CCP and TICP sites were fully susceptible to deltamethrin and bendiocarb (100% of mortality). Permethrin resistance was found in *An. gambiae* populations from CCP and TICP sites with an average mortality of 50% and 58% respectively. However, *An. gambiae* collected from BP sites were more susceptible to permethrin with 94% mortality.

Species identification

A total of 850 *An. gambiae* adults were analysed for species and molecular forms. Most of the mosquitoes collected from all the sites were *An. gambiae* s.s. (90%), which was found in sympatric with a low proportion of *An. arabiensis* (0 to 5%) except in Parakou and N'dali where they were more present (22 to 30% respectively) (Table 2). In *An. gambiae* s.s., the M and S forms were always found in sympatric but the S form was mostly predominant (96%).

Resistance mutations

The *kdr* genotype was scored for 1,400 individuals (100 mosquitoes consistently failed to amplify). The *kdr* gene occurred in S forms (Table 2). The highest frequency of *Kdr* mutation was recorded for the populations from three CCP sites (67-78%) and the lowest (35 and 32%) were found in the populations from BP sites around Kandi and Banikora respectively.

The *Ace-1R* gene was found at very low frequency ranging (from 0.00 to 0.06) in heterozygote *An. gambiae* s.s. from the three CCP sites (Table 2). Among *An. gambiae* s.s., there was no mosquito of the M molecular form carrying the *ace-1R* gene.

The resistance allele frequency at the *kdr* was significantly higher in areas where farmers used insecticide for pest control (CCP and TICP) than in those no insecticide is not request (BP) ($p < 0.05$). However, there is no difference between the resistance allele frequency at the *kdr* from mosquitoes in CCP and TICP strategies ($p > 0.05$).

Pesticide residues

Results of soil samples for pesticide residues analysis showed that artificial breeding sites made with soil from CREC (control) and soil from Biological program (BP) sites were similar with no effect on hatching of *An. gambiae* Kisumu and VKPER strains (Figure 4). Tests with the susceptible *An. gambiae* Kisumu strain gave percentages of hatching equivalent to 80% in control soil (no contact with pesticides) and 75% with soil from BP sites. However, with the pyrethroid resistant strain VKPER the percentages of hatching were 83% and 77% with the control soil and soil from BP sites respectively. The hatching percentages of both strains decreased significantly when

Table 1 Knockdown times (KdT_{50} and KdT_{95}) and mortality of *Anopheles gambiae* s.l. populations from 3 cotton sites after exposure to DDT 4% and permethrin 0.75% and their resistance status

Sites/Strains	Program	Insecticides	N	kdT_{50} [CI95] (min)	kdT_{95} [CI95] (min)	% Mortality [Conf lim 95]	Resistance status
Parakou	CCP	DDT	40	65.1 [57.5-73.4]	152.1 [118.4-228.1]	38 [29.31-46.7]	R
		Permethrin	75	35.3 [32.1-38.4]	112.1 [88.2-151.9]	54 [47.49-60.5]	R
N'dali	TICP	DDT	60	38.1 [29.4-36.5]	65.1 [57.5-86.5]	45 [37.73-52.3]	R
		Permethrin	60	19.3 [15.6-22.4]	67.1 [53.2-87.4]	60 [52.8-67.16]	R
Kandi1	CCP	DDT	70	63.1 [60.2-72.3]	135.1 [5.2-184.5]	32 [25.7-38.31]	R
		Permethrin	80	19.3 [15.6-22.4]	87.1 [63.5-138.4]	50 [43.67-56.32]	R
Kandi 2	TICP	DDT	50	35.1 [27.1-35.2]	62.5 [54.2-79.1]	43 [35.07-50.92]	R
		Permethrin	88	15.1 [13.6-20.1]	56.5 [43.2-77.2]	58 [52.00-64]	R
Kandi 3	BP	DDT	60	30.3 [25.4-38.9]	72.6 [50.2-90.5]	66 [59.08-72.92]	R
		Permethrin	80	11.0 [8.7 - 17.6]	23.5 [18.4-35.8]	94 [91.01-96.98]	S
Banikoara 1	CCP	DDT	65	56.5 [51.7-63.2]	186.9 [146.0-265.2]	35 [28.3041.69]	R
		Permethrin	90	24.6 [20.3-29.0]	105.2 [92-130.8]	51 [45.04-56.96]	R
Banikoara 2	TICP	DDT	70	32.4 [25.8-30.2]	60.1 [50.1-78.6]	41 [34.34-47.65]	R
		Permethrin	70	18.5 [16.1-22.4]	58.1 [47.4-78.4]	59 [52.35-65.65]	R
Banikoara 3	BP	DDT	75	29.1 [24.4-37.6]	70.1 [48.2-88.2]	64 [57.73-70.27]	R
		Permethrin	80	13.2 [9.4 - 18.2]	25.5 [20.2-37.1]	95 [92.24-97.75]	S
<i>An. gambiae</i> s.l	*	DDT	100	25.7 [24.3-27.0]	40.7 [38.0-44.5]	98 [96.41-99.58]	S
		Permethrin	100	10.9 [9.7-12.0]	18.1 [16.0-21.6]	99 [97.87100.13]	S

KdT_{50} , knockdown time in min for 50% mosquitoes; KdT_{95} , knockdown time in min for 95% mosquitoes; CI, confidence interval at 95%;

*, No program = Control; Conf Lim 95% = confidence interval at 95%.

soil samples from CCP and TICP sites were used. With the TICP soil, *VKPER* hatching was 45% against 25% for the Kisumu strain, while the CCP soil gave 34% hatching for *VKPER* and 11% for Kisumu. In both cases the results showed that the hatching rates were significantly higher ($P < 0.05$) with *VKPER* than Kisumu when the soil samples tested were from TICP and CCP sites.

Similar results were obtained with the emergence of adults of *VKPER* and Kisumu strains from eggs placed in artificial breeding sites consisting of water and soil samples from CCP and TICP relative to the control (Figure 4). There was no significant difference between the emergence of adults of *VKPER* and *Kisumu* strains breeding in artificial sites made with the soil samples from BP compared with the control (Figure 5).

However, a significant difference ($P < 0.05$) was observed between the emergence of *VKPER* on artificial sites made of soils from TICP (43%) and CCP (35%) sites and Kisumu which gave 20% emergence on TICP and 13% on CCP.

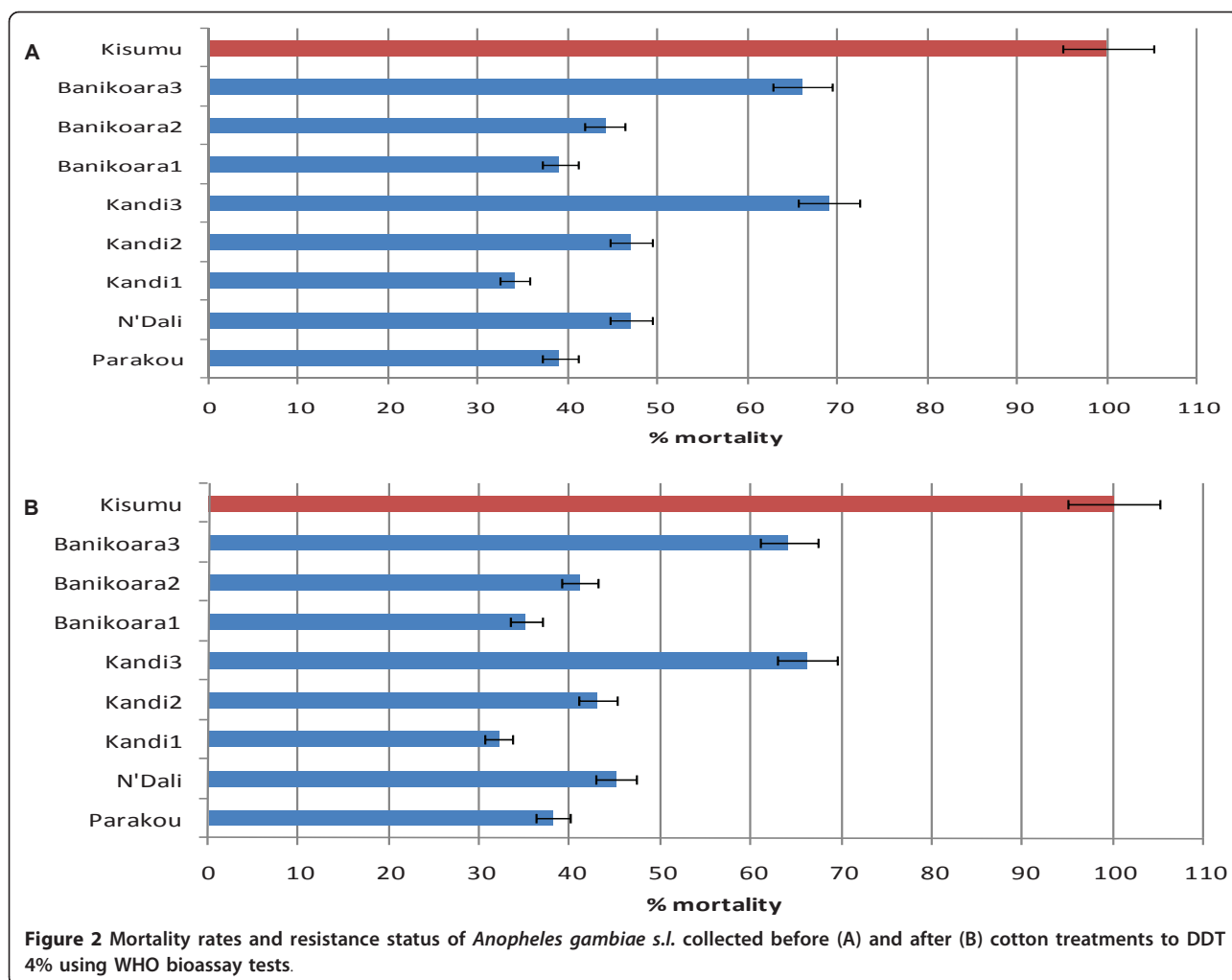
Discussion

The information generated during interviews with cotton farmers and the observations made in cotton fields has confirmed a common use of fertilizers and insecticides in cotton fields. Cotton cultivation requires intensive use of pesticides including insecticides belonging to the two main classes recommended for vector control in public health: organophosphates and pyrethroids. In

West Africa, pyrethroid-treated bed nets remain one of the effective tools for malaria vector control and it provides personal protection to individuals who sleep under them. When used by the whole community, bed nets protect collectively against infective mosquito bites by a mass killing effect of the vectors [36].

In Benin, pyrethroids have been extensively introduced in agriculture since 1980s [25]. This factor is probably one of the causes of the selection of strong resistance in *An. gambiae* to permethrin and DDT, particularly in cotton growing areas. Based on recent results, several authors [8-12; 37] have reported that past and current agricultural use of DDT then pyrethroids for crop protection have led to the selection of resistant mosquitoes through insecticide residues accumulated in breeding sites around cotton growing areas. This hypothesis was recently confirmed by Akogbeto *et al.* [25] showing indirectly the presence of pesticide residues in soil and water from vegetable farms and other agricultural activities in Benin that delay or reduce the emergence rates of mosquito larvae.

The use of insecticides in households for public health purposes and massive quantities of pesticides in agricultural settings has been highlighted as a key factor contributing to the emergence of vector resistance. A recent report by Yadouleton *et al.* [37] showed that agricultural practices in urban areas seem to have contributed to the emergence of insecticide resistance in *Anopheles* populations. Our study in vegetable farming systems in Benin

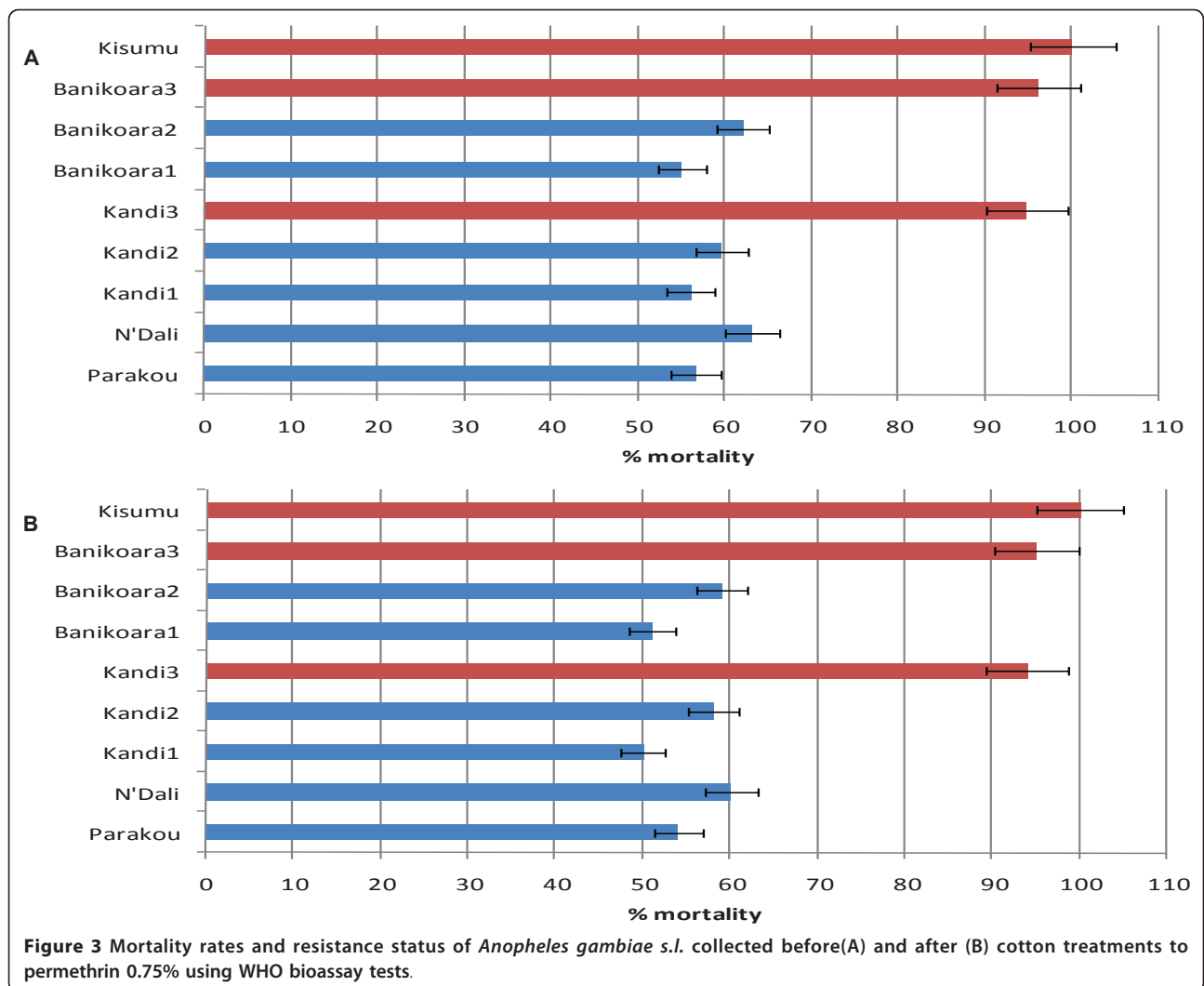


demonstrated that improper use of insecticides to control vegetable pests in urban areas directly exerted a huge selection pressure on mosquito larval populations. The high mortality observed with mosquitoes reared on soils from CCP, TICP sites can be explained by the presence of DDT residues in the soil from those sites and the extensive use of pyrethroids by farmers [38]. Our results showed that the high level of the *kdr-west* (Leu-Phe) gene seemed to be the main resistance mechanism and responsible for the decrease of mortality rates to DDT and permethrin and is more of an ongoing process in *An. gambiae* populations from CCP and TICP sites. The *kdr* gene in the main malaria vector *An. gambiae* was found at high frequency in samples from the sites using insecticide (CCP and TICP) than those with no use of insecticide (BP program). The low frequency of *Kdr* gene in BP localities compared with those from CCP and TICP could be due to the fact that in the past these farmers in BP sites used insecticide to control cotton pests. According to reports by Akogbeto

et al [25], Djogbénu *et al* [14], and Yadouleton *et al.* [38], the presence of *Kdr* genes in mosquito can be due to external factors that affect mosquitoes as larvae or adults. In 2000, a study in Burkina Faso by Diabate *et al.* [17] reported higher levels of *kdr* alleles frequency in *An. gambiae* collected from cotton-growing areas constantly subjected to insecticide treatments, as compared to the low frequency of *kdr* recorded in rural areas where farmers are restricted to low or no use of pesticides. Despite the use of insecticide in both CCP and TICP sites, the difference in adult mortality rates between CCP and TICP program can be explained by the fact that CCP program uses more insecticide than TICP program.

This study provides clear evidence of the association between the use of insecticides in agriculture and the widespread emergence of insecticide resistance in *Anopheles* species.

Indeed, in Benin, insecticide treatments against pests in cotton plantations are carried out twice a month, for



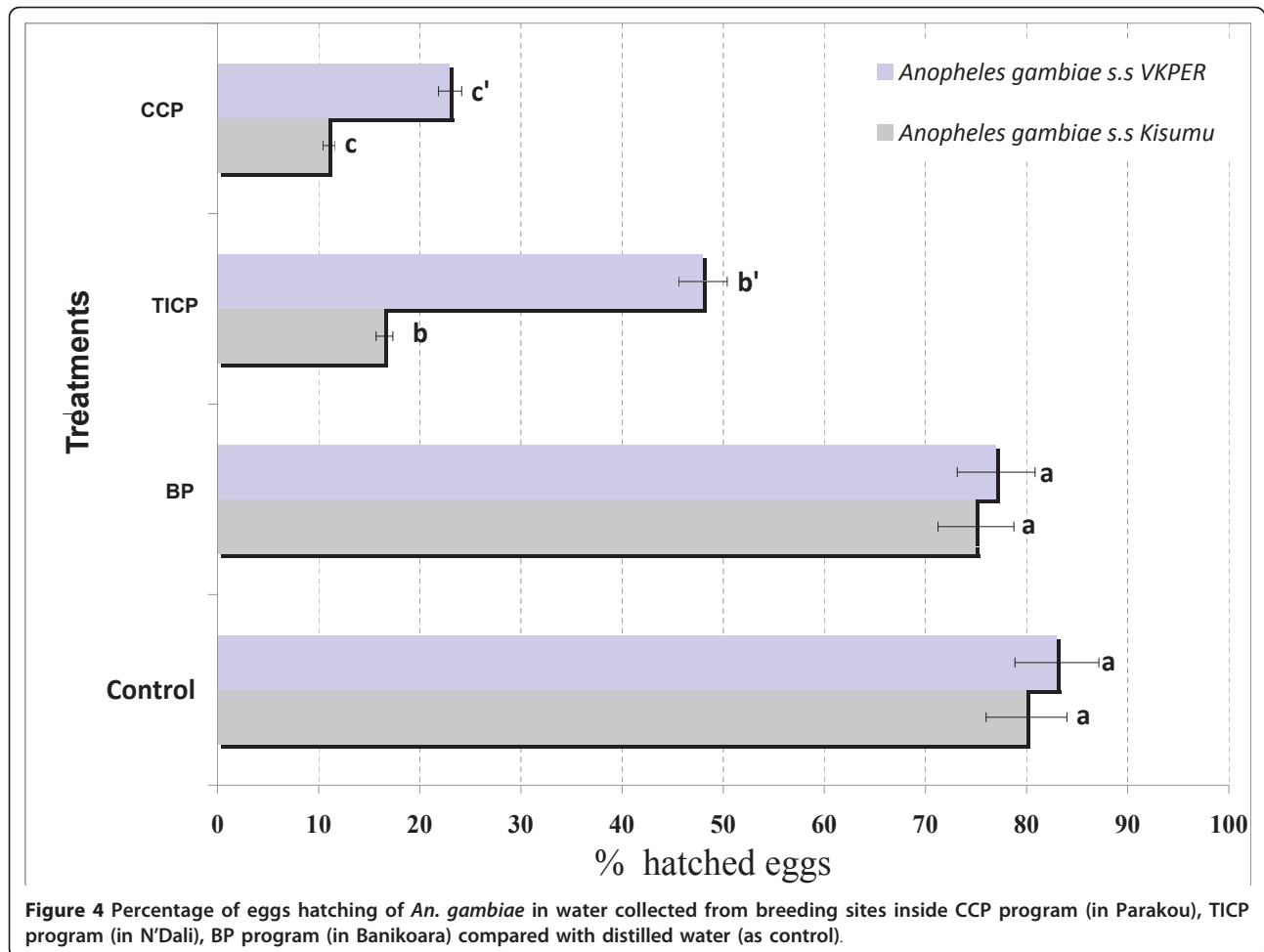
an average period time of three months (between July and October) per year. That treatment period during the rainy season correspond with the period of high mosquito densities because *Anopheles* populations have numerous breeding sites particularly in cultivated areas.

As reported by Akogbeto *et al* [26], some populations of *An. gambiae* may lay their eggs in breeding sites containing insecticide residues. These eggs undergo a selection pressure from agricultural pesticides, which leads to the emergence of resistant strains. There is clear

Table 2 Species and molecular forms identification within *Anopheles gambiae* complex and the frequency of *Kdr* and *Ace-1R* mutations in *Anopheles gambiae s.s.* in Benin

Locality	Species ^a		Mol. Form		<i>Kdr</i> mutation				<i>Ace.1</i> mutation			
	%Aa	%Ag	%M	%S	SS	RS	RR	F(R)	SS	RS	RR	F(R)
Parakou ¹ (92)	22	78	5	95	12	35	45	0.68	30	02	0	0.06
N'dali ² (92)	30	70	3	97	22	40	30	0.54	25	0	0	0.00
Kandi ¹ (92)	5	95	0	100	7	45	40	0.67	30	02	0	0.06
Kandi ² (92)	4	96	0	100	28	34	30	0.51	30	01	0	0.03
Kandi ³ (90)	0	100	0	100	45	25	20	0.35	30	0	0	0.00
Banikoara ¹ (102)	3	97	0	100	12	36	54	0.78	30	02	0	0.06
Banikoara ² (92)	02	98	0	100	14	48	30	0.59	30	0	0	0.00
Banikoara ³ (96)	02	98	2	98	48	36	12	0.32	25	0	0	0.00

(a) Aa = *An. arabiensis*; Ag = *An. gambiae s.s.*, superscripts in column; 1 = Control strategies: 1 = CCP; 2 = TICP; 3 = BP.



evidence on the implication of agricultural use of insecticides in the selection of resistance in the major malaria vectors. Our results agree with the work of Akogbeto *et al* [25] and confirm once again the impact of the extensive use of insecticides in cotton crop protection on the emergence of insecticide resistance in *An. gambiae* populations. Moreover, in CCP and TICP program, some farmers used insecticides belonging to the organophosphate classes. *Ace-1R* gene is the main resistance mechanism of *An. gambiae* s.l. to organophosphates and carbamates also. The present study, has shown that the *ace-1R* gene is present at low frequency (ranging from 0.01 to 0.09), but only in CCP and TICP program. However, previous field surveys on *An. gambiae* s.l. populations of South-Western

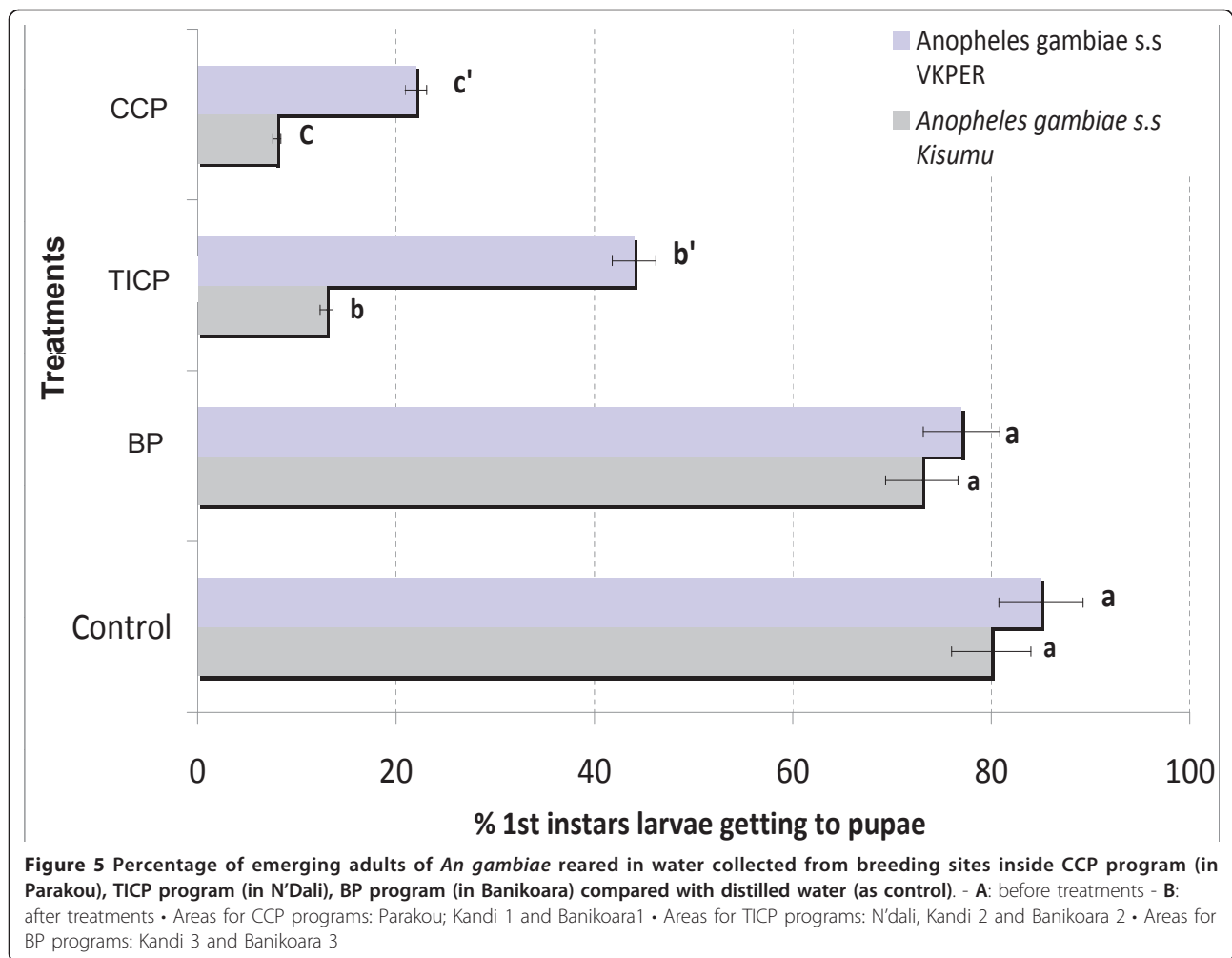
Burkina Faso by Djogbenou *et al* [14] in cotton fields showed that *ace-1R* gene was the main resistance mechanism in *An. gambiae* s.l.

However the National Malaria Control Program (NMCP) in Benin has started scaling up Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and carbamate for Indoor

Residual Spraying (IRS) countrywide for malaria control. The challenge to find effective strategies to manage insecticide resistance in *Anopheles gambiae* remains a high priority and an urgent need particularly in Benin where pyrethroid resistance has been reported with a clear evidence in experimental huts of reduced efficacy of ITNs and IRS [39]. One of the strategies will be to remove pyrethroids from agricultural pest control and leave these classes of insecticides for public health purposes and promote other classes of insecticides such as Spinosad which does not show cross resistance to pyrethroids (i.e. the *kdr* gene).

Conclusions

With the spread of *Kdr* allele frequency from CCP and TICP programmes, to reduce the emergence of insecticide resistance in *An. gambiae* population, African governments would be better advised to promote the BP cotton or genetically modified cotton such as *Bt* Cotton (*Bacillus thurengiensis*) which require lower pesticide than the cotton with CCP and TICP programme and



would permit to suppress the massive use of pyrethroid insecticides.

Acknowledgements

This work was financially supported by the French government (Corus 6015 project). I am grateful to CREC's staff particularly Sebastien Koudoukpe and Géraldo Houndéton for technical assistance during laboratory bioassays and field collections.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, République du Bénin. ²Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD-UR Hortsys, 34980 Montpellier, France. ³Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Centre Collaborateur OMS 911 Ave Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5 France. ⁴Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 01 BP 4414 RP Cotonou, République du Bénin. ⁵Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS)/Centre Muraz, BP 390, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. ⁶Université d'Abomey-calavi, Department of geography, B.P. 526 Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Benin. ⁷Université de Lomé, Faculté de Sciences et Techniques, Lomé, Togo.

Authors' contributions

AY carried out field experiments, collected, analysed, interpreted data and wrote the manuscript. TM, GP reviewed the manuscript and contributed to

the design of the study and substantially helped in drafting the manuscript, and revised the manuscript. FC, LD, RD, IG and MB contributed to the design of the study. AA helped in drafting and reviewing the manuscript and RA helped with the activities. TM, MA conceived and designed the study, supervised fields and laboratory procedures, and reads the manuscripts. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 6 December 2010 Accepted: 13 April 2011

Published: 13 April 2011

References

1. WHO: **World Malaria Report 2009**. World Health Organization, Geneva; 2009.
2. Ministère de la santé: **Annuaire des statistiques sanitaires 2006**. Cotonou; 2009.
3. Reimer L, Fondjo E, Patchoke S, Diallo B, Lee YNg, Ndjemai HM, Atangana J, Traore SF, Lanzaro G, Cornel AJ: **Relationship between *kdr* mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of *Anopheles gambiae***. *J Med Entomol* 2008, **45**:260-266.
4. Ramphul U, Boase T, Bass C, Okedi LM, Donnelly MJ, Muller P: **Insecticide resistance and its association with target-site mutations in natural populations of *Anopheles gambiae* from eastern Uganda**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, **103**:1121-1126.
5. Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P: **Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato***. *Bull World Health Organ* 1999, **77**:230-234.

6. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, Torre A: **Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa.** *Malar J* 2008, **7**:74.
7. Djènontin A, Sahabi B, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, Chabi J, Ossè R, Koudénoukpo S, Corbel V, Akogbéto M, Chandre F: **Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:83.
8. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Mcallister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA: **Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin impregnated nets.** *Med Vet Entomol* 1999, **13**:239-244.
9. Elissa N, Mouchet J, Rivière F, Meunier JY, Yao K: **Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire.** *Ann Soc Belge Méd Trop* 1993, **73**:291-294.
10. Akogbéto M, Yakoubou S: **Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest.** *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **92**:123-130.
11. Yadouleton AW, Asidi A, Rousseau FD, Braïma J, Agossou CD, Akogbetto MC: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin.** *Malar J* 2009, **8**:103.
12. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbetto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.
13. N'Guessan R, Corbel V, Akogbetto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticidetreated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin.** *Emerg infect diseases* 2007, **13**:199-206.
14. Djogbéno L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbetto M, Hougard JM, Chandre F: **Identification and Geographic Distribution of the *Ace-1R* Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa.** *Am J trop med hyg* 2008, **78**:298-302.
15. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB: **Evidence of increasing *Leu-Phe* knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation.** *Malar J* 2008, **7**:189.
16. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM: **First report of the *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa.** *Parassitologia* 2002, **44**:157-158.
17. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbéto M, Guiguemde RT, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Graham JS, Hougard JM: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:617-622.
18. Fanello C, Petrarca V, Torre D, Santolamazza A, Dolo F, Coulibaly G, Allouche MA, Curtis CG, Toure YT, Coluzzi M: **The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2003, **12**:241-245.
19. Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M: **Resistance of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:849-852.
20. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: ***Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:181-189.
21. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: **Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (*Diptera: Culicidae*) in the Republic of Cameroon.** *J Med Entomol* 2003, **40**:491-497.
22. WABI: **The cross-border integration of the cotton sub-sector. West African Borders and Integration Network.** *Coton et Fibres Tropicales* 2003, **112**:54-71.
23. N'Guessan F, Darriet P, Guillet P, Carnevalle M, Lamizana T, Corbel V, Chandre F: **Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* base on reduced of acetylcholinesterase.** *Med vet Entomol* 2003, **17**:19-25.
24. Akogbéto M, Djouaka R, Gazard DA: **Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings.** *Malar J* 2006, **5**:22.
25. Akogbéto M, Djouaka R, Noukpo H: **Use of agricultural insecticides in Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**:400-405.
26. Deguine JP, Ekukole G, Amiote P: **La lutte étagée ciblée: un nouveau programme de protection insecticide en culture cotonnière au Cameroun.** *Coton et Fibres Tropicales* 1993, **48**:99-119.
27. Prudent P, Loko S, Deybe D, Vaissayre M: **Factors limiting the adoption of IPM practices by cotton farmers in Benin: a participatory approach.** *Cambridge University Press* 2006, **10**:10-17.
28. WHO: **World Malaria Report 2008.** World Health Organization, Geneva; 2008.
29. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH: **Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
30. Favia G, Torre D, Bagayoko M, Lanfrancotti M, Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: **Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation.** *Insect Mol Biol* 1997, **6**:377-383.
31. Martinez TD, 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**:179-184.
32. 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 Mol* 2004, **9**:1-7.
33. WHO: **World Malaria Report 1998.** World Health Organization, Geneva; 1998.
34. Finney DJ: **Probit analysis.** Cambridge University Press Cambridge; 1971.
35. Raymond M, Rousset F: **Genepop (version 1.2). A population genetics software exact tests and ecumenicism.** *Heredity* 1995, **86**:248-249.
36. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevalle P: **Protective Efficacy of Lambda-Cyhalothrin Treated Nets in *Anopheles gambiae* Pyrethroid Resistance areas of Cote d'Ivoire.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:859-864.
37. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: ***Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:1-9.
38. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Sahabi B, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yakoubou I, Kinde G, Akogbetto MC: **Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin.** *Malar J* 2010, **9**:83.
39. Akogbéto MC, Padonou G, Gbénou D, Irish S, Yadouleton AW: **Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa.** *Malar J* 2010, **9**:204.

doi:10.1186/1756-3305-4-60

Cite this article as: Yadouleton et al.: Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasites & Vectors* 2011 **4**:60.

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

