

RÉPUBLIQUE DU BENIN  
UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI (UAC)  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES (FAST)  
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE (EDSV)

N° : 30/EDSV

## THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ABOMEY-CALAVI**

**Discipline : Sciences de la Vie**

**Spécialité : Entomologie Médicale et Vétérinaire**

Par

**Tognihou Armel DJÈNONTIN**

Thème :

### **Stratégies de gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme et impact opérationnel en Afrique de l'Ouest**

Soutenue publiquement le 11 juin 2011 devant le jury composé de :

Présidente : **Isabelle GLITHO**, Professeur Titulaire, Université de Lomé, Togo

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

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

**Patrick EDORH**, Maître de Conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Vincent CORBEL**, Chargé de Recherche, HDR, IRD, Bénin

Examineurs : **Karim DRAMANE**, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

**Fabrice CHANDRE**, Co-Directeur de Thèse, Chargé de Recherche, IRD, France



## Remerciements

Je n'aurais pas eu la chance de faire partie de la première promotion du Master International en Entomologie Médicale et Vétérinaire (MIE) et faire cette thèse sans le soutien de Monsieur Martin Akogbéto, Professeur Titulaire à l'Université d'Abomey-Calavi, Directeur du CREC. Monsieur le Professeur, veuillez recevoir ici l'expression de mes sincères gratitudee.

J'ai pu faire ce master et la présente thèse aussi parce que j'ai été accueilli par Messieurs Jean-Marc Hougard et Fabrice Chandre, chercheurs de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), dans leur équipe de recherche. Messieurs Jean-Marc Hougard et Fabrice Chandre, vous m'avez donné les moyens nécessaires pour mener à bien mes recherches ; je vous remercie pour la confiance que vous avez placée en moi et qui a été pour moi un véritable générateur de motivation.

Ce travail est le fruit d'une collaboration et d'un partenariat soutenus entre plusieurs équipes : le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), le laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN, IRD, Montpellier), et L'Institut Régional des Sciences en Santé (IRSS Bobo-Dioulasso, Burkina). Il a bénéficié principalement de l'appui de l'IRD, du projet «Recherche en Entomologie Formation et Stratégies de prévention, cas du paludisme et de la trypanosomiase humaine africaine (REFS) du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes de la France (MAEE), du projet President Malaria Initiative (PMI) de l'USAID et du Réseau ABC.

Plusieurs personnes ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Je souhaite particulièrement remercier :

Monsieur Martin Akogbéto, Professeur Titulaire à l'Université d'Abomey-Calavi, Directeur du CREC pour m'avoir permis d'accomplir ce travail sous sa direction. Monsieur le Professeur, votre calme, votre rigueur scientifique et la qualité de vos observations constituent un modèle à suivre. Sincère merci pour l'importance que vous accordez à ma carrière d'Enseignant-Chercheur.

Monsieur Didier Fontenille, Directeur de l'unité de recherche MIVEGEC/IRD, pour l'accueil, les efforts personnels et les moyens mis à ma disposition lors de mes différents séjours à Montpellier (France).

Monsieur Fabrice Chandre, chercheur dans l'unité de recherche MIVEGEC/IRD pour avoir accepté de codiriger cette thèse.

Monsieur Vincent Corbel, chercheur dans l'unité de recherche MIVEGEC/IRD et responsable de l'UMR 224 au CREC, avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours des deux dernières années de ma thèse. J'ai beaucoup appris de vous et tiens à vous en remercier.

Madame Marie-Claire Henry, coordonatrice du projet REFS. Dans le cadre des activités de ma thèse, j'ai eu à travailler avec vous dans ce projet. Vos conseils et vos qualités de Mère ont compté pour beaucoup dans le succès de nos travaux, soyez en remerciée.

Madame Isabelle Glitho, vous avez participé au jury ayant évalué mon mémoire dans le cadre du Master International en Entomologie Médicale et Vétérinaire, merci pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury qui évalue ma thèse.

Monsieur Ousmane Faye, vous avez été le Président du jury ayant évalué mon mémoire de Master, et vous avez accepté à nouveau d'être rapporteur de ma thèse, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Monsieur Patrick Edorh, sincère merci à vous pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur Karim Dramane, vous m'aviez enseigné la physiologie animale et c'est vous qui, la première fois m'avez accepté dans l'Ecole Doctorale Science de la Vie. Vous m'avez soutenu tout au cours de cette thèse, merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

Messieurs Alain Nahum, Luc Djogbénou, Thierry Baldet, Thibaut Martin, Frank Romoué, Cédric Pennetier, Seth Irish, Raphaël N'Guessan et Alex Asidi, chercheurs dont j'ai fait la connaissance au CREC. J'avoue que ce cadre fraternel a su me redonner confiance dans les moments douteux. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Monsieur Pierre Kengne et Madame Cécile Brengues du LIN, à qui je tiens à dire merci pour m'avoir initié à la biologie moléculaire. Avec vous j'ai fait mes premières analyses PCR. Je vous en remercie.

Monsieur Diego Ayala, tu m'as initié à la génétique des populations et tu as toujours répondu promptement et amicalement à toutes mes sollicitations, sincère merci à toi.

Une attention particulière à Luc Abate, Luc Finot, Stéphane Duchon, Julien Bonnet, Frédéric Darriet, Marie Rosignol, Valérie Delplanque, Francine Martin, Anna Cohuet, Karine Mouline, Nicolas Poquet, Betty Zumbo, Céline Toty, Marie-Noëlle Lacroix, Caroline Harris, Sébastien Marcombe, Nil Rahola que j'ai rencontrés au LIN.

A Bobo-Dioulasso, je remercie messieurs Rock Dabiré, Abdoulaye Diabaté, Abdoulaye Ouattara, Ali Ouari, Soro, pour leur assistance au cours de ma mission au Burkina Faso.

Au Bénin, je tiens à remercier mesdames et messieurs Clémence Durand, Balbine Kindji, Noukpo Herbert, Lin Atigli, Félix Zouménou, Narcisse Hounmassè, Cyrille Agoli-Agbo, Etienne Gueduy, Ibrahim Siddick, Aboubakar Siddick, Arouna Salé, Lazare Houkanrin, Yamadjako Médard, Pélagie Boko, Abibatou Odjo, Clémence Metonnou, Eugène Zinzalo, Hubert Tagon, Gil padonou, Ange Yadouléton, Rock Aïkpon, Razaki Ossè, Bio Bangana Sahabi, Innocent Djègbé, Emmanuel Elanga, Papa Drame, Nicolas Moiroux, Ola Boussari, Oriane Nadège Aïcheou, Sabine Oyinboadé, tous les étudiants en Master d'Entomologie Appliquée.

Une attention particulière à Joseph Chabi, Sébastien Koudénoukpo, Razaki Ossè, Georgia Damien, Sandra Yamadjako, Cyriaque Azondékon, Philémon Tokponnon, A. Odile Aïmihouè, Jean-Robert Klotoe, Barnabas Zogo, Christelle Azogo, Annie Atchadé, Achille Zoungbonou, Modeste Damassoh, Henriette Déguénon, Judith Hovor, Fadilath Bakari, avec qui j'ai passé plusieurs mois sur le terrain dans le cadre des activités de la présente thèse, soyez en remerciés.

Innocent Djègbè, Pape Dramé, Bio-Bangana Sahabi et Nicolas Moiroux, j'ai partagé avec vous au cours de cette thèse beaucoup de choses et nos échanges m'ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Je vous dis un sincère merci.

Je remercie les autorités politico-administratives et sanitaires de la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori, les captureurs et toutes les populations de ces 3 communes pour leur collaboration au cours des travaux de terrain.

Merci également à Bruno Bordage, représentant de l'IRD au Bénin, et à tout le personnel de la représentation : Laurence Quilichini, Gaëtan Sessinou, Chancel Konaté, Ahonon Bellinda, Rita Saudegbé.

Je voudrais tout particulièrement remercier mes parents pour m'avoir mis à l'école et pour leurs soutien et encouragements constants durant mes études.

Je voudrais remercier également mes frères et sœurs pour leurs conseils et leur soutien.

Mes pensées vont à l'endroit de feu Bernadette Agbossou Sohoudji en ce moment où je rédige cette thèse.

A mes amis, je dis un sincère merci pour leur assistance.

Je remercie Roger Tamègnon pour m'avoir soutenu au cours de cette thèse à un moment où j'en avais grand besoin.

A Odile, Fifa, et Mindessi, je n'ai pas assez de mots pour exprimer mes sentiments. Votre présence à mes côtés est un bien très précieux pour tout ce que j'entreprends.

Je dis enfin merci à tous ceux que j'ai omis de citer.

## RESUMÉ

Face à la résistance aux insecticides des vecteurs, les combinaisons de produits insecticides résiduels à l'intérieur des habitations peuvent être une solution pour une meilleure efficacité de la lutte antivectorielle contre le paludisme. Ces combinaisons visent à interrompre la transmission et à ralentir l'évolution de la résistance aux insecticides chez les vecteurs. Dans la présente étude, des recherches sur des stratégies de gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes des vecteurs du paludisme combinant les moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à longue durée d'action (MILD) et le bendiocarb en aspersion intradomiciliaire (PID) ou en imprégnation de bâches murales (BI) ont été menées.

Dans un premier temps au laboratoire, il a été évalué l'efficacité et la résistance aux lavages de 4 différents supports imprégnés de bendiocarb. L'efficacité de la MILD seule ou en combinaison avec la PID ou la BI a été ensuite évaluée en cas expérimentales. Enfin, l'impact sur la transmission du paludisme, l'infection et la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans, et sur la résistance des vecteurs de ces combinaisons a été évalué à travers un essai contrôlé randomisé dans 28 villages au sud du Bénin (population d'environ 14 000 personnes) où la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes est modérée. Une étude de la génétique des populations de *An. funestus* a été également effectuée et l'impact des interventions sur ces populations a été évalué. Quatre stratégies de lutte antivectorielle ont été mises en place :

- i) une couverture sélective en MILD des enfants de 0 à 5 ans selon les recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) (bras PNLN, témoin) ;
- ii) une couverture universelle en MILD (bras MILD) ;
- iii) une combinaison de la couverture universelle en MILD avec des bâches murales régulièrement imprégnées tous les 4 mois de bendiocarb à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup> ; les doses recommandées par l'OMS pour l'application du bendiocarb en aspersion intradomiciliaire étant 100 à 400 mg/m<sup>2</sup> (bras MILD + BI) ;
- iv) une combinaison de la couverture sélective en MILD avec la PID annuelle de bendiocarb à la dose de 400 mg/m<sup>2</sup> (bras PID).

Au laboratoire, le polypropylène a été le meilleur support en termes de résistance aux lavages avec une mortalité de 100% de la souche sensible de *Anopheles gambiae* Kisumu au bout de 10 lavages. En cas expérimentales, les résultats ont montré le bénéfice de combiner deux classes d'insecticides (pyréthrinoïde, carbamate) à travers des méthodes de lutte antivectorielle différentes (moustiquaires imprégnées, pulvérisation intradomiciliaire, bâche imprégnée) notamment dans un contexte de résistance des vecteurs à la fois aux pyréthrinoïdes et aux carbamates (et organophosphorés). Par contre, l'essai contrôlé randomisé n'a pas montré de bénéfice en termes de réduction de la transmission du paludisme, de l'infection et de la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans de l'utilisation de telles combinaisons. Quel que soit le traitement, la fréquence allélique de la mutation *kdr* a augmenté au cours des 18 mois d'étude (de 29% à 84% en moyenne). Aucun impact des interventions n'a été observé sur les paramètres de variabilité génétique de *An. funestus*. Le taux de couverture des MILD a été satisfaisant (75%), mais le taux d'utilisation (46%) était bien inférieur au seuil fixé dans l'étude (70%).

Les résultats de l'essai contrôlé randomisé peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs comme des facteurs anthropo-sociologiques (perception et utilisation des traitements), opérationnels (effet résiduel du bendiocarb, couverture des bâches), biologiques (comportement des vecteurs) et épidémiologiques (faible niveau de transmission dans la zone d'étude).

Il mériterait maintenant de confirmer ou d'infirmer les résultats de cette stratégie dans un autre faciès entomologique (transmission et résistance de vecteurs) et épidémiologique afin de démontrer l'intérêt des ces combinaisons à l'échelle opérationnelle.

Mots clés : paludisme, *Anopheles gambiae*, *An. funestus*, gestion de la résistance, combinaison.

## SUMMARY

Combination of unrelated insecticides in the same dwelling is a possible strategy for insecticide resistance management in malaria vectors. These combinations aim to interrupt the transmission and to manage the insecticides resistance in vectors. Here, we investigated the combined efficacy of a Long Lasting Insecticidal Nets (LLIN) plus a Carbamate Treated Plastic Sheeting (CTPS) or an IRS using bendiocarb.

Under laboratory conditions, we tested the wash resistance of four different substrates. Then, the combined efficacy of a LLIN (PermaNet 2.0) plus a CTPS or an IRS using bendiocarb against resistant malaria vectors was investigated in experimental huts. Finally, through a randomized controlled trial in Ouidah-Kpomasse-Tori health district in south Benin, the impact of the use of LLIN alone and in combination with CTPS or IRS on malaria incidence and transmission as well as on the management of insecticide resistance in malaria vectors was assessed. Variation at 11 microsatellite loci was also investigated to assess the impact of intervention on the genetic structure of *Anopheles funestus*. Four malaria vector control strategies were evaluated:

- i) Long-Lasting Insecticidal Nets (LLNs) targeted coverage of children under 5 years old like the National Malaria Control Programme (control);
- ii) LLNs universal coverage of sleeping units (LLIN);
- iii) LLINs universal coverage + CTPS at the dose 200 mg/m<sup>2</sup>, re-impregnated every four months; recommended doses of bendiocarb for residual application are 100-400 mg/m<sup>2</sup> (LLIN + CTPS);
- iv) LLINs targeted coverage plus annual bendiocarb IRS (IRS).

Under laboratory, material made of polypropylene mesh provided the best wash resistance (up to 10 washes). In experimental huts, results showed a clear benefit for combining the two interventions in terms of blood feeding inhibition and mortality, notably in area where vectors are resistant to pyrethroids, carbamates (and organophosphorus). In contrast, randomized controlled trial did not show the benefit in terms of malaria transmission reduction, and malaria infection and disease reduction in children under 5 years old, when unrelated insecticides were combined in the same dwelling. Concerning resistance management in malaria vectors, the allelic frequency of *kdr* mutation increased during the 18 months of survey (from 29% to 84% on average). The genetic diversity of *An. funestus* population was not significantly affected since different genetic parameters (allele number, observed and expected heterozygosities) remained stable. The coverage rate of LLIN was satisfactory (75%), but the use rate (46%) was lower than the threshold fixed in the study (70%).

Results of the randomized controlled trial can be explained by several factors as anthropological and sociological factors (perception and use of the treatments), operational factors (residual life of the bendiocarb, wall coverage with CTPS), biological factors (vectors behavior) and epidemiological factors (low level of transmission in the study area).

It would be now useful to confirm or to invalidate these results in another entomological (transmission and resistance of vectors) and epidemiological facies in order to demonstrate the interest of these combinations at an operational scale.

Key words: malaria, *Anopheles gambiae*, *An. funestus*, insecticide resistance management, combination

# Sommaire

<b>Liste des figures</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des photos</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>x</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction et généralités</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introduction générale</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Généralités</b> .....	<b>6</b>
2.1. Le paludisme.....	6
2.1.1. Historique et généralités.....	6
2.1.2. Les parasites.....	7
2.1.3. Les vecteurs.....	8
2.1.4. Le cycle du paludisme.....	10
2.1.5. Stratégies de lutte anti vectorielle contre le paludisme.....	13
2.2. Les insecticides en santé publique, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et les stratégies de gestion de la résistance.....	15
2.2.1. Les insecticides en santé publique.....	15
2.2.1.1. Les organochlorés.....	16
2.2.1.2. Les carbamates.....	16
2.2.1.3. Les organophosphorés.....	16
2.2.1.4. Les pyréthrinoïdes.....	17
2.2.1.5. Les régulateurs de croissance.....	17
2.2.1.6. Les toxines bactériennes.....	17
2.2.2. Mécanismes de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme.....	17
2.2.2.1. La résistance métabolique.....	18
2.2.2.2. La résistance par modification de cible.....	19
2.2.3. Les stratégies de gestion de la résistance.....	20
2.2.3.1. Succès historiques de la gestion de la résistance.....	20



2.2.3.2. Utilisation d'insecticides à modes d'action différents.....	20
2.2.3.3. Utilisation de mélanges d'insecticides.....	21

**Chapitre 2 : Etudes au laboratoire et en cases expérimentales (phases I et II).....22**

**1. Etudes en laboratoire (phase I).....24**

1.1. Supports testés.....	24
1.2. Insecticide et résine.....	25
1.3. Lavages des supports imprégnés.....	25
1.4. Bio-essais.....	26
1.5. Test d'irritabilité.....	27
1.6. Analyse des résultats.....	27
1.7. Résultats.....	28
1.7.1. Efficacité du bendiocarb.....	28
1.7.2. Résistance aux lavages des différents supports imprégnés.....	28
1.7.3. Irritabilité des supports.....	31

**2. Etudes en cases expérimentales (phase II).....32**

2.1. Démonstration du « proof of principle » de la combinaison moustiquaire imprégnée de deltaméthrine et bâches murales imprégnées de bendiocarb.....	32
2.1.1. Description du site de l'étude.....	32
2.1.2. Traitement des cases.....	34
2.1.3. Méthode du lâcher-recapture.....	34
2.1.4. Indicateurs mesurés.....	35
2.1.5. Analyse des résultats.....	35
2.1.6. Résultats.....	35
2.2. Evaluation de l'efficacité de la combinaison des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à longue durée d'action avec du bendiocarb en imprégnation des bâches	

murales (ou en aspersion intradomiciliaire) en zone de résistance aux insecticides des vecteurs.....	38
2.2.1. Description du site de l'étude.....	38
2.2.2. Traitement des cases.....	38
2.2.3. Collecte des moustiques.....	39
2.2.4. Bio-essais.....	40
2.2.5. Génotypage.....	40
2.2.6. Indicateurs mesurés.....	40
2.2.7. Analyse des résultats.....	41
2.2.8. Résultats.....	41
2.2.8.1. Capture à blanc.....	41
2.2.8.2. Efficacité des traitements.....	42
2.2.8.3. Activité résiduelle des supports traités en cases expérimentales.....	44
2.2.8.4. Effet des traitements sur les gènes de résistance <i>kdr</i> et <i>ace I<sup>R</sup></i> .....	46
2.2.8.5. Effets secondaires.....	47
<b>3. Discussion et conclusion.....</b>	<b>48</b>
3.1. Discussion.....	48
3.2. Conclusion.....	51
<b>Chapitre 3 : Etudes à l'échelle communautaire (phase III).....</b>	<b>52</b>
<b>1. Données de base de la zone d'étude.....</b>	<b>53</b>
1.1. Description de la zone d'étude.....	54
1.1.1. Milieu naturel.....	55
1.1.2. Caractéristiques démographiques.....	55
1.1.3. Activités économiques.....	55
1.2. Collecte et traitements des données.....	56
1.2.1. Collecte et identification des moustiques.....	56
1.2.2. Traitement des moustiques.....	57
1.2.3. Collecte des données parasitologiques et cliniques.....	57

1.2.4. Analyse des résultats.....	58
1.3. Résultats.....	58
1.3.1. Densité et diversité des moustiques.....	58
1.3.2. Infection à l'antigène Circum Sporozoite Protein (CSP) et taux d'inoculation entomologique (TIE).....	63
1.3.3. Les gènes de résistance.....	65
1.3.4. Incidence palustre, densité parasitaire moyenne des infections, et prévalence de l'infection.....	66
<b>2. Évaluation en conditions naturelles d'utilisation de stratégies de lutte anti vectorielle contre le paludisme combinant deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations.....</b>	<b>70</b>
2.1. Stratégies de lutte anti vectorielle mises en place.....	70
2.2. Constitution des bras de traitement.....	70
2.3. Mise en place et suivi des interventions de lutte antivectorielle.....	71
2.3.1. Distribution des Moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD).....	71
2.3.2. Pulvérisation intra domiciliaire.....	72
2.3.3. Imprégnation et installation des bâches dans les habitations.....	73
2.3.4. Suivi de l'activité résiduelle du bendiocarb sur les différents supports imprégnés.....	75
2.3.5. Suivi des MILD.....	76
2.4. Collecte et traitement des moustiques.....	77
2.4.1. Collecte des moustiques.....	77
2.4.2. Identification et traitement des moustiques.....	78
2.5. Collecte des données parasitologiques et cliniques.....	78
2.6. Analyse des résultats.....	79
2.7. Résultats.....	80
2.7.1. Activité résiduelle du bendiocarb sur différents supports.....	80
2.7.2. Taux de couverture et taux d'utilisation des MILD.....	83
2.7.3. Comportement des vecteurs du paludisme en réponse aux moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (deltaméthrine) en combinaison avec du bendiocarb en aspersion intra domiciliaire ou en imprégnation de bâches murales.....	85
2.7.3.1. Exophilie.....	85
2.7.3.2. Taux de gorgement .....	87

2.7.4. Impacts de la combinaison deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur l'âge physiologique des vecteurs, l'agressivité des vecteurs et le TIE.....	89
2.7.5. Impact de la combinaison de deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur l'évolution de la fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i> .....	91
2.7.6. Impact de la combinaison de deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur l'incidence palustre, la densité parasitaire moyenne des infections, et la prévalence de l'infestation .....	92

<b>3. Discussion et conclusion.....</b>	<b>94</b>
3.1. Discussion.....	94
3.2. Conclusion.....	98

**Chapitre 4 : Impact de stratégies de lutte anti vectorielle contre le paludisme combinant deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur la structure des populations de *Anopheles funestus*.....100**

<b>1. Généralités sur la génétique des populations.....</b>	<b>102</b>
1.1. Estimation de la structuration des populations.....	102
1.1.1. Les méthodes directes.....	102
1.1.2. Les méthodes indirectes basées sur la génétique des populations.....	102
1.2. Les marqueurs en génétique des populations.....	103
1.3. Les marqueurs microsatellites.....	104
1.4. Modèles de mutation des marqueurs microsatellites.....	105

<b>2. Collecte, génotypage des moustiques aux loci microsatellites et analyse des données.....</b>	<b>106</b>
2.1. Echantillonnage des moustiques.....	106
2.2. Identification spécifique et génotypage aux loci microsatellites des moustiques.....	106
2.2.1. Extraction de l'ADN.....	106
2.2.2. Identification spécifique des moustiques par PCR.....	106
2.2.3. Génotypage aux loci microsatellites des moustiques.....	106
2.3. Analyse des résultats.....	108

<b>3. Résultats.....</b>	<b>109</b>
--------------------------	------------

3.1. Impact des interventions sur la diversité génétique des populations.....	109
3.2. Impact des interventions sur la structure génétique et la dynamique de la population....	111
3.3. Taille effective de la population.....	112
<b>4. Discussion et conclusion.....</b>	<b>113</b>
4.1. Discussion.....	113
4.2. Conclusion.....	114
<b>Chapitre 5 : Conclusions générales et perspectives.....</b>	<b>115</b>
<b>1. Contraintes opérationnelles de la lutte anti vectorielle.....</b>	<b>117</b>
<b>2. Contraintes anthropo-sociologiques de la lutte anti vectorielle.....</b>	<b>118</b>
<b>3. Comportement des vecteurs et lutte antivectorielle.....</b>	<b>119</b>
<b>4. Stratégies alternatives de lutte anti vectorielle.....</b>	<b>119</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>122</b>
<b>Annexe 1 : Curriculum Vitae.....</b>	<b>138</b>
<b>Annexe 2 : Articles.....</b>	<b>145</b>
<b>Annexe 3 : Protocoles.....</b>	<b>197</b>

# Liste des figures

**Figure 1.1** : Episodes du paludisme dans le monde

**Figure 1.2** : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels

**Figure 1.3**: Cycle du paludisme

**Figure 1.4** : Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez les insectes

**Figure 2-1** : Taux de mortalité des souches de *An. gambiae* en fonction de la dose du bendiocarb

**Figure 2-2** : Probabilité de survie de *An. gambiae* « Kisumu » en fonction du nombre de lavages de différents supports imprégnés au bendiocarb

**Figure 2.3** : Temps de premier envol de 50% des moustiques en fonction des supports

**Figure 2-3** : Modèle standardisé d'une case expérimentale pour les évaluations en phase II

**Figure 3-1** : Carte de la zone d'étude montrant les villages sélectionnés

**Figure 3-2** : Nombre moyen de Culicidés capturés par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

**Figure 3-3** : Nombre moyen de *An. funestus s.l.* capturés par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

**Figure 3-4** : Nombre moyen de *An. gambiae s.l.* capturés par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

**Figure 3-5** : Nombre de moustiques capturés par par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

**Figure 3-6** : Nombre moyen de piqûres infectantes par 100 personnes par nuit par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

**Figure 3-7** : Nombre de piqûres infectantes par personne par 100 nuits par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

**Figure 3-8** : Fréquence allélique du gène *kdr* dans les formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. d'octobre 2007 à mai 2008 dans la zone d'étude

**Figure 3-9** : Taux de mortalité (%) de la souche « Kisumu » d'*Anopheles gambiae* exposée aux différents supports à la 1<sup>ère</sup> imprégnation sur le terrain

**Figure 3-10** : Taux de mortalité (%) de la souche « Kisumu » d'*Anopheles gambiae* exposée aux différents supports à la ré-imprégnation sur le terrain

**Figure 3-11** : Taux de mortalité en % d'une population sauvage d'*Anopheles gambiae* exposée aux différents supports à la ré-imprégnation sur le terrain

**Figure 4-1** : Logarithme de la probabilité en fonction du nombre de clusters

# Liste des photos

**Photo 1.1** : Traitement des marécages

**Photo 2-1** : Moustiques en exposition

**Photo 2-2** : Cases expérimentales de la station expérimentale de Kétonou (Bénin)

**Photo 2-3** : Mur de case expérimentale couvert au 1/3 (a) et complètement (b) avec le polypropylène tissé imprégné de bendiocarb à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup>

**Photo 3-1** : Séance de sensibilisation sur l'utilisation des MILD

**Photo 3-2** : Pulvérisateur utilisée sur le terrain

**Photo 3-3** : Photo d'un morceau de bâche montrant la face laminée et marquée

**Photo 3-4** : Bâches imprégnées de bendiocarb installées dans une case avec une moustiquaire de type Permanet2®

**Photo 3-5** : Captures des moustiques par les fenêtres pièges



# Liste des tableaux

**Tableau 2-1** : Résultats de l'analyse de déviance du modèle de régression logistique

**Tableau 2-2** : Taux de mortalité et de gorgement de *An. gambiae* (ladji) après lâcher-recaptures en cases expérimentales (3 répliques)

**Tableau 2-3** : Taux de mortalité et de gorgement de *Cx. quinquefasciatus* (ladji) après lâches-recapture en cases expérimentales (3 répliques)

**Tableau 2-4** : Données de captures à blanc dans 6 cases expérimentales de la station VK7 (Burkina Faso)

**Tableau 2-5** : Efficacité des différents traitements (PermaNet®2.0, PID, BI) seul ou en association - résultats cumulés sur des populations sauvages d'*An. gambiae* (après 56 nuits de capture) en cases expérimentales à la Vallée du Kou (VK7, Burkina Faso)

**Tableau 2-6** : Taux de mortalité de la souche *Anopheles gambiae* « Kisumu » 10 jours après les traitements

**Tableau 2-7** : Taux de mortalité de la souche *Anopheles gambiae* « Kisumu » 21 jours après les traitements

**Tableau 2-8** : Taux de mortalité de la souche *Anopheles gambiae* « Kisumu » 120 jours après les traitements

**Tableau 2-9** : Taux de mortalité de la population locale de *Anopheles gambiae* « VK7 » 7 jours après les traitements

**Tableau 2-10** : Fréquences alléliques des mutations *kdr* (L1014F) et *ace I<sup>R</sup>* Fr(G119S) chez les moustiques morts et vivants selon le traitement

**Tableau 3-1** : Espèces de moustiques collectées d'octobre 2007 à mai 2008 dans la zone d'étude

**Tableau 3-2** : Nombre moyen d'accès palustres par 100 enfants – mois en fonction des villages, de décembre 2007 à avril 2008

**Tableau 3-3** : Nombre de formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$  de sang en fonction des villages, de décembre 2007 à avril 2008

**Tableau 3-4** : Prévalence de l'infestation palustre en fonction des villages, de décembre 2007 à avril 2008

**Tableau 3-5** : Taux de couverture, d'utilisation et état des moustiquaires en fonction des bras et des enquêtes de septembre 2008 à décembre 2009

**Tableau 3-6** : Taux d'expulsion de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement

**Tableau 3-7** : Taux d'expulsion de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement et de la fréquence de la mutation *kdr*

**Tableau 3-8** : Taux d'expulsion des formes moléculaires M et S de *An. gambiae s.s.* en fonction des bras de traitement

**Tableau 3-9** : Taux d'expulsion de *An. funestus* en fonction des bras de traitement

**Tableau 3-10** : Taux de gorgement de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement

**Tableau 3-11** : Taux de gorgement de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement et de la fréquence allélique de la mutation *kdr*

**Tableau 3-12** : Taux de gorgement des formes moléculaires M et S de *An. gambiae s.s.* en fonction des bras de traitement

**Tableau 3-13** : Taux de gorgement de *An. funestus* en fonction des bras de traitement

**Tableau 3-14** : Taux de parturité des vecteurs en fonction des traitements

**Tableau 3-15** : Nombre d'anophèles vecteurs (*An. gambiae* et *An. funestus*) capturés par 16 personnes\*nuit à chaque enquête de janvier à décembre 2009

**Tableau 3-16** : Taux d'agressivité et taux d'inoculation entomologique par traitement

**Tableau 3-17** Fréquence de la mutation *kdr* chez *An. gambiae* en fonction des villages (traitement) avant la mise en place des interventions

**Tableau 3-18**: Fréquence de la mutation *kdr* chez *An. gambiae* en fonction des traitements 6, 12 et 18 mois après la mise en place des interventions

**Tableau 3-19** : Nombre moyen d'accès palustres par 100 enfants – mois en fonction des interventions

**Tableau 3-20** : Nombre de formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$  de sang en fonction des interventions

**Tableau 3-21** : Prévalence de l'infestation palustre en fonction des interventions

**Tableau 4-1** : Taille, localisation et marquage des loci microsatellites utilisés

**Tableau 4-2** : Paramètres de variabilité génétique de la population de *An. funestus* dans les villages avant et après la mise en place des interventions

**Tableau 4-3** : Hétérozygotie observée avant et après traitement par village

**Tableau 4-4** : Test d'hétérozygotie au sein des populations de *An. funestus* des villages avant et après la mise en place des interventions

# **Chapitre 1 : Introduction et généralités**

## 1. Introduction générale

Le tiers des décès annuels dans le monde est imputable à des causes infectieuses ou parasitaires et parmi ces maladies, 18% sont transmises par des arthropodes (WHO, 1998). Les maladies à transmission vectorielle, lorsqu'elles ne sont pas mortelles, occasionnent de graves invalidités ou diminuent de façon significative l'espérance de vie des personnes infectées. C'est le cas de l'onchocercose, de la leishmaniose cutanéomuqueuse, de la filariose lymphatique, etc. Les arthropodes qui transmettent ces maladies appartiennent à différents ordres mais sont toujours caractérisés par leur comportement hématophage. Parmi ces arthropodes vecteurs, les moustiques (*Diptera : Culicidae*) constituent le plus important groupe avec plus de 3000 espèces répertoriées (Rodhain and Perez, 1985). Les moustiques assurent la transmission du paludisme, des fièvres hémorragiques (fièvre jaune, dengue), des filarioses lymphatiques et de nombreuses arboviroses. Le paludisme est l'affection parasitaire qui fait le plus de victimes dans le monde. En 2009, les cas de paludisme dans le monde ont été estimés à 225 millions avec 781 000 décès (WHO, 2010). Au Bénin, le paludisme se situe au premier rang des affections des enfants de moins de 5 ans, devant les affections respiratoires et les diarrhées. En 2007, 43% des consultations des enfants de moins de 5 ans étaient dues au paludisme. Durant cette même année, l'incidence de la maladie a été estimée chez les enfants âgés de moins de 12 mois à 53 accès palustres pour cent enfants par an et chez ceux âgés de 1 à 4 ans à 23 accès palustres pour cent enfants par an (Ministère de la Santé de la République du Bénin, 2007). Ces estimations sont certainement en deçà de la situation réelle de la morbidité palustre au Bénin. En effet, le taux de fréquentation des formations sanitaires reste faible (37% en 2005) et peut beaucoup varier d'un endroit à l'autre. De plus, l'insuffisant niveau de collecte et de traitement de l'information statistique disponible en matière de paludisme ne permet pas d'apprécier de manière exhaustive le poids de cette maladie au Bénin.

A plusieurs reprises, durant ces cent dernières années, l'homme a cru pouvoir contrôler le paludisme. Il fallut attendre 1945 et la fin de la Seconde Guerre mondiale pour que la lutte antipaludique trouve un nouveau souffle avec la découverte des insecticides de synthèse et, notamment, du DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), identifié comme insecticide par Muller en 1939. Dans cette situation d'optimisme, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1955 lança son projet ambitieux : « l'éradication totale du paludisme ». Les années suivantes connurent une période d'euphorie dans plusieurs pays d'Europe, d'Afrique, d'Amérique et d'Asie où le paludisme était contrôlé et avait parfois même disparu. Quelques temps plus tard, au cours des années 70, le monde s'est rendu compte que « l'éradication du paludisme » n'était pas possible, et les campagnes « d'éradication » ont alors fait place au « contrôle ». En 1992, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait considéré que le moment était venu de « relancer l'offensive contre le paludisme » et a développé une stratégie qui a été adoptée par la conférence internationale sur le paludisme

organisée à Amsterdam la même année. En 1999, l’OMS a relancé une nouvelle initiative mondiale contre le paludisme : « Roll Back Malaria » (Faire Reculer le Paludisme), dont l’objectif premier était de diminuer, voire de supprimer, la mortalité due au paludisme en appliquant les directives du Programme mondial de Lutte contre le Paludisme (Amsterdam, 1992). Selon le rapport de l’année 2005 de cette initiative, 107 pays du monde se trouvent dans des zones exposées au risque de transmission palustre, ce qui représente 3,2 milliards de personnes (40% de la population mondiale), réparties essentiellement dans les zones chaudes et humides de la planète (WHO, 2005). Toujours dans le cadre d’un meilleur contrôle de la maladie, les chefs d’Etat et de Gouvernement de l’Afrique sub-saharienne ont proposé, comme objectifs à Abuja en 2000, de réduire de moitié la mortalité et la morbidité palustres d’ici 2010 (Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin, 2005). Quant aux Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD), le taux de mortalité des enfants de moins de 5 ans devrait être réduit de deux tiers d’ici 2015. Pour atteindre tous ces objectifs, l’OMS recommande de lutter simultanément contre le vecteur et contre le parasite. Ainsi, au Bénin, comme dans beaucoup d’autres pays en Afrique au Sud du Sahara, le plan stratégique national de lutte contre le paludisme repose depuis lors sur 3 composantes majeures à savoir : i) le traitement curatif précoce par les Combinaisons Thérapeutiques à base d’Artémisinine (CTA) ; ii) le Traitement Préventif Intermittent (TPI) par la Sulfadoxine-Pyriméthamine chez la femme enceinte ; iii) la lutte antivectorielle. Cette dernière est basée sur l’utilisation des Moustiquaires Imprégnées d’Insecticide à Longue Durée d’action (MILD), la Pulvérisation Intradomiciliaire (PID) d’insecticide et l’épandage des larvicides biologiques tels que *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) (Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin, 2005). L’utilisation des Moustiquaires Imprégnées d’Insecticide à Longue Durée d’action a été généralisée et un effort particulier est fait pour la promotion et la vulgarisation de cet outil de lutte antivectorielle au sein des communautés. Pour l’imprégnation des moustiquaires, seuls les pyréthrinoïdes sont recommandés par l’OMS à cause de leur efficacité à faible dose et leur faible toxicité pour les mammifères (Zaim *et al.*, 2000). Mais souvent, l’emploi massif des insecticides en santé publique et surtout en agriculture est accompagné d’une sélection de la résistance chez les vecteurs cibles (Akogbéto *et al.*, 2006, Chouaibou *et al.*, 2008, Mouchet, 1988, Yadouleton *et al.*, 2009). L’OMS, en 1987, a signalé la résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. arabiensis* au Soudan et chez *An. gambiae* au Nigeria (WHO, 1976). Il s’agissait de données anciennes de la littérature datant de 1975. Cette résistance fut observée après sélection au laboratoire et demeurait relativement faible (Malcolm, 1988). En 1993, la résistance aux pyréthrinoïdes a été mise en évidence en Côte d’Ivoire dans des populations naturelles de *An. gambiae* (Elissa *et al.*, 1993). Chandre *et al.* (1999) ont confirmé cette résistance et montré qu’elle s’étendait à d’autres pays au Sud du Sahara dont le Bénin (Chandre *et al.*, 1999). Elle s’étend maintenant à l’Afrique centrale et à l’Afrique de l’est (Abdalla *et al.*, 2008, Etang *et al.*, 2003, Kera-Hinzoumbe *et al.*, 2008, Nwane *et al.*, 2009, Vulule, 1999). Au Bénin, la résistance

des vecteurs du paludisme aux pyréthriinoïdes observée d'abord à Cotonou s'étend dans les régions méridionale et centrale du pays, mais aussi dans certaines localités de la région septentrionale (Akogbéto and Yakoubou, 1999, Corbel *et al.*, 2007, Yadouleton *et al.*, 2010).

Une étude menée récemment au Bénin en casés expérimentales a montré que la résistance aux pyréthriinoïdes des vecteurs du paludisme réduit sensiblement l'efficacité des moustiquaires imprégnées et de l'aspersion intradomiciliaire avec la lambdacyhalothrine (N'Guessan *et al.*, 2007). A l'heure actuelle donc, la lutte contre les vecteurs du paludisme en Afrique de l'ouest, pour être efficace, doit reposer sur des stratégies de gestion de la résistance aux insecticides de ces vecteurs. Il est alors urgent de trouver des stratégies alternatives pour la gestion de la résistance aux pyréthriinoïdes des vecteurs du paludisme. Pour la gestion de la résistance aux pyréthriinoïdes des vecteurs du paludisme, plusieurs auteurs ont expérimenté l'utilisation des combinaisons d'insecticides ayant différents modes d'action (Guillet *et al.*, 2001, Hougard *et al.*, 2003, WHO, 2009).

Dans le présent travail de thèse intitulé : « **Stratégies de gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme et impact opérationnel en Afrique de l'Ouest** », nous avons mené des recherches sur des stratégies de gestion de la résistance aux pyréthriinoïdes des vecteurs du paludisme. Ces stratégies combinent deux traitements insecticides résiduels (les moustiquaires imprégnées de deltaméthrine (pyréthriinoïde) à longue durée d'action et le bendiocarb (carbamate) en imprégnation de bâches murales ou en aspersion intradomiciliaire) à l'intérieur des habitations.

Trois hypothèses justifient ce travail à savoir :

- i) le bendiocarb est efficace contre les moustiques résistants aux pyréthriinoïdes ;
- ii) la combinaison à l'intérieur d'une même habitation du bendiocarb en imprégnation de bâches murales (ou en aspersion intradomiciliaire) et des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à longue durée d'action (MILD) est plus efficace que les MILD seules pour réduire la transmission du paludisme, l'infection et la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans en zone de résistance des vecteurs aux pyréthriinoïdes ;
- iii) cette combinaison est efficace pour ralentir l'évolution de la résistance aux pyréthriinoïdes des vecteurs du paludisme.

Le principal objectif visé par cette étude a été d'évaluer l'impact opérationnel de la combinaison du bendiocarb (en imprégnation de bâches murales ou en aspersion intradomiciliaire) et des MILD à l'intérieur d'une même habitation sur la transmission du paludisme, l'infection et la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans d'une part, et d'autre part, sur la dynamique de la résistance aux pyréthriinoïdes des vecteurs.

Nos objectifs spécifiques ont été de :

- i) tester au laboratoire (phase I), l'efficacité et la résistance aux lavages de 4 différents supports imprégnés de bendiocarb avec ou sans une résine fixatrice, afin d'identifier le meilleur support à utiliser ;
- ii) tester en cases expérimentales, par des lâcher-recaptures de moustiques sauvages résistants, la combinaison de la moustiquaire imprégnée de deltaméthrine avec le meilleur support imprégné de bendiocarb (la couverture complète et la couverture du tiers supérieur des murs avec ce support imprégné ont été testées afin de déterminer la façon optimale de couvrir les murs avec les bâches imprégnées de bendiocarb à l'échelle opérationnelle) ;
- iii) tester en cases expérimentales (phase II), en zone de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, l'efficacité en termes de réduction du contact homme-vecteur et de gestion de la résistance des combinaisons de bendiocarb et de MILD comparées aux mono traitements ;
- iv) évaluer à l'échelle communautaire (phase III) dans la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori (Zone d'étude), l'impact sur la transmission du paludisme, l'infection et la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans, et sur la dynamique de la résistance, de la combinaison à l'intérieur d'une même habitation du bendiocarb en imprégnation de bâches murales (ou en aspersion intradomiciliaire) et des MILD.

Enfin, une étude de la structuration génétique des populations de *Anopheles funestus* et de l'impact des stratégies de lutte antivectorielle sur cette structuration a fait l'objet de la dernière partie de la présente thèse.

Avant de présenter les résultats de nos travaux, nous fournirons dans la suite de ce chapitre quelques généralités sur le paludisme et les stratégies de lutte contre cette maladie. Nous parlerons ensuite des insecticides utilisés en santé publique contre les vecteurs du paludisme. Les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides et les stratégies de gestion de cette résistance seront enfin évoqués.

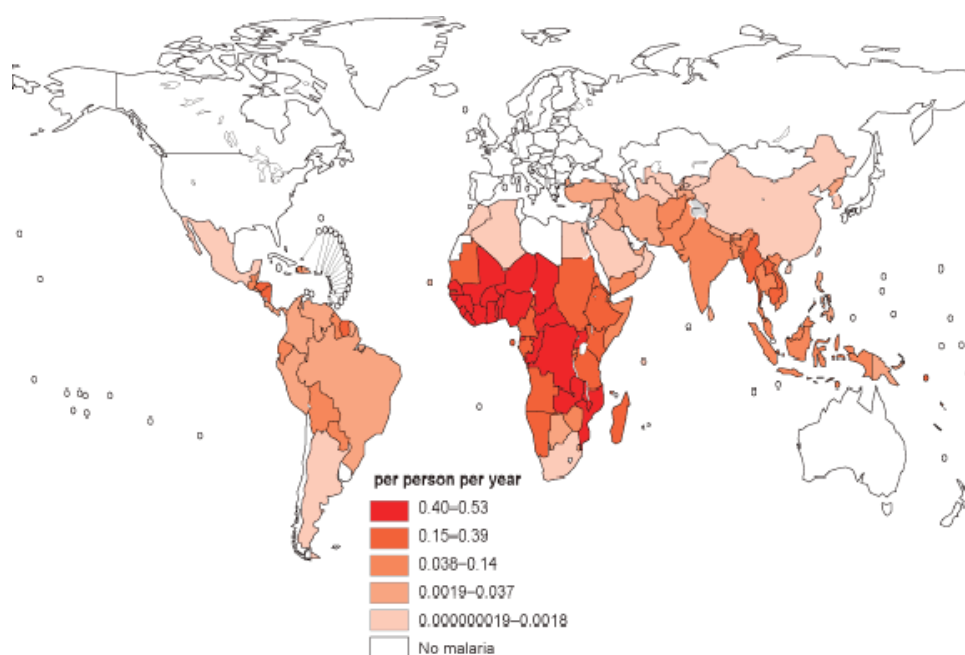


## 2. Généralités

### 2.1. Le paludisme

#### 2.1.1. Historique et généralités

Hippocrate et d'autres médecins ou hommes de science de l'Antiquité ont décrit des symptômes ressemblant à ceux connus aujourd'hui comme étant les symptômes du paludisme. Mais c'est un ancien élève de Louis Pasteur, Charles Louis Alphonse Laveran qui, en 1880, a identifié l'agent pathogène causant le paludisme. A partir de ce moment, et après que Ronald Ross en 1892 et Giovanni Battiste Grassi en 1898 eurent élucidé la liaison étroite entre la maladie et le « milieu » par l'intermédiaire des anophèles, un grand nombre d'illustres médecins, biologistes et chercheurs ont contribué à la connaissance de la maladie, du vecteur et du parasite. Le paludisme n'était plus une maladie à l'apanage de l'Europe et du Bassin méditerranéen mais une maladie qui sévissait dans la plupart des zones tropicales (figure 1.1).



**Figure 1.1** : Episodes du paludisme dans le monde

D'après rapport annuel de l'OMS sur le paludisme (2005)

Le paludisme est la plus fréquente des infections parasitaires observées dans le monde (WHO, 1998). Il se manifeste chez l'homme par de fortes poussées de fièvre survenant à intervalles réguliers, dues à l'infection des globules rouges par un pathogène parasite protozoaire appartenant au genre *Plasmodium* (*Haemosporidia* : *Plasmodidae*).

La transmission de ce parasite d'un hôte humain vers un autre se fait *via* la piquûre des moustiques femelles du genre *Anopheles* en quête de leur repas de sang. Plus d'un siècle après la découverte du cycle complet du paludisme, cette maladie reste de nos jours un fléau majeur pour la santé humaine. Néanmoins, les adultes des régions où le paludisme est holo ou hyper-endémique ayant acquis une prémunition contre les accès graves, les infections asymptomatiques sont très fréquentes dans les pays touchés par le paludisme, et *P. falciparum* représente 90% des infections.

Beaucoup d'efforts ont été faits, mais la situation continue d'être alarmante. Il y a des obstacles importants pour lutter efficacement contre cette maladie qui est un problème de santé publique considérable, en premier lieu, le manque de financement. Le fonds mondial pour le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme (Global Fund Tuberculosis, Aids & Malaria, GFATM), attribue annuellement 2,1 milliards de dollars au contrôle de ces maladies. Bien que ces chiffres puissent sembler impressionnants, les évaluations montrent que le VIH/SIDA aurait besoin, à lui seul, de 7,5 milliards de dollars pour son simple contrôle.

Le paludisme est aussi un fardeau économique et pour pouvoir contrôler cette maladie, il faudrait des efforts importants de restructuration des systèmes opérationnels de la lutte. Beaucoup de pays endémiques perdent des ressources simplement en raison des pertes de jours de travail causées par la maladie. Le paludisme est un frein à l'expansion économique de ces pays et absorbe également une part importante du budget destiné à la santé publique.

L'infrastructure de la santé publique est un autre problème majeur. Beaucoup de nations endémiques n'ont pas de systèmes de santé en place suffisants pour instruire, pour diagnostiquer et distribuer les traitements efficaces et adaptés.

### **2.1.2. Les parasites**

Le paludisme est dû à un parasite protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe quatre espèces de ce genre qui causent la maladie chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Le paludisme est présent dans toutes les zones tropicales ou sub-tropicales du monde. Il y a des foyers en Amérique du Sud, en Afrique et dans le Sud-est asiatique. Cette large répartition entraîne une grande variabilité évolutive qui a permis à cette maladie de s'adapter à autant d'environnements divers. Néanmoins, la répartition des quatre parasites du genre *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, et *P. falciparum*) qui causent la maladie chez l'homme, n'est pas égale :

- *Plasmodium vivax*, représente autour de 10-20% des cas de paludisme dans le monde (70-80 millions de personnes affectées) (Mendis *et al.*, 2001). Il a la plus large distribution. Il fut présent en Norvège, à New York et même en Sibérie. Cependant, à cause d'une incompatibilité des antigènes du groupe sanguin, il n'est pas très répandu en Afrique de l'ouest. Il est présent sur tous les

continents mais 80-90% des cas d'infection due au *P. vivax*, ont lieu en Asie et dans le Pacifique (Mendis *et al.*, 2001).

- *Plasmodium ovale*, beaucoup plus rare et de moindre importance, il a une répartition plus restreinte en Afrique sub-saharienne et dans quelques îles de l'Océan Pacifique (Lysenko and Beljaev, 1969).

- *Plasmodium malariae* est le moins important à cause de sa faible distribution uniquement en Afrique sub-saharienne.

- *Plasmodium falciparum* est le parasite le plus important car l'infection due à ce parasite peut être mortelle. *Plasmodium falciparum* est présent dans tous les foyers de paludisme, en Amérique Latine, en Asie ou en Afrique où 70% des cas d'infection due au *Plasmodium falciparum* dans le monde sont enregistrés (Snow *et al.*, 2005).

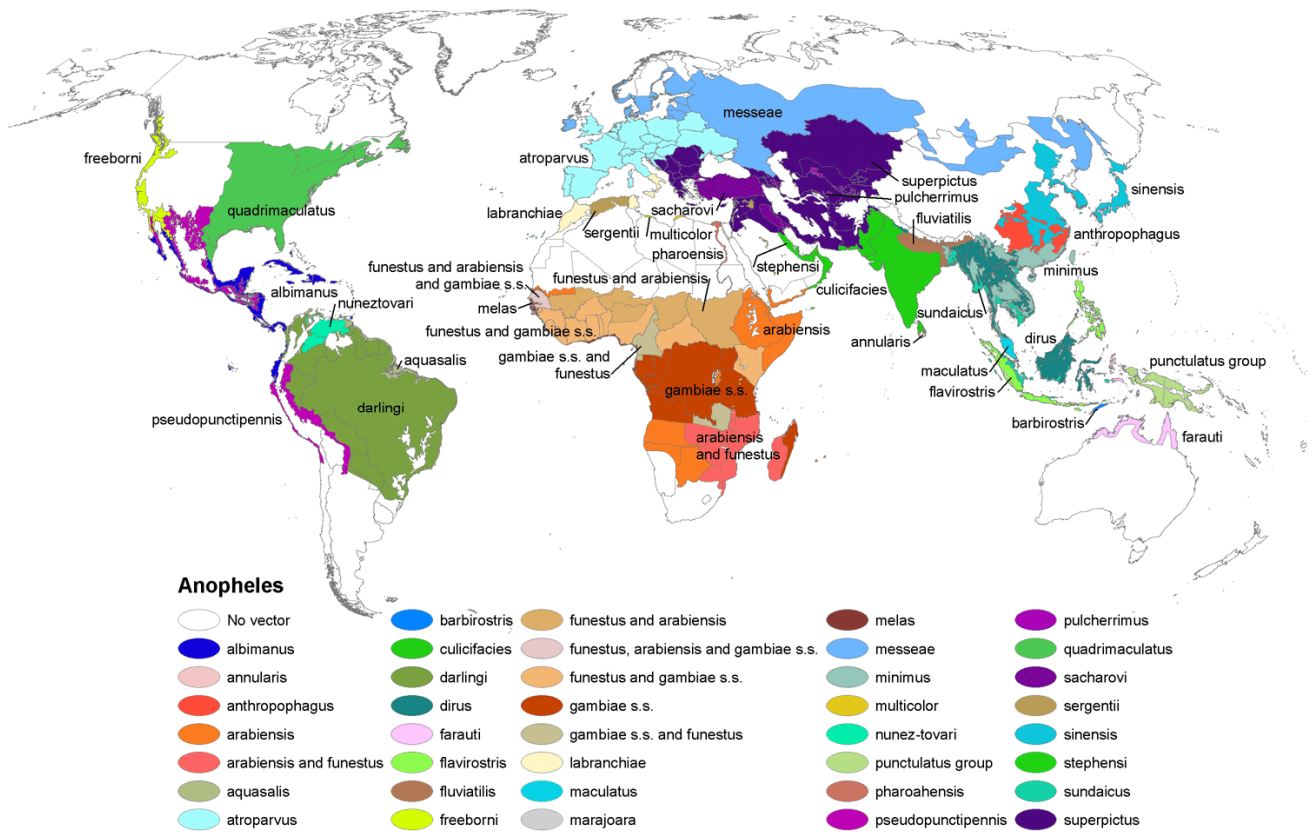
- *Plasmodium knowlesi*, génétiquement proche de *Plasmodium vivax*, et microscopiquement proche de *Plasmodium malariae*, ce parasite a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie. IL est toutefois à noter qu'il était connu antérieurement chez le singe.

### 2.1.3. Les vecteurs

Le paludisme est une maladie à transmission vectorielle. Il est transmis par des moustiques du genre *Anopheles*. La grande diversité des parasites dans le monde a une relation directe avec la diversité de ces vecteurs. Le cycle de vie de *P. falciparum* est hétéroxène à deux hôtes obligatoires : l'homme est l'hôte intermédiaire et l'anophèle vecteur est l'hôte définitif. Si *P. falciparum* est spécifique de son hôte intermédiaire, infectant exclusivement l'homme en conditions naturelles, il peut être transmis en revanche plusieurs espèces de vecteur au sein du genre *Anopheles*. Jusqu'à nos jours, 484 espèces réparties sur l'ensemble des 5 continents ont été décrites, environ 70 espèces d'anophèles ont été impliquées dans la transmission du paludisme (Kiszewski *et al.*, 2004) (figure 1.2). Par conséquent, la coévolution hôte/parasite a un effet direct sur cette maladie. Les contraintes liées à l'infestation de l'hôte, au développement au sein de l'environnement hôte, et à sa transmission vers d'autres hôtes, entraînent la spécialisation extrême des parasites vis-à-vis de leurs espèces hôtes. Les contextes de la transmission palustre sont, de plus, très hétérogènes, à la fois dans l'espace et dans le temps. L'existence de fortes variations saisonnières de la transmission au sein d'un même site est accompagnée de la participation de différentes espèces vectrices (Fontenille and Simard, 2004).

Dans la plupart des endroits d'Afrique, plusieurs espèces de vecteur transmettent le paludisme simultanément, ou se remplacent de façon saisonnière. Ces vecteurs diffèrent largement dans leur densité et leur capacité vectorielle. L'identification précise des anophèles est donc un préalable pour la mise en place de mesures de contrôle appropriées, spécifiquement et sélectivement orientées sur

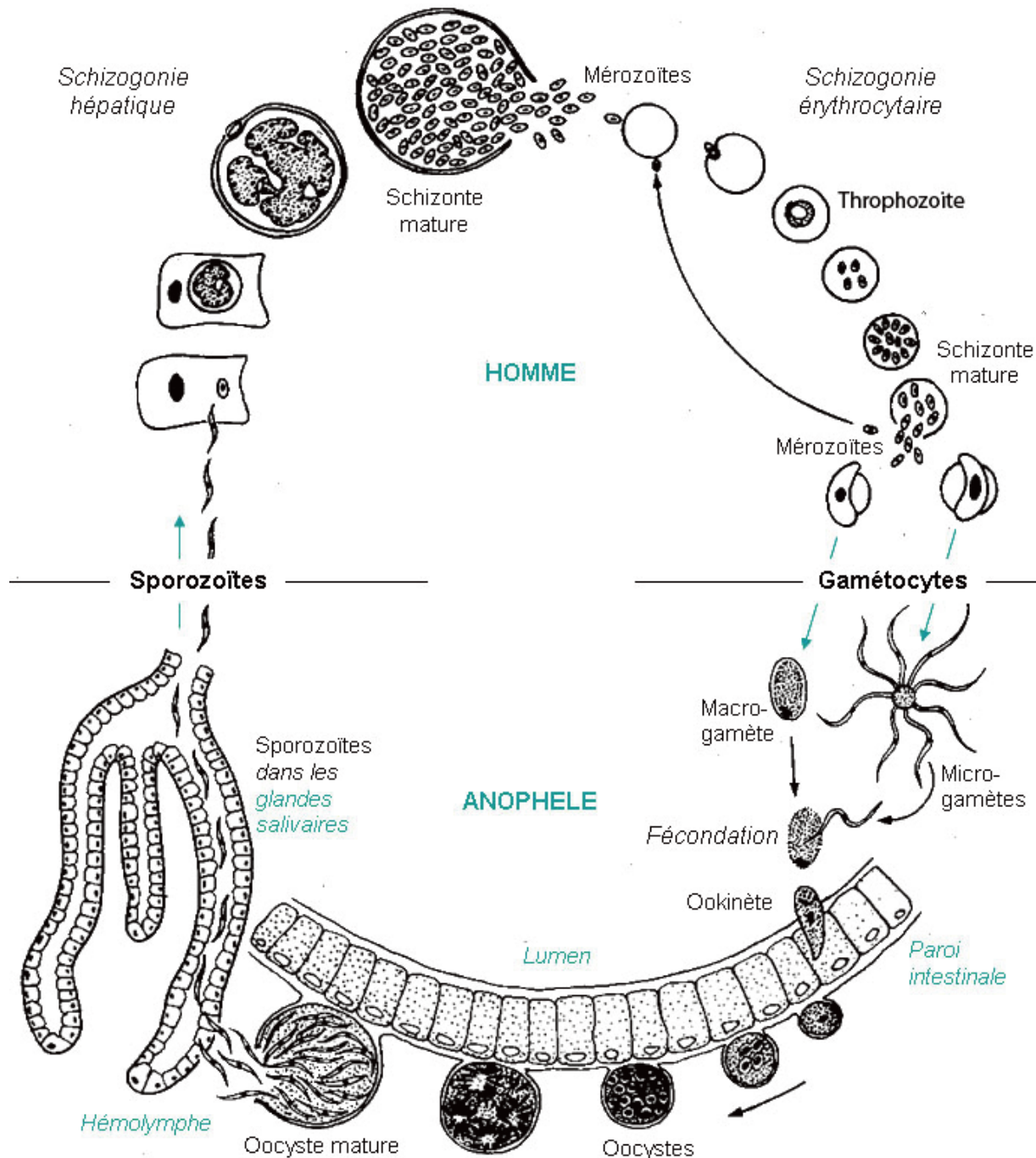
les cibles adéquates. IL existe plusieurs exemples d'une mauvaise prise en charge de la lutte antivectorielle suite à la mauvaise identification de l'espèce vectrice (Hargreaves *et al.*, 2003, Hargreaves *et al.*, 2000). D'ailleurs, parce que la plupart des traits phénotypiques de moustique relatifs à l'épidémiologie de la maladie ou son contrôle (préférence trophique, compétence vectorielle, ou la résistance aux insecticides) sont génétiquement codés, la structure intra spécifique de la population doit être connue et les flux de gènes entre populations être évalués (Fontenille and Simard, 2004). Les développements récents en génétique des populations et en entomologie moléculaire ont permis un progrès significatif dans cette voie. L'importance des espèces d'anophèles dans la transmission du paludisme en Afrique n'est pas la même. Des 140 espèces anophéliennes présentes en Afrique, 20 ont été retrouvées avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires (Mouchet *et al.*, 2004). Cinq espèces, *Anopheles gambiae s.s* (avec deux formes moléculaires M et S), *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus s.s*, *Anopheles moucheti* et *Anopheles nili*, sont considérées comme les « vecteurs majeurs » et responsables de plus de 95% de la transmission totale du paludisme sur le continent (Mouchet *et al.*, 2004). Moins de 5% de cette transmission étant assuré par des « vecteurs secondaires » ou « vecteurs d'importance locale » (Mouchet *et al.*, 2004). Ces espèces « mineures », ne sont pas importantes dans la transmission du parasite à cause d'éléments liés à l'environnement et/ou à leur comportement vis-a-vis de l'homme (facteurs extrinsèques). Ces facteurs, avec des facteurs intrinsèques, comme la compétence vectorielle, interviennent pour minimiser leur rôle vecteur (Billingsley and Sinden, 1997). De très nombreuses infections expérimentales ont été réalisées pour élucider les mécanismes de la résistance et les limites de la compatibilité des populations de vecteurs aux populations de parasites (Boete, 2005). Néanmoins, de grandes différences entre les résultats du laboratoire et ceux du terrain démontrent qu'il y a encore de nombreuses questions sur la co-évolution du moustique et du parasite (Cohuet *et al.*, 2008, Cohuet *et al.*, 2006).



**Figure 1.2** : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels (Kiszewski *et al.*, 2004)

#### 2.1.4. Le cycle du paludisme

Le paludisme est le résultat de l'interaction entre l'homme, le moustique, du genre *Anopheles*, et le parasite, du genre *Plasmodium* et l'environnement de ces 3 acteurs du cycle. De leur interaction réciproque et plus ou moins longue dépend, dans une certaine mesure, la transmission de cette maladie. Son bon déroulement nécessite des conditions environnementales, climatiques et écologiques précises et particulières aux diverses espèces de parasites et d'anophèles. Le cycle des *Plasmodium* comporte un passage alterné par un vertébré (hôte intermédiaire, où se déroule la partie asexuée du cycle) et un moustique anophèle (hôte définitif, où la reproduction sexuée a lieu) (figure 1.3).



**Figure 1.3:** Cycle du paludisme

D'après Thèse Z. Annan, 2007

Le parasite, sous la forme de sporozoïte, est transmis à l'homme par la piqûre de l'anophèle femelle lors de la prise de son repas sanguin. Environ 1 à 50 sporozoïtes sont injectés au cours de la piqûre (Beier, 1998), rapidement ils disparaissent de la circulation sanguine (1/2 heure plus tard) et se retrouvent dans le foie. Chaque sporozoïte pénètre dans une cellule hépatique où il devient une forme incapable de se déplacer. Il se transforme en un schizonte qui grossit et dont le noyau se divise plusieurs fois.

Après une durée moyenne de 6 à 15 jours, le cytoplasme de l'hépatocyte est envahi par une masse contenant plusieurs milliers de mérozoïtes, le schizonte. Chaque schizonte va éclater et libérer les

mérozoïtes pré-érythrocytaires dans la circulation sanguine (entre 10.000 à 30.000 chez *P. falciparum* et entre 2.000 à 15.000 pour les autres *Plasmodium* humains), où chacun va pénétrer dans une hématie. Dans chaque hématie envahie par un mérozoïte se déroule un cycle de reproduction asexuée donnant un trophozoïte. À l'issue de chaque cycle, les trophozoïtes des hématies parasitées éclatent, généralement de façon synchrone entraînant les signes cliniques de la maladie (fièvre, tremblement, courbature, etc.). Les mérozoïtes érythrocytaires libérés envahissent des hématies saines. La durée de la reproduction asexuée et le nombre de mérozoïtes obtenus sont caractéristiques de chaque espèce : 48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*, et 72 heures pour *P. malariae*. Plusieurs cycles se succèdent ainsi.

Certains mérozoïtes se différencient après environ une semaine en une forme sexuée transmissible et infectante pour le moustique, le gamétocyte (mâle et femelle), entamant ainsi la phase sexuée du parasite. Ces cellules restent en attente dans leurs hématies circulantes, mais elles ne se divisent plus. Elles ont la capacité de persister ainsi plusieurs mois dans la circulation périphérique du malade après sa guérison tout en restant infectantes pour le vecteur (Nassir *et al.*, 2005). Chez le vecteur, la phase sexuée du parasite débute par l'ingestion de gamétocytes mâles et femelles circulant dans le sang périphérique de l'hôte lors du repas de sang pris par la femelle anophèle. Les gamétocytes mâles et femelles ingérés s'échappent rapidement de l'enveloppe érythrocytaire et se différencient respectivement en microgamètes mâles et macrogamètes femelles. Dans les 15 minutes suivant l'ingestion, le gamétocyte mâle subit trois cycles de mitoses, formant 4 à 8 gamètes rendus très mobiles par exflagellation. La fécondation entre gamètes mâles et femelles a lieu moins d'une heure après l'ingestion. Le zygote diploïde issu de la fécondation subit la méiose au sein de l'enveloppe nucléaire qui ne se divise pas. Le zygote se différencie en ookinète mobile et franchit la matrice péritrophique 19 à 36 heures après l'ingestion du repas sanguin par la femelle anophèle. L'ookinète se glisse ensuite à travers ou entre les cellules épithéliales de la membrane du tube digestif de l'anophèle, processus d'invasion qui déclenche les réponses immunitaires du moustique (Dimopoulos, 2003). Le contact avec la membrane basale inhibe l'activité mobile et le cycle cellulaire reprend au sein du zygote. L'ookinète se différencie alors en oocyste sphérique, dont le noyau diploïde se divise, et subit des mitoses successives, aboutissant à la formation de sporoblastes contenant plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes (2.000 – 8.000). Sa maturation dure de 4 à 21 jours pour *P. falciparum* selon la température. A maturité, les sporozoïtes perforent activement la capsule de l'oocyste et la lame basale et sont libérés dans l'hémolymphe (Wang *et al.*, 2005). Ils migrent ensuite majoritairement vers les glandes salivaires où ils peuvent rester infectants pendant toute la durée de vie du moustique. Ils seront injectés à l'hôte vertébré avec la salive lors de la piqûre et un nouveau cycle recommence.

### 2.1.5. Stratégies de lutte antivectorielle contre le paludisme

La première méthode de prévention utilisée déjà au temps d'Hippocrate tenait compte de l'environnement en évitant de construire et de vivre dans les zones « insalubres », ces zones marécageuses qui « provoquaient des fièvres ». A partir de l'extraction de la quinine découverte au Pérou en 1820 par des jésuites en observant l'usage qu'en faisaient les Incas pour combattre les fièvres, une mesure de protection contre les fièvres était mise en place, utilisée par les voyageurs même s'ils ne connaissaient pas encore la cause de ces épisodes fébriles. C'était à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, avec la découverte de l'agent pathogène et du mode de transmission que l'attitude de la communauté médicale changea vis-à-vis du paludisme. A ce moment, la prévention de la maladie par suppression du maillon intermédiaire, l'anophèle, fut considérée comme la base de la lutte antipaludique (Photo 1.1).



**Photo 1.1** : Traitement des marécages en Europe au XIX<sup>e</sup> siècle

La découverte par Muller en 1939, de l'effet insecticide du DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane) marqua un tournant dans la lutte antipaludique. Ce nouveau produit facile à manipuler, peu coûteux, avec une bonne rémanence permettait d'obtenir de grands effets sur les populations de moustiques anophèles dans diverses zones de la planète concernées par ce problème. Au vu des résultats, en 1955 lors de la 8<sup>ème</sup> Assemblée Mondiale de la Santé au Mexique, l'OMS lançait le Programme Mondial d'Eradication. Le principe de base en était l'interruption de la transmission par des campagnes de Lutte Antivectorielle (LAV) limitées dans le temps, accompagnées d'un suivi médical avec la chloroquine et l'aménagement du territoire. Malgré le grand optimisme présent au sein de la communauté scientifique et médicale, la résistance aux insecticides chez le vecteur et aux médicaments chez le parasite dans tous les foyers de cette maladie, fut considérée comme un obstacle majeur sur la route de l'éradication. La résistance au



DDT apparut dès 1951 en Grèce, alors que la résistance aux médicaments, en particulier à la chloroquine, posa un problème dans les années 1960, sur les frontières Colombie-Vénézuéla et Thaïlande-Cambodge (Mouchet, 1994). Ces inconvénients, ajoutés à l'impossibilité d'interrompre définitivement le cycle sur le continent africain, le plus frappé par cette maladie, entraînèrent l'échec de cette stratégie.

En 1969, lors de la 22<sup>ème</sup> Assemblée mondiale de la santé, on entérina cet échec mais l'éradication restait toujours l'objectif final et une nouvelle stratégie fut mise en place en 1972. Le grand effort réalisé lors des campagnes d'éradication a permis de développer et d'étudier d'autres aspects concernant la maladie, comme par exemple l'étude du parasite, du vecteur et de l'environnement humain. Nombreuses ont été les missions scientifiques et expériences dans ces domaines, lesquelles ont servi à mieux comprendre les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui affectent le développement de la maladie dans les différents environnements. C'est durant ces années que la base des actuels moyens de lutte contre le paludisme a été mise en place : l'identification et séparation entre vecteurs majeurs et secondaires, l'étude du cycle du parasite et la réponse à l'infection chez l'homme et chez le vecteur, ainsi que le développement des nouvelles molécules et thérapies pour combattre cette maladie. Parmi les stratégies de lutte contre le vecteur, l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide. Cet outil qui est une découverte de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) en 1983 a été une des grandes avancées innovatrices, et ses effets bénéfiques ont été largement démontrés (Hougard *et al.*, 2002).

A la suite de la Conférence d'Amsterdam (1992), une stratégie mondiale révisée de la lutte contre le paludisme fut proposée. Elle fut revue par le Conseil Economique et Social des Nations unies et adoptée par l'Assemblée générale de l'ONU en 1995. Cette Stratégie mondiale définie par l'OMS repose sur le diagnostic rapide et le traitement efficace de tous les cas; la planification et la mise en œuvre de mesures préventives, sélectives et durables incluant la lutte antivectorielle; la prévention, la détection et le contrôle des épidémies dès leurs phases initiales; et l'amélioration des capacités locales en recherches de base et appliquées pour permettre une évaluation permanente de la situation du paludisme (Najera, 2001).

La recherche d'un vaccin efficace et largement accessible à la population mondiale, en particulier la population africaine, a été et est encore le rêve d'une grande partie de la communauté scientifique et politique. De nombreuses études ont été conduites sur ce sujet, avec plus ou moins d'échecs, mais dans certains cas, elles ont amené à de nouvelles pistes pour des recherches actuelles. Aujourd'hui, de nombreuses études sont en cours avec plus ou moins de succès (Alonso *et al.*, 1994). Néanmoins, la date la plus optimiste pour l'éventuelle sortie d'un vaccin est fixée aux alentours de 2015-2020, en espérant un complet succès dans leurs études.

D'anciennes études sur la transmission du parasite par le vecteur ont aplani le terrain pour de nouvelles études moléculaires et génétiques sur la recherche des gènes impliqués dans le système

immun du moustique pendant l'infection des *Plasmodium*. Elles visent à remplacer des populations de moustiques par d'autres ayant perdu la capacité d'héberger et/ou de transmettre le parasite. Ces vecteurs génétiquement modifiés réfractaires à l'infection devront, une fois relâchés dans la nature, remplacer les populations vectrices naturelles, ainsi que diminuer voire stopper la transmission (Alphey *et al.*, 2002, Marrelli *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs facteurs sont en jeu, et l'efficacité d'une telle approche sur le terrain reste encore un défi. L'hétérogénéité des vecteurs (plus de 70 espèces vectrices d'anophèles), la diversité des habitats et des comportements parmi les populations sauvages, ainsi que l'énorme diversité génétique du parasite, rendent difficile le remplacement dans la nature des populations sauvages par des souches de moustiques réfractaires. Malgré ces difficultés, différentes études ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur le moustique et sa biologie, qui serviront dans un futur proche pour de nouvelles voies de lutte (Boete, 2005). La recherche des gènes candidats a concerné le système immunologique du moustique, mais aussi, grâce au développement technique, plusieurs études ont été menées pour discerner la capacité d'adaptation à l'environnement (principalement chez *An. gambiae*), et la recherche d'hôte, importantes aussi pour le contrôle du paludisme (White *et al.*, 2007). D'autres stratégies commencées dans le passé, continuent de se développer de nos jours et font encore l'objet de recherche, comme l'usage de moustiquaires imprégnées de nouveaux produits et de mélanges répulsifs (Pennetier *et al.*, 2007, Pennetier *et al.*, 2008, Pennetier *et al.*, 2009) ; ou le lâcher de mâles stériles, une approche certainement intéressante pour certaines situations dans lesquelles la population du vecteur reste isolée des autres (îles, oasis) (Cyranoski, 2008).

Une étude a été récemment menée au Mali basée sur une méthode de lutte antivectorielle « attirer et tuer » développée et testée en Israël. Cette méthode a consisté à l'utilisation de jus sucré (qui naturellement attire les moustiques) mais rendu toxique par un insecticide oral, l'acide borique. L'utilisation de cette méthode contre les vecteurs du paludisme *An. gambiae* a donné des résultats encourageants (Muller *et al.*, 2010).

De façon générale, les méthodes de lutte antivectorielle contre le paludisme les plus répandues à l'heure actuelle reposent sur l'utilisation des insecticides.

## **2.2. Les insecticides en santé publique, la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides et les stratégies de gestion de la résistance**

### **2.2.1. Les insecticides en santé publique**

Il existe une vingtaine de molécules utilisées comme insecticides en santé publique. Ces molécules sont regroupées en 6 grandes familles.

### **2.2.1.1. Les organochlorés**

Cette famille est subdivisée en 3 sous-familles selon le mode d'action et la structure chimique des molécules. Il s'agit du DDT et ses analogues, du lindane et des cyclodiènes.

Le DDT découvert en 1939 constitua une véritable révolution dans la lutte contre les insectes. Cette molécule fut largement utilisée en agriculture et en santé publique. En santé publique, le DDT a permis de sauver des millions de vies humaines (Mouchet, 1994). Le DDT agit sur le canal sodium au niveau du 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 lindane est l'un des isomères de l'hexachlorocyclohexane synthétisé à partir du benzène et du chlore. Le lindane et les cyclodiènes agissent sur le système nerveux central en inhibant les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui est un neuromédiateur inhibiteur. Ces molécules ont été largement utilisées dans les années 50 mais ont été abandonnées à cause de leur toxicité pour la faune non cible, leur rémanence dans l'environnement et l'apparition rapide de la résistance.

### **2.2.1.2. Les carbamates**

Les carbamates sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. 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 acétylcholine se bloquent en position ouvert, ce qui entraîne la paralysie puis la mort de l'insecte. C'est à cette famille d'insecticides qu'appartient le bendiocarb, un des insecticides utilisés dans la présente étude.

### **2.2.1.3. Les organophosphorés**

Les organophosphorés sont des dérivés de l'acide phosphorique. Ils sont moins toxiques que les organochlorés qu'ils ont progressivement remplacés dans les années 50, et sont toujours assez largement utilisés. Les formes oxydées des organophosphorés sont de puissants inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ces molécules ont le même mode d'action que les carbamates.

#### **2.2.1.4. Les pyréthriinoïdes**

Les pyréthriinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs de chrysanthème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Les pyréthriinoïdes de première génération sont photolabiles et par conséquent peu rémanents. Ils entrent dans la composition des aérosols et des tortillons fumigènes. L'industrie a fabriqué par la suite des molécules plus stables qui sont utilisées en applications rémanentes. Selon que ces insecticides possèdent ou non un groupement cyané en  $\alpha$  de la liaison ester, ils sont classés en groupe II (deltaméthrine, lambdacyhalothrine) et en groupe I (perméthrine). 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. C'est pour cette raison que ces insecticides sont actuellement les seuls utilisables pour imprégner des moustiquaires (ou des rideaux) destinées à lutter contre les vecteurs piquant la nuit comme ceux du paludisme (Zaim *et al.*, 2000).

#### **2.2.1.5. Les régulateurs de croissance**

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

#### **2.2.1.6. Les toxines bactériennes**

Deux bactéries entomopathogènes sont utilisées comme larvicides. Il s'agit de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* qui produisent des toxines agissant par ingestion et ayant entre autres, une action cytotoxique sur les cellules du tube digestif des larves des diptères.

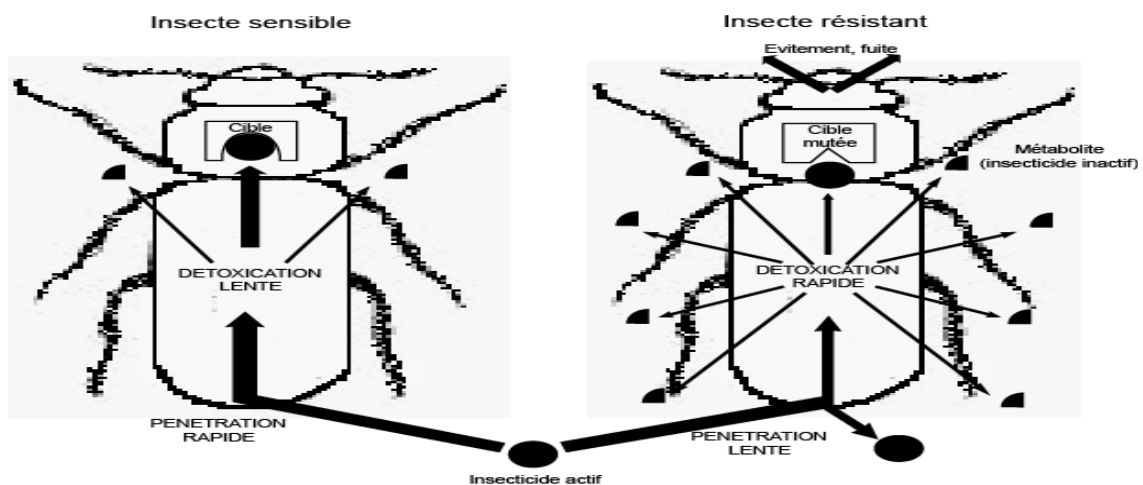
### **2.2.2. Mécanismes de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme**

La résistance est l'apparition dans une population d'insectes, d'individus ayant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet léthal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce (WHO, 1976).

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec des cibles biologiques présentes chez l'insecte. Plusieurs étapes sont nécessaires avant que l'insecticide n'exerce son action. Il doit d'abord entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans son organisme, être transformé dans certains cas en métabolite actif, puis transporté jusqu'à la cible. Chacune de ces étapes est sous le contrôle

d'un ou de plusieurs gènes. Toute modification de l'une de ces étapes peut conduire donc à une résistance. La résistance peut impliquer un comportement d'évitement de l'insecte qui ne rentre plus en contact avec l'insecticide (résistance comportementale), une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, une modification des voies métaboliques ou enfin une modification de sa cible (Figure 1.4).

La résistance comportementale et les modifications de l'absorption ou de l'excrétion des insecticides sont des phénomènes rares et dont la contribution réelle à la résistance est souvent difficile à mettre en évidence. En revanche, les fortes résistances sont associées à des mécanismes métaboliques et des modifications de cible.



**Figure 1.4** : Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez les insectes

### 2.2.2.1. La résistance métabolique

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

Les estérases non spécifiques sont l'un des principaux mécanismes de résistance aux organophosphorés. Ces enzymes sont surproduites et peuvent représenter jusqu'à 12% des protéines totales des insectes (Fournier, 2005). Les estérases sont classées en 2 groupes A et B selon qu'elles hydrolysent le  $\alpha$  ou le  $\beta$ -naphtyl acétate. Leur surproduction est liée soit à une augmentation du nombre de copies du gène, soit à un mécanisme de régulation du gène (Mouches *et al.*, 1990). Elles n'agissent pas par hydrolyse, mais en séquestrant les organophosphorés vis-à-vis desquels ils

possèdent une forte affinité (Cuany *et al.*, 1993). Une estérase non surproduite est spécifique de la résistance au malathion chez certaines espèces d'anophèle (Hemingway and Karunaratne, 1998). Il s'agit de la malathion carboxylestérase qui contrairement aux autres estérases, n'est produite que chez les adultes.

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

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

#### **2.2.2.2. La résistance par modification de cible**

Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux (acétylcholinestérase, canal sodium voltage dépendant, récepteur GABA). Toute modification structurale réduisant leur affinité pour les insecticides peut conduire à une résistance. Ces mécanismes sont généralement très efficaces et confèrent de plus une résistance croisée à tous les insecticides agissant sur la même cible. Cette résistance est associée à une ou plusieurs mutations ponctuelles sur la séquence codant pour les protéines concernées.

La résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. gambiae* résulte principalement d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour le canal sodium (Martinez Torres *et al.*, 1998) et confère aux moustiques le caractère knock-down résistant (*kdr*). Deux mutations ont été identifiées ; l'une en Afrique de l'ouest où une leucine est remplacée par la phénylalanine (Martinez Torres *et al.*, 1998) et l'autre en Afrique de l'est où la même leucine est remplacée par la sérine (Ranson *et al.*, 2000).

La résistance aux organophosphorés et aux carbamates quant à elle résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour l'acétylcholinestérase (la mutation *Ace1*). Cette mutation se traduit au niveau de l'acétylcholinestérase par une substitution de la glycine par la sérine.

La mutation *Rdl* confère aux insectes une résistance aux cyclodiènes. Cette mutation se traduit par une substitution de l'alanine par la sérine au niveau du récepteur GABA.

### **2.2.3. Les stratégies de gestion de la résistance**

#### **2.2.3.1. Succès historiques de la gestion de la résistance**

Le programme OCP (Onchocerciasis Control Programme) lancé par l'OMS en Afrique de l'ouest en 1974 pour une durée de 20 ans a été un exemple de succès de la gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs de l'onchocercose. En effet, face à la résistance au téméphos, ce programme a mis en place une stratégie basée sur la rotation de plusieurs autres familles de larvicides (*Bacillus thuringiensis israelensis*, pyréthri-noïde, carbamate, organophosphorés) en plus du téméphos. Ces différents produits ont été appliqués stratégiquement suivant les tendances du statut de résistance, la dynamique de la population des vecteurs et l'impact sur l'environnement.

Une autre stratégie basée sur l'utilisation de plusieurs familles d'insecticides (pyréthri-noïdes, carbamates, organophosphorés) en mosaïque et en rotation a été évaluée avec succès dans 24 villages au Mexique dans un contexte de multi résistance aux insecticides de *Anopheles albimanus* (Penilla *et al.*, 2006).

#### **2.2.3.2. Utilisation d'insecticides à modes d'action différents**

Plusieurs composés appartenant aux familles des carbamates et des organophosphorés ont été évalués en cases expérimentales dans le but de la recherche d'insecticides de remplacement ayant des performances au moins équivalentes à celles des pyréthri-noïdes. Les carbamates et les organophosphorés agissent sur l'acétylcholinestérase alors que les pyréthri-noïdes ont pour cible, le canal sodium voltage dépendant. Ces insecticides se sont révélés efficaces et sont donc potentiellement de bonnes alternatives contre les vecteurs du paludisme résistants aux pyréthri-noïdes (Akogbéto *et al.*, 2010, Fanello *et al.*, 1999). Cependant, ces produits agissent à fortes doses, sont généralement moins rémanents et ont un profil toxicologique moins favorable pour l'homme. N'ayant pas d'effet irritant, ils confèrent une moindre protection personnelle. C'est pour ces raisons que la recherche s'oriente désormais vers l'association d'un pyréthri-noïde et d'un non pyréthri-noïde.

### 2.2.3.3. Utilisation de mélanges d'insecticides

Cette stratégie s'avère intéressante d'autant plus que l'existence d'interaction positive (synergie) a été mise en évidence entre les pyréthriinoïdes et les organophosphorés. En santé publique, un effet de synergie a été observé avec un mélange de bifenthrine (pyréthriinoïde) et de carbosulfan (carbamate) (Corbel *et al.*, 2002). Toutefois, Guillet *et al.* (2001) ont évalué des moustiquaires imprégnées en mosaïque et se sont rendus compte que c'est la moustiquaire imprégnée de carbamate seul qui a donné le meilleur résultat en termes de mortalité (Guillet *et al.*, 2001). Mais dans ces études les carbamates ont été utilisés sur des moustiquaires, il y aura donc en phase opérationnelle un contact entre les utilisateurs en l'occurrence les enfants et le carbamate, ce qui pourrait se révéler dangereux compte tenu du profil toxicologique de ces molécules.

La stratégie faisant l'objet de la présente étude est basée sur l'utilisation de deux insecticides à mode d'action différent. Ces insecticides ne sont utilisés ni en mélange, ni en alternance, mais dans une même habitation à travers des méthodes de lutte antivectorielle différentes. Cette stratégie consiste en effet à combiner à l'intérieur d'une même habitation des moustiquaires imprégnées de pyréthriinoïde (deltaméthrine) et des bâches murales imprégnées de carbamate (bendiocarb).



## **Chapitre 2 : Etudes au laboratoire et en cases expérimentales (phases I et II)**

De nombreuses études ont démontré l'efficacité des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée (MILD) sur la morbidité palustre en zone de faible et de forte transmission (Lengeler, 2008). Au Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) effectue depuis quelques années une vaste campagne de distribution de MILD aux femmes enceintes et aux enfants de moins de cinq ans, catégories les plus touchées par ce fléau (WHO, 2005).

La résistance aux insecticides pyréthrinoïdes est désormais largement répandue chez les vecteurs du paludisme dans plusieurs pays en Afrique, dont le Bénin, dans lesquels la lutte anti vectorielle contre le paludisme repose sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes (Santolamazza *et al.*, 2008, Yadouleton *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, de nombreuses questions demeurent quant à l'impact de cette résistance sur l'efficacité des programmes de lutte contre le paludisme en Afrique. Jusqu'à présent, les études menées dans les zones où les vecteurs sont résistants aux insecticides (Côte d'Ivoire) n'avaient pas permis de démontrer une baisse significative d'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes, tant sur le plan entomologique (Darriet *et al.*, 1998, Darriet *et al.*, 2000) que parasito-clinique (Henry *et al.*, 2005). Toutefois, une étude menée en cases expérimentales au Bénin a montré une chute du taux de mortalité des moustiques et de la protection personnelle contre leurs piqûres en zone de résistance aux insecticides (Ladji) (N'Guessan *et al.*, 2007). Ces résultats montrent qu'il est urgent de développer des stratégies alternatives de lutte antivectorielle afin de garantir le contrôle des moustiques résistants et ainsi limiter l'expansion de la résistance chez les moustiques vecteurs de maladies.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'étudier un nouveau concept de lutte qui consiste à combiner une moustiquaire imprégnée de pyréthrinoïde avec un support mural traité par un carbamate afin de bénéficier d'une protection personnelle efficace et d'un effet létal plus marqué contre les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes. Contrairement aux précédentes stratégies « deux en un » visant à combiner sur une même moustiquaire des insecticides à modes d'action différents (Hougard *et al.*, 2003), cette méthode présente l'avantage de réduire l'exposition des personnes aux carbamates, famille d'insecticides reconnus pour leur profil toxicologique moins favorable que les pyréthrinoïdes.

Dans la présente étude, nous avons d'abord évalué au laboratoire l'activité intrinsèque et la résistance aux lavages de 4 différents supports imprégnés de bendiocarb associé ou non à une résine de fixation afin de déterminer le meilleur support (en termes de résistance aux lavages) pour une imprégnation avec le bendiocarb. Nous avons ensuite testé en cases expérimentales par des lâcher-recaptures de moustiques sauvages résistants la combinaison de la moustiquaire imprégnée de deltaméthrine à la couverture complète et à la couverture du tiers supérieur des murs avec le meilleur support imprégné de bendiocarb afin de déterminer la façon optimale de couvrir les murs

avec les bâches imprégnées de bendiocarb. Enfin, l'efficacité en termes de réduction du contact homme-vecteur et de gestion de la résistance des combinaisons (moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à longue durée d'action+bâches murales imprégnées de bendiocarb ou aspersion intradomiciliaire avec le bendiocarb) comparée aux monotraitements a été testée en cases expérimentales (phase II), en zone de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides.

## **1. Etudes en laboratoire (phase I)**

L'activité intrinsèque et la résistance aux lavages de 4 différents supports imprégnés de bendiocarb associé ou non à une résine de fixation ont été testées au laboratoire. Cette étude nous a permis d'identifier le meilleur support en termes de résistance aux lavages, support qui sera utilisé dans la suite de l'étude.

Les études réalisées dans cette partie de la thèse sont présentées en détail dans l'article 1 en annexe.

**Article 1: Djèrontin Armel, Joseph Chabi, Thierry Baldet, Seth Irish, Cédric Pennetier, Jean-Marc Hougard, Vincent Corbel, Martin Akogbéto, Fabrice Chandre. **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets.** *Malaria Journal* 2009, 8:233**

### **1.1. Supports testés**

Les matériaux suivants ont été utilisés pour l'étude :

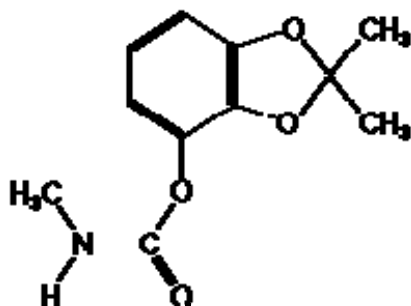
- i) tissu bleu à base de coton (35%) et de polyester (65%) ;
- ii) toile de tente blanche faite à base du même tissu que le tissu bleu (coton 35% et polyester 65%) mais recouverte sur une de ses faces de polyuréthane imperméable ;
- iii) bâche à base de polypropylène tissé ;
- iv) bâche plastique épaisse et imperméabilisée faite de polychlorure de vinyle.

Chaque support a été coupé en 8 morceaux de 25cm x 25cm puis imprégné à l'aide d'un pinceau avec du bendiocarb à 100 mg/m<sup>2</sup> et 200 mg/m<sup>2</sup>. Notons que l'OMS recommande l'application du bendiocarb en aspersion intradomiciliaire à des doses variant de 100 à 400 mg/m<sup>2</sup>. Pour chacune

des doses, 2 morceaux de chaque support ont été imprégnés avec une résine fixatrice à la dose de 12 ml/m<sup>2</sup> et 2 autres ont été imprégnés sans cette résine.

## 1.2. Insecticide et résine

L'insecticide que nous avons utilisé est le bendiocarb, un carbamate. Le bendiocarb (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>) ou le 2,2-diméthyl-1,3-benzodioxol-4-yl méthyl carbamate a pour structure chimique :



Nous avons utilisé une formulation "wettable powder" de bendiocarb (WP 80 W FICAM). Il s'agit d'une poudre mouillable contenant 80% de matière active et destinée aux aspersion intra domiciliaires en santé publique.

Nous avons également utilisé une résine fixatrice dont la composition est gardée secrète par le fabricant. Le bendiocarb et la résine fixatrice ont été fournis par la société Bayer AG (Lervekussen, Germany).

## 1.3. Lavages des supports imprégnés

Les lavages ont été effectués manuellement avec des éponges végétales selon deux méthodes ; avec de l'eau simple ou du savon de Marseille. Le pH de l'eau savonneuse a été de 9,7 et celui de l'eau simple a été de 6. Pour chaque lavage, une éponge végétale imprégnée d'eau simple ou d'eau savonneuse a été passée 3 fois de suite sur chaque partie du support imprégné et ceci pendant 10 secondes par support. Pour les lavages au savon, une autre éponge végétale mouillée avec l'eau simple a servi au rinçage. Cette éponge a été passée 1 fois sur chaque partie du support lavé au savon pendant 3 secondes. Pour le séchage, les supports imprégnés ont été posés horizontalement sur une table du laboratoire et laissés à température ambiante, pendant 24 heures. Les matériaux imprégnés lavés et séchés ont ensuite été emballés et conservés au réfrigérateur (4°C) en attendant les bio-essais.

## 1.4. Bio-essais

La souche sensible de référence « Kisumu », la souche VK-Per et la souche Acer-Kis de *An. gambiae* ont été utilisées pour les bio-essais, de même que des individus sauvages issus d'une population de Ladji, un quartier périphérique de Cotonou. Ces moustiques ont été élevés à l'insectarium du CREC (température à 25°C et humidité variant de 70 à 80%). Les larves de ces moustiques ont été nourries avec des biscuits de chat et les imagos avec du jus sucré.

La souche sensible de référence « Kisumu » est originaire du Kenya et ne présente aucun mécanisme de résistance aux insecticides.

La souche VK-Per est une souche originaire du Burkina Faso (Vallée du Kou). Elle est fortement résistante aux pyréthriinoïdes (Darriet *et al.*, 1997) et est homozygote pour la mutation *kdr*.

La souche Acer-Kis est une souche homozygote résistante pour la mutation *ace.1<sup>R</sup>*, mais ayant le fond génétique de Kisumu. Elle est résistante aux carbamates et aux organophosphorés. Toutes ces souches sont maintenues en élevage au CREC.

La population sauvage de *An. gambiae* de Ladji présente une forte résistance à la perméthrine et au DDT, due à la mutation *kdr* (Corbel *et al.*, 2007) et des mécanismes de résistance métabolique encore mal identifiés. Par ailleurs, moins de 1% de cette population possède la mutation *ace.1<sup>R</sup>*.

L'efficacité des traitements a été évaluée par des tests en cône OMS (WHO, 2006). Ce test consiste à introduire des moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours, à jeun, dans un cône en plexiglas, lui-même posé sur le support imprégné de bendiocarb (photo 2-1).



**Photo 2-1** : Moustiques en exposition

Quinze moustiques ont été introduits par cône et 4 cônes ont été utilisés par support (n= 60 moustiques). Le temps de contact était de 30 minutes. Les moustiques ont été ensuite mis en observation et nourris au jus sucré. La mortalité a été enregistrée après 24 heures.

## **1.5. Test d'irritabilité**

Des tests d'irritabilité ont été réalisés sur les supports non traités. En effet, des études antérieures ont montré que le bendiocarb n'est pas un insecticide irritant (Evans, 1993). Les tests d'irritabilité ont été réalisés avec le programme informatique IRRIT60 conçu par Guillet *et al.* (2000). Ce test consiste à introduire un moustique sous un cône placé sur un support non traité et à mesurer après un temps d'adaptation de 60 secondes le temps de 1<sup>er</sup> envol de chaque moustique. Pour chaque support, 40 moustiques ont été ainsi testés.

## **1.6. Analyse des résultats**

En ce qui concerne les tests en cônes, la mortalité a été exprimée en fonction des différents supports, de la présence ou non de la résine, du type et du nombre de lavages dans un modèle de régression logistique avec le logiciel GLIM 4. Ce modèle suppose une variable aléatoire de distribution binomiale et les paramètres du modèle ont été calculés suivant la méthode du maximum de vraisemblance.

L'effet de chaque variable et de leurs interactions ont été testés par F-test dans une analyse de la déviance (ANODEV) en regardant la variation de la déviance induite par le retrait de chaque terme du modèle (Payne, 1987).

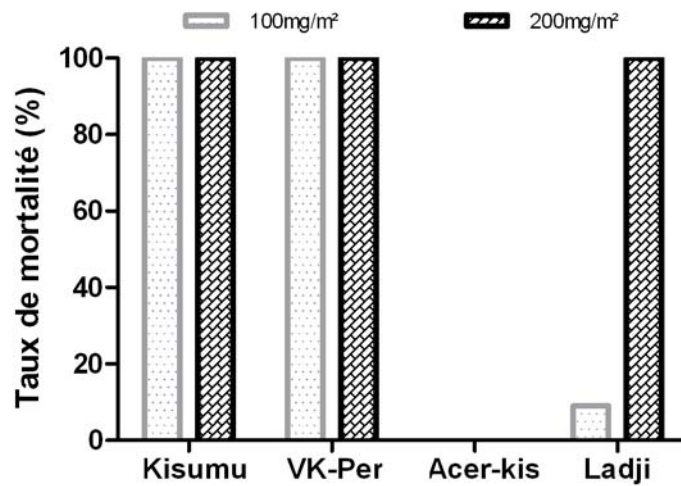
Les probabilités de survie des moustiques ont été estimées et une analyse de variance (ANOVA) de cette probabilité en fonction des différentes variables (support, dose, résine fixatrice et type de lavage) a été réalisée à l'aide du même logiciel.

Les résultats des tests d'irritabilité ont été analysés avec le logiciel log-probit WinDL50 (CIRAD CA, 1999). Ce logiciel exprime le probit du nombre de moustiques en fonction du log du temps de 1<sup>er</sup> envol et détermine le temps de 1<sup>er</sup> envol de 50% des moustiques (FT<sub>50</sub>) avec les intervalles de confiance.

## 1.7. Résultats

### 1.7.1. Efficacité du bendiocarb

Les résultats obtenus avec les deux doses (100 et 200 mg/m<sup>2</sup>) de bendiocarb pour les 3 souches et la population sauvage de Ladji, sur le support bâche en polychlorure de vinyl imprégné et non lavé sont représentés sur la figure 2-1.



**Figure 2-1** : Taux de mortalité de différentes souches et population *de An. gambiae* en fonction de la dose du bendiocarb

A la dose de 200 mg/m<sup>2</sup>, nous avons une mortalité de 100% avec la souche sensible de référence « Kisumu », la souche résistante aux pyréthrinoides VK-Per et la population sauvage. Aucune mortalité n'a été observée avec la souche Acer-Kis homozygote pour la mutation *Ace-1<sup>R</sup>*. A la dose de 100 mg/m<sup>2</sup>, la mortalité a été de 100% avec « Kisumu » et VK-Per, de 0% pour Acer-Kis, et de 9,1% pour la population sauvage.

### 1.7.2. Résistance aux lavages des différents supports imprégnés

Au total, 350 bio-essais ont été réalisés, ce qui représente environ 21 000 femelles de *An. gambiae* (souche « Kisumu ») testées. Quelles que soient la dose utilisée (100 ou 200 mg/m<sup>2</sup>), la présence ou non de résine fixatrice et la méthode de lavage, la bâche en polypropylène tissé a induit une mortalité de 100%, soit une probabilité nulle de survie jusqu'à 10 lavages. Ce support a été alors retiré du modèle de régression logistique. Les résultats de l'analyse de déviance du modèle de

régression logistique sont présentés dans le tableau 2-1. Ce tableau montre l'effet de l'interaction des différents facteurs et co-variables sur la déviance du modèle.

**Tableau 2-1 :** Résultats de l'analyse de déviance du modèle de régression logistique

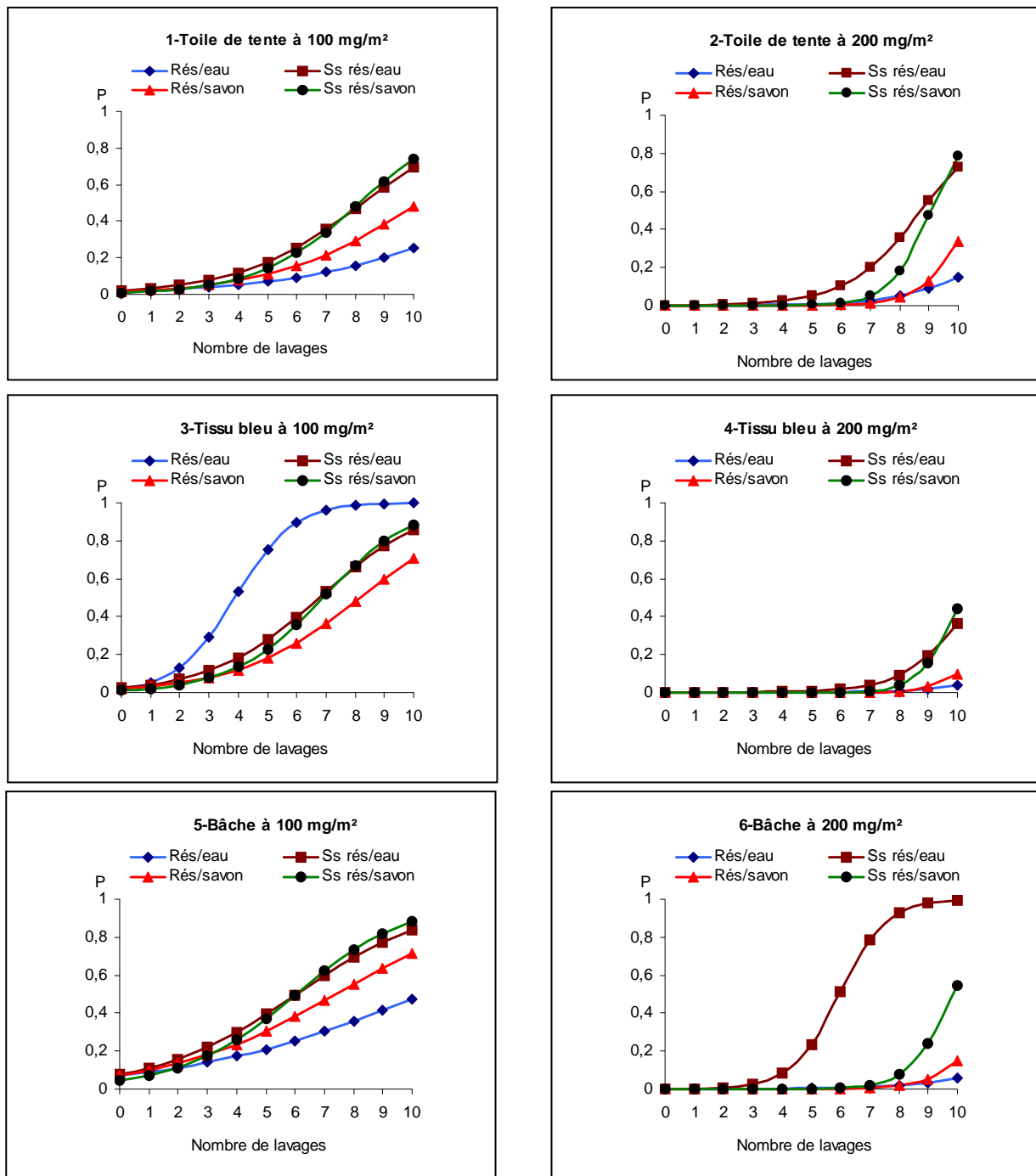
Facteurs	$\Delta dev$	$\Delta ddl$	F	P
Nombre lavages*Support*Dose	5,3	3	0,6	0,609
Nombre lavages*Support*Type lavage	5,9	3	0,7	0,565
Nombre lavages*Support*Résine	20,6	3	2,3	0,075
<b>Nombre lavages*Dose*Type lavage</b>	<b>18,4</b>	<b>1</b>	<b>6,2</b>	<b>0,013</b>
<b>Nombre lavages*Support</b>	<b>75,4</b>	<b>3</b>	<b>8,0</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Nombre lavages*Résine</b>	<b>11,6</b>	<b>1</b>	<b>3,9</b>	<b>0,049</b>
<b>Support*Dose</b>	<b>245,2</b>	<b>3</b>	<b>22,4</b>	<b>&lt;0,001</b>
Support*Type lavage	18,8	3	2,1	0,097
<b>Support*Résine</b>	<b>323,9</b>	<b>3</b>	<b>27,8</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Dose*Type lavage</b>	<b>245,2</b>	<b>3</b>	<b>27,4</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Dose*Résine</b>	<b>38,2</b>	<b>1</b>	<b>12,6</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Type lavage*Résine</b>	<b>32,1</b>	<b>1</b>	<b>10,7</b>	<b>0,001</b>

$F = (\Delta dev / \Delta ddl) / (dev / ddl)$  ; P= Probabilité associée à F; dev= Déviance ddl= degré de liberté

Les termes qui ne figurent pas dans le tableau correspondent à une déviance nulle, F ne peut donc être calculé. **En gras**, les interactions significatives

La probabilité de survie varie en fonction de la présence ou non de la résine fixatrice, du procédé et du nombre de lavages effectués pour les autres types de supports (figure 2-2).





Rés = imprégnation avec résine ; Ss rés = imprégnation sans résine ; eau= lavage à l'eau ; savon = lavage au savon ; P = probabilité de survie

**Figure 2-2 :** Probabilité de survie de *An. gambiae* « Kisumu » en fonction du nombre de lavages de différents supports imprégnés au bendiocarb

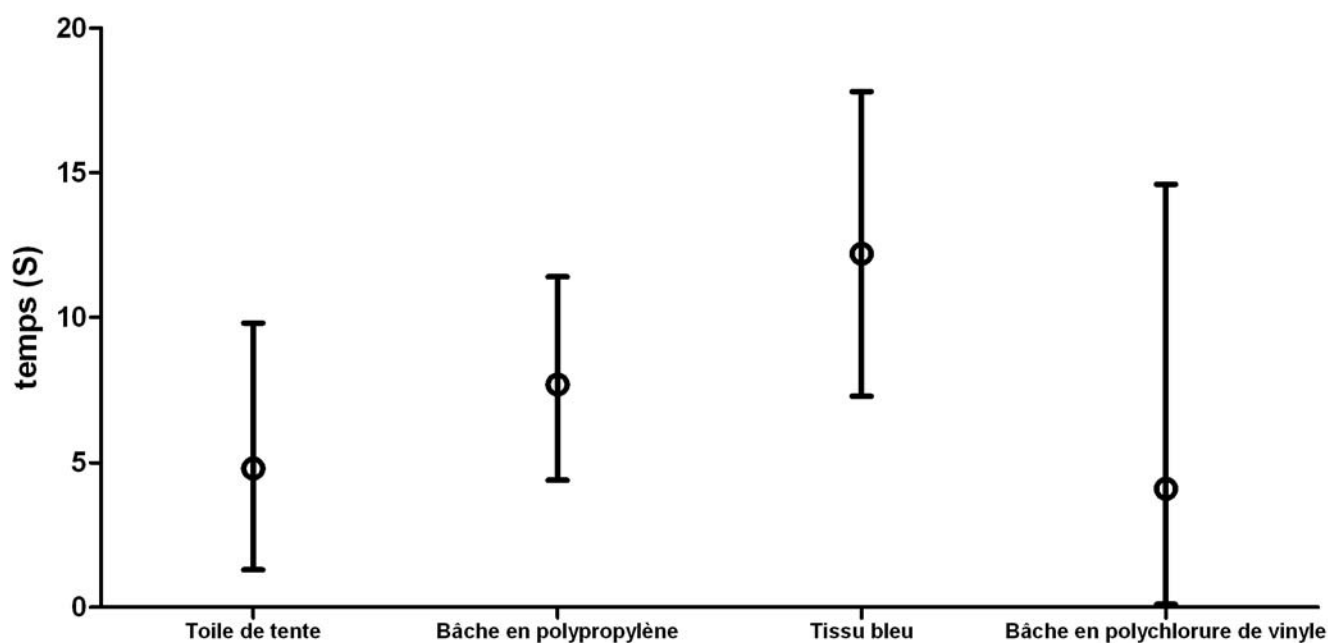
L'analyse de variance (ANOVA) de cette probabilité de survie a montré que toutes les variables, c'est-à-dire la dose, la résine fixatrice, le procédé de lavage et le type de support ont un impact significatif sur la probabilité de survie des moustiques. A la dose de 100 mg/m<sup>2</sup>, la probabilité de survie des moustiques exposés aux supports imprégnés augmente plus rapidement en fonction du nombre de lavages qu'à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup> (P<0.01). Le savon réduit significativement la

résistance au lavage des supports imprégnés ( $P < 0,01$ ), et l'imprégnation des supports avec la résine fixatrice améliore cette résistance au lavage ( $P = 0,025$ ).

Le polypropylène tissé a été le support ayant la meilleure résistance aux lavages. Dans la suite de l'étude, c'est ce support qui a été choisi et pour son imprégnation, la dose de  $200 \text{ mg/m}^2$  a été choisie.

### 1.7.3. Irritabilité des supports

Les résultats des tests d'irritabilité analysés avec le logiciel d'analyse log-probit sont présentés sur la figure 2-3. Le temps de 1<sup>er</sup> envol des moustiques sur les différents supports non traités varie de 4 à 12 secondes. Il n'y a pas eu de différence significative entre les supports.



**Figure 2.3** : Temps de premier envol de 50% des moustiques en fonction des supports non traités

## **2. Etudes en cases expérimentales (phase II)**

Les études en cases expérimentales nous ont permis dans un premier temps, par des lâcher-recaptures de moustiques sauvages résistants, de démontrer la preuve du principe (« proof of principle ») et de déterminer la façon optimale de couvrir les murs avec les bâches imprégnées de bendiocarb. L'efficacité en termes de réduction du contact homme-vecteur et de gestion de la résistance des combinaisons comparées aux monotraitements a été ensuite évaluée en zone de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides.

Les détails de ces études sont présentés dans les articles 1 et 2 en annexe.

**Article 1: Djènantin Armel, Joseph Chabi, Thierry Baldet, Seth Irish, Cédric Penner, Jean-Marc Hougard, Vincent Corbel, Martin Akogbéto, Fabrice Chandre. **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets.** *Malaria Journal* 2009, 8:233**

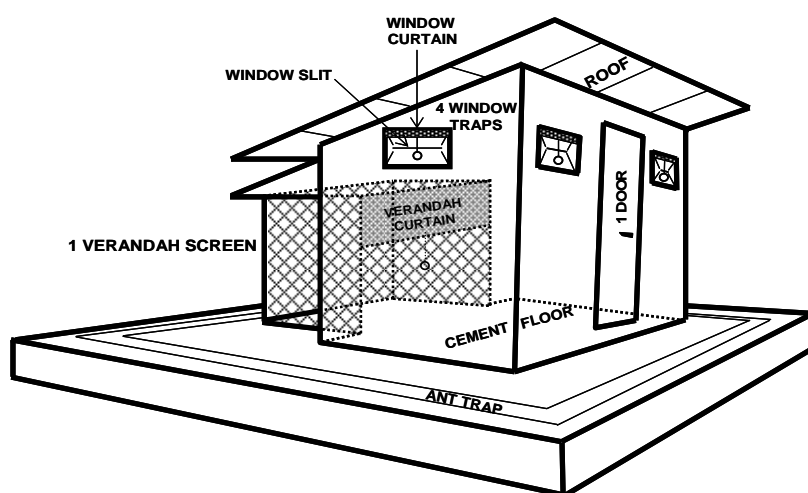
**Article 2 : Djènantin A., F. Chandre, Dabire R, J. Chabi, T. Baldet, J.-M. Hougard, M. Akogbéto, V. Corbel. **Indoor use of carbamate treated plastic sheetings in combination with impregnated bed nets to better control pyrethroid-resistant malaria vectors.** *Am J Trop Med Hyg* 2010 83 (2)**

### **2.1. Démonstration du « proof of principle » de la combinaison moustiquaire imprégnée de deltaméthrine et bâches murales imprégnées de bendiocarb**

#### **2.1.1. Description du site de l'étude**

L'étude de terrain a été menée dans les cases expérimentales de la station de recherche de Kétonou (Bénin), village de 2 000 habitants situé à une trentaine de kilomètres de Cotonou (Bénin) près du lac Nokoué. Cette station a été construite par le CREC pour les évaluations d'insecticides en phase II. Quatre cases expérimentales standardisées, inspirées de certains modèles de cases traditionnelles africaines ont été utilisées (Darriet *et al.*, 2002). Elles ont une longueur de 2,50 m et une largeur de 1,75 m pour une hauteur au plafond de 2 m. Les murs sont faits de parpaings enduits de ciment, le

sol de ciment et le toit de tôle ondulée. Une bâche en plastique est tendue sous le toit pour protéger contre la chaleur et faciliter la capture des moustiques. Chaque case est entourée d'une rigole pleine d'eau pour empêcher l'entrée des fourmis et des araignées, grandes consommatrices de moustiques. La seule issue de sortie possible pour les moustiques relâchés à l'intérieur de la case est une véranda piège située sur le côté opposé à celui de la porte. Pour notre étude, les entrées des cases ont été oblitérées pour empêcher toute pénétration de moustiques sauvages (figure 2-3 et photo 2-2).



**Figure 2-3** : Modèle standardisé d'une case expérimentale pour les évaluations en phase II



**Photo 2-2** : Cases expérimentales de la station expérimentale de Kétonou (Bénin)

### 2.1.2. Traitement des cases

Les traitements insecticides ont été les suivants :

- 1- case avec une moustiquaire non imprégnée (témoin)
- 2- case avec une moustiquaire imprégnée de deltaméthrine à 25 mg/m<sup>2</sup>
- 3- case avec le tiers supérieur des murs couvert avec le polypropylène tissé traité au bendiocarb à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup> avec la résine fixatrice et une moustiquaire imprégnée de deltaméthrine à 25 mg/m<sup>2</sup> (Photo 2-3a)
- 4- case avec la totalité des murs couverts avec le polypropylène tissé traité au bendiocarb à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup> avec la résine fixatrice et une moustiquaire imprégnée de deltaméthrine à 25 mg/m<sup>2</sup> (Photo 2-3b)



**Photo 2-3** : Mur de case expérimentale couvert au 1/3 (a) et complètement (b) avec le polypropylène tissé imprégné de bendiocarb à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup>

### 2.1.3. Méthode du lâcher-recapture

Pour cette étude, nous avons utilisé deux populations locales de *An. gambiae* et de *Cx. quinquefasciatus* résistantes aux pyréthrinoïdes, prélevées à l'état larvaire dans le quartier de Ladjì (Cotonou) et élevées jusqu'au stade adulte à l'insectarium. Ces moustiques ont été identifiés à l'aide d'une clé de détermination (Edwards, 1941). Ces populations présentent une forte résistance à la perméthrine et au DDT, due à la mutation *kdr* dont la fréquence allélique est de 80% (Corbel *et al.*, 2007) et à des mécanismes de résistance métabolique due à une augmentation de l'activité des oxydases (Corbel *et al.*, 2007, Djouaka *et al.*, 2008).

Quatre personnes adultes volontaires ont été recrutés parmi les habitants de Kétonou pour participer à l'étude. Chaque nuit d'étude, 100 femelles de *An. gambiae* ou 150 femelles de *Cx. quinquefasciatus* (Ladji), âgées de 5 jours et à jeun, ont été introduites dans chaque case à 20 heures, soit environ 15 minutes avant l'entrée des volontaires (temps d'acclimatation). Le lendemain matin, tous les moustiques ont été récoltés dans chaque case et leur localisation (case ou véranda) ainsi que leur état physiologique (mort, vivant, gorgé ou non) a été enregistré. Les moustiques vivants ont été maintenus en survie (nourris avec une solution de miel à 10%) pour mesurer la mortalité 24 heures après leur exposition au traitement. Trois répliques ont été effectuées par case expérimentale et par espèce (environ 300 anophèles et 450 culex relâchés par traitement).

Même si les moustiques relâchés dans les cases provenaient de l'insectarium (sans pathogènes), les volontaires ont été suivis médicalement pour être traités en cas d'accès palustres. L'IRD et le CREC ont reçu un accord éthique de la part du ministère de la santé pour l'utilisation de sujets humains (captureurs) dans le cadre des activités d'évaluation des insecticides en cases expérimentales.

#### **2.1.4. Indicateurs mesurés**

Les résultats des captures ont permis d'estimer pour chaque traitement, les paramètres suivants :

- 1- Le pourcentage de gorgement : pourcentage de moustiques ayant pris un repas de sang.
- 2- La mortalité globale : le pourcentage de moustiques trouvés morts dès le matin de la capture (mortalité immédiate) et après 24 heures (mortalité différée).

#### **2.1.5. Analyse des résultats**

Les données proportionnelles (pourcentage de moustiques morts, de moustiques gorgés) ont été analysées par régression logistique avec le logiciel XL-STAT 2009 Software) (Addinsoft, 2009).

#### **2.1.6. Résultats**

Nous avons relâché au total 3 000 moustiques dont 1 200 anophèles et 1 800 culex. 70% environ des moustiques ont été re-capturés. Considérant les résultats de la phase I, nous avons seulement

testé dans les cases expérimentales la bâche en polypropylène tissé imprégné au bendiocarb à 200 mg/m<sup>2</sup>. Les résultats sont présentés dans les tableaux 2-2 et 2-3.

**Tableau 2-2 :** Taux de mortalité et de gorgement de *An. gambiae* (Ladji) après lâcher-recaptures en cases expérimentales (3 répliques)

<i>An. gambiae</i>	Témoin	MI	MI + BI 1/3	MI + BI total
Total femelles	206	227	193	202
Femelles mortes	6	92	155	202
% Mortalité	2,9 <sup>a</sup>	40,5 <sup>b</sup>	80,3 <sup>d</sup>	100 <sup>c</sup>
	[0,6-5,2]	[34,1-46,9]	[74,7-85,9]	
Femelles gorgées	87	6	15	0
Taux de piqure (%)	42,2 <sup>a</sup>	2,6 <sup>b</sup>	7,8 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
	[35,5-49,0]	[0,6-4,7]	[4,0-11,6]	
Réduction du taux de piqure (%)	-	93,7	81,6	100

**MI** = Moustiquaire Imprégnée de deltaméthrine (25 mg/m<sup>2</sup>) ; **BI 1/3** = Bâche en polypropylène tissé imprégné de bendiocarb (200mg/m<sup>2</sup>) fixé au 1/3 supérieur de la case ; **BI total** = Bâche en polypropylène tissé imprégné de bendiocarb (200 mg/m<sup>2</sup>) fixé sur la totalité des murs de la case.

Sur une même ligne, les valeurs ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0,05$ ).

La mortalité de *An. gambiae* enregistrée dans le bras témoin a été inférieure à 3% montrant ainsi l'absence complète de contamination « insecticide » et la robustesse des moustiques testés. Avec la moustiquaire imprégnée de deltaméthrine (MI), la mortalité a été de 40,5% tandis que celle-ci passait à 80,3% et 100% avec les combinaisons MI + bâche imprégnée (BI) 1/3 et MI + BI total, respectivement. Le BI 1/3 a donc permis d'augmenter significativement les taux de mortalité des anophèles comparativement à la MI seule ( $P < 0,001$ ).

Le taux de gorgement de *An. gambiae* a été de 42,2% dans le bras témoin. Ces taux ont été significativement réduits (< 8%) quelque soit le traitement considéré ( $P < 0,001$ ).

**Tableau 2-3:** Taux de mortalité et de gorgement de *Cx. quinquefasciatus* (ladji) après lâches-recapture en cases expérimentales (3 répliques)

<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Témoin	MI	MI + BI 1/3	MI + BI total
Total femelles	342	330	286	257
Femelles mortes	2	48	77	121
% Mortalité	0,6 <sup>a</sup> [0-1,4]	14,6 <sup>b</sup> [10,7-18,4]	26,9 <sup>d</sup> [21,8-32,1]	47,1 <sup>c</sup> [41,0-53,2]
Femelles gorgées	149	24	18	0
Taux de piqûre (%)	43,6 <sup>a</sup> [38,3-48,8]	7,3 <sup>b</sup> [4,5-10,1]	6,29 <sup>b</sup> [3,5-9,1]	0 <sup>c</sup>
Réduction du taux de piqûre (%)	-	83,3	85,6	100%

**MI** = Moustiquaire Imprégnée de deltaméthrine (25 mg/m<sup>2</sup>) ; **BI 1/3** = Polypropylène tissé imprégné de bendiocarb (200mg/m<sup>2</sup>) fixé au 1/3 supérieur de la case ; **BI total** = Polypropylène tissé imprégné de bendiocarb (200 mg/m<sup>2</sup>) fixé sur la totalité des murs de la case.

Sur une même ligne, les valeurs ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0,05$ ).

Dans le bras témoin, la mortalité enregistrée chez *Cx. quinquefasciatus* était seulement de 0.6%. Les taux de mortalité ont été significativement différents ( $P < 0,001$ ) selon que la MI soit utilisée seule (14,6%) ou associée au support imprégnée (26,9% pour le BI 1/3 et 47,1% pour le BI total).

Le taux de gorgement dans la case témoin a été de 43,5%. Ce taux a été significativement réduit ( $< 8\%$ ) quelque soit le traitement insecticide ( $P < 0,001$ ).



## **2.2. Evaluation de l'efficacité de la combinaison des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à longue durée d'action avec du bendiocarb en imprégnation des bâches murales (ou en aspersion intradomiciliaire) en zone de résistance aux insecticides des vecteurs**

### **2.2.1. Description du site de l'étude**

Cette évaluation en conditions semi-naturelles a été faite à la station expérimentale de la Vallée du Kou de septembre à décembre 2008. La Vallée du Kou est située à 30 km au Nord de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. C'est un périmètre rizicole aménagé depuis 1970 s'étendant sur une superficie de 1200 ha. Il est composé de 7 quartiers rizicoles. Il est entouré par une savane boisée dans la zone soudanienne caractérisée par deux saisons : une saison sèche de novembre à avril et une saison des pluies de mai à octobre avec une pluviométrie annuelle moyenne de 1200 mm. La station expérimentale où cette étude a été menée est située au quartier 7 (VK7) à la limite des casiers rizicoles à l'interface avec les champs de coton. *Anopheles gambiae* y est retrouvé à de fortes densités toute l'année mais avec un pic en saison des pluies. Les deux formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. y vivent en sympatrie mais à des fréquences relatives variables suivant la saison (Dabire *et al.*, 2008). La forme M y est prédominante toute l'année avec cependant une augmentation de la fréquence de la forme S de l'ordre de 20-45% vers la fin de la saison des pluies (septembre-novembre). La mutation *kdr* est présente dans les deux formes moléculaires à des fréquences alléliques très variables entre 0,8 et 1 dans la forme S et entre 0,04 et 0,5 dans la forme M (Dabire *et al.*, 2008). La mutation *ace-1<sup>R</sup>* est aussi présente dans les deux formes avec une fréquence allélique différentielle (0,4 chez la forme S et 0,03 chez la M) faisant de ce site une zone de multi résistance *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* chez *An. gambiae* s.s. surtout vers la fin de la saison des pluies (Dabire *et al.*, 2008).

*Anopheles funestus* et *Anopheles arabiensis*, autres vecteurs du paludisme, sont trouvés à de densités faibles (3-5%). *Culex quinquefasciatus* est aussi présent à des fréquences inférieures à 10%.

Six cases pièges standardisées (modèle des cases expérimentales de l'OMS (figure 2-3)) ont été utilisées dans cette étude.

### **2.2.2. Traitement des cases**

Les six cases expérimentales ont été traitées de la façon suivante :

Case 1 : moustiquaire ordinaire non imprégnée (témoin)

Case 2 : moustiquaire imprégnée de deltaméthrine à longue durée d'action ( PermaNet® 2.0)

Case 3 : Pulvérisation intra domiciliaire de bendiocarb à 400 mg/m<sup>2</sup> (PID)

Case 4 : Bâche plastique murale imprégnée de bendiocarb à 400 mg/m<sup>2</sup> (BI)

Case 5: Association de la Pulvérisation intra domiciliaire de bendiocarb à 400 mg/m<sup>2</sup> et de PermaNet® 2.0 (PID+PermaNet® 2.0)

Case 6 : Association bâche plastique murale imprégnée de bendiocarb à 400 mg/m<sup>2</sup> et de PermaNet® 2.0 (BI+ PermaNet® 2.0)

Six trous (4 cm x 4 cm) ont été réalisés dans chaque moustiquaire afin de simuler le mauvais état des moustiquaires dans les conditions d'utilisation (WHO, 2006).

### **2.2.3. Collecte des moustiques**

Six volontaires âgés de 18 ans au moins, recrutés parmi la population locale à VK7, ont assuré toute l'étude après avoir donné leur consentement éclairé pour leur participation à l'étude. Ils ont été informés par le chef et le délégué administratif du village de la mise en place d'une évaluation qui enrôlerait des jeunes volontaires du quartier. Après avoir pris connaissance des objectifs du projet suite à une rencontre entre l'équipe de l'IRSS/Centre Muraz et le chef du quartier, certains ont été sélectionnés par tirage au sort. Avant leur participation, ils ont été amenés à confirmer leur consentement par écrit et avec une signature ou une empreinte digitale. A la moindre suspicion clinique de paludisme, ils ont été pris en charge suivant le protocole thérapeutique OMS recommandé dans le pays.

Les dormeurs-captureurs à partir du premier jour font une rotation toutes les nuits. Ils entrent dans la case à la tombée de la nuit et y restent jusqu'au lever du jour. A 5h30, ils sont réveillés et récoltent les moustiques entrés dans leur case. Les portes et les chicanes des cases sont ensuite fermées et ne sont ouvertes qu'au cours de la nuit de capture suivante. Les moustiques ont été classés selon leur situation dans la case (sous ou hors la moustiquaire) ou la véranda et leur état physiologique (mort ou vivant, à jeun ou gorgé). Les moustiques vivants au repos à l'intérieur des cases ou sous les vérandas piégés ou à l'intérieur des moustiquaires ont été collectés à l'aide d'aspirateurs à bouche. Ils sont ensuite mis en observation pendant 24 heures dans des gobelets avec du jus sucré pour la lecture de la mortalité différée. Les moustiques morts ou survivants collectés dans chaque case ont été d'abord morphologiquement identifiés comme étant des *Anopheles gambiae s.l.* à l'aide de la clef d'identification (Gillies and Coetzee, 1987). Ils ont été ensuite conservés à -20°C sur du silicagel dans des tubes 1,5 ml pour être analysés au laboratoire.

#### 2.2.4. Bio-essais

Avant le lancement de l'évaluation, des tests en cône OMS ont été réalisés sur les bâches imprégnées, les murs imprégnés de bendiocarb, et les moustiquaires afin de vérifier l'efficacité insecticide initiale. Les moustiquaires non traitées ont été utilisées comme témoin.

Ces tests en cône ont été réalisés 7, 10, 21 et 120 jours après le traitement avec *An. gambiae* « Kisumu » (souche sensible de référence entretenue à l'insectarium du Centre Muraz) et avec la population sauvage locale (*An. gambiae* forme M « VK7 ») prélevée à l'état larvaire puis élevée au laboratoire jusqu'au stade adulte. Pour chaque moustiquaire, 10 femelles à jeun âgées de 2-5 jours de *An. gambiae* « Kisumu » et/ou de *An. gambiae* « VK7 », ont été introduites dans 5 cônes placés sur les 5 côtés de la moustiquaire (toit et 4 côtés) pendant 3 minutes d'exposition (WHO, 2006).

Pour les traitements en application murale (PID et BI), 3 cônes contenant chacun 15 femelles, à jeun âgées de 2-4 jours, sont placés pendant 30 minutes sur chaque mur traité (WHO, 2006). Le même test a été effectué sur le plafond et les ouvertures (chicanes) dans chaque case pour s'assurer que ceux-ci n'ont pas été contaminés lors des pulvérisations ou de l'installation des bâches. Les moustiques exposés sur les matériaux imprégnés ou non ont été ensuite transférés dans des gobelets et nourris au jus sucré. Ils ont été ainsi mis en observation pendant 24 heures. Le taux de mortalité différée a été déterminé au bout de 24 heures.

#### 2.2.5. Génotypage

Les espèces et les formes moléculaires des moustiques morts ou survivants collectés dans chaque case ont été déterminées par PCR à l'aide des protocoles respectifs de Scott *et al.*, 1993 et de Favia *et al.*, 2001 (voir en annexe). Les mutations *kdr* L1014F et *ace-1<sup>R</sup>* ont été recherchées suivant les protocoles de Martinez-Torrez *et al.* (1998) et de Weill *et al.* (2004) (voir en annexe). Après le génotypage de ces moustiques, la fréquence allélique des deux mutations au sein des moustiques morts et vivants a été calculée.

#### 2.2.6. Indicateurs mesurés

Quatre critères entomologiques ont été utilisés pour évaluer en phase II l'efficacité des traitements (WHO, 2006):

- 1- Taux de dissuasion (effet dissuasif), calculé par la formule :  $100 * (N \text{ moustiques entrés dans la case témoin} - N \text{ moustiques entrés dans la case traitée}) / N \text{ moustiques entrés dans la case témoin}$  ;

- 2- Exophilie, calculée par la formule :  $100 * (\frac{N \text{ moustiques entrés capturés dans la véranda piège}}{N \text{ moustiques total moustiques capturé dans la case}})$  ;
- 3- Taux de gorgement, qui est la proportion de moustiques gorgés par rapport au nombre total de moustiques capturés dans la case ;
- 4- Taux d'inhibition du gorgement, obtenu par la formule :  $100 * (1 - (\frac{\text{taux de gorgement dans la case traitée}}{\text{taux de gorgement dans la case témoin}}))$  ;
- 5- Taux de mortalité (effet léthal), qui est la proportion de moustiques morts par rapport au nombre total de moustiques capturés dans la case ;

La pression de sélection exercée par chaque traitement sur les gènes de résistance *kdr* et *ace I<sup>R</sup>* a été également mesurée.

### 2.2.7. Analyse des résultats

Les résultats relatifs au nombre de moustiques de chaque espèce entrés dans les cases, spécialement les anophèles, aux proportions de moustiques repoussés dans la véranda piège, tués à l'intérieur de la case ou sur la moustiquaire et enfin les moustiques gorgés ont été comparés entre traitements mais aussi au témoin. Le nombre de moustiques entrés dans les cases a été analysé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les données proportionnelles (pourcentage de moustiques morts, de moustiques gorgés, et de moustiques dans la véranda) ont été analysées par régression logistique avec le logiciel XL-STAT 2009 (Addinsoft, 2009). La sélection des génotypes résistants a été évaluée en comparant la distribution et la fréquence des génotypes parmi les moustiques morts et survivants en fonction des traitements à l'aide du logiciel Genepop (Raymond and Rousset, 1995). Les taux de mortalité obtenus à l'issue des bio-essais ont été comparés grâce à un test de  $\chi^2$ . Les fréquences alléliques des gènes *kdr* et *ace I* ont été comparées entre traitements par un test exact de Fischer grâce au logiciel Genepop (Raymond and Rousset, 1995).

### 2.2.8. Résultats

#### 2.2.8.1. Capture à blanc

Avant de procéder à l'imprégnation des murs ou à l'installation des bâches imprégnées, nous avons réalisé une semaine de capture à blanc avec rotation des dormeurs/captureurs afin de comparer le taux d'entrée dans les six cases qui abriteront les traitements. Les résultats de ces captures à blancs sont présentés dans le tableau 2-4.

**Tableau 2-4** : Données de captures à blanc dans 6 cases expérimentales de la station VK7 (Burkina Faso)

Nombre de jours	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
J1	64	36	53	35	45	13
J2	149	40	60	178	84	195
J3	60	39	38	27	58	32
J4	42	63	20	22	43	75
J5	81	40	57	49	66	50
J6	62	75	43	56	33	41
Total	458	293	271	367	329	406

Ces résultats n'ont pas indiqué de différence significative entre les taux d'entrée des moustiques dans les 6 cases (ddl = 5;  $p = 0,392$ ).

### 2.2.8.2. Efficacité des traitements

L'efficacité de la PID et des BI associées ou non à la PermaNet® 2.0 a été évaluée pendant 8 semaines consécutives (27 octobre au 31 décembre 2008) correspondant à 56 nuits de capture par case (tableau 2-5). Pendant cette période, 1 374 *Anopheles gambiae* ont été capturés dont 263 dans la case témoin (case 1), 154 dans la case avec PermaNet® 2.0 seule (case 2), 302 dans la case avec PID (case 3), 198 dans la case avec BI (case 4), 256 avec PID + PermaNet® 2.0 (case 5) et 201 dans la case avec BI + PermaNet® 2.0 (case 6).

Considérant un total de 56 nuits de capture par case, 4,69 femelles de *An. gambiae* en moyenne ont été capturées par nuit dans la case témoin. 68,8% de femelles ont été trouvées gorgées (181/263) pendant que le dormeur était couché sous une moustiquaire non traitée aux insecticides. Ceci correspond à une moyenne de 3,23 piqûres par homme par nuit. L'exophilie naturelle a été de 20,5%. La mortalité « naturelle » observée dans la case témoin est relativement faible avec 2,7%, montrant une absence de «contamination insecticide» de cette case.

#### Effet dissuasif

La réduction du taux d'entrée (ou effet dissuasif) dans les cases a été très différente suivant les traitements. Cet effet a été plus élevé dans la case avec PermaNet® 2.0 seule (41,4%) suivie des cases BI (cases 4 et 6) avec 24% en moyenne tandis qu'il a été très faible voire nul dans les cases PID avec respectivement -14,8 (case 3) et 2,7% (case 5).

**Tableau 2-5:** Efficacité des différents traitements (PermaNet®2.0, PID, BI) seul ou en association - résultats cumulés sur des populations sauvages d'*An. gambiae* (après 56 nuits de capture) en cases expérimentales à la Vallée du Kou (VK7, Burkina Faso)

	<b>Témoïn</b>	<b>PermaNet® 2.0</b>	<b>PID bendiocarb</b>	<b>BI bendiocarb</b>	<b>PID+ PermaNet® 2.0</b>	<b>BI+ PermaNet® 2.0</b>
Total femelles collectées	<b>263</b>	<b>154</b>	<b>302</b>	<b>198</b>	<b>256</b>	<b>201</b>
Nombre femelle/nuit	4.69	2.75	5.39	3.53	4.57	3.58
Taux de dissuasion (%)		41.44	-14.83	24.71	2.66	23.57
Total femelles véranda	<b>54</b>	<b>123</b>	<b>89</b>	<b>72</b>	<b>155</b>	<b>101</b>
Taux d'expulsion (%)	20.53 <sup>a</sup>	79.87 <sup>b</sup>	29.47 <sup>c</sup>	36.36 <sup>c</sup>	60.55 <sup>d</sup>	50.25 <sup>e</sup>
95% intervalle de confiance	15.65-25.41	73.54 -86.2	24.33-34.61	29.66-43.09	54.56-66.53	43.34-57.16
Total femelles gorgées	<b>181</b>	<b>60</b>	<b>265</b>	<b>151</b>	<b>77</b>	<b>58</b>
Taux de gorgement (%)	68.82 <sup>a</sup>	38.96 <sup>b</sup>	87.75 <sup>c</sup>	76.26 <sup>a</sup>	30.08 <sup>b,d</sup>	28.86 <sup>d</sup>
95% intervalle de confiance	63.22-74.42	31.26-46.66	84.05-91.45	70.34-82.19	24.46-35.70	22.59-35.12
Taux d'inhibition du gorgement (%)	-	43.39	-27.50	NS	56.30	58.07.27
Total femelles mortes	<b>7</b>	<b>68</b>	<b>128</b>	<b>104</b>	<b>170</b>	<b>146</b>
Taux de mortalité (%)	2.66 <sup>a</sup>	44.16 <sup>b</sup>	42.38 <sup>b,c</sup>	52.53 <sup>b,d</sup>	66.41 <sup>e</sup>	72.64 <sup>e</sup>
95% intervalle de confiance	0.72-4.61	36.31-52,0	36.81-47.96	45.57-59.48	60.62-72.19	66.47-78.80
Corrected for control (%)		29.83	37.89	50.06	59.78	70.08

Les valeurs dans les mêmes lignes partageant la même lettre en exposant ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0,05$ ).

### Exophilie

L'exophilie induite par les différents traitements insecticides a été significativement plus élevée que celle dans la case témoin ( $P < 0,05$ ). L'exophilie induite a été particulièrement élevée dans les cases avec PermaNet® 2.0 seule (79,9%) ou associée à la PID (60,6%) ou à la BI (50,3%). Cette exophilie observée dans les cases PermaNet®2.0 a été significativement supérieure ( $P < 0,01$ ) à celle observée dans les cases traitées avec le bendiocarb seul, que ce soit la PID (29,5%) ou la BI (36,4%).

### Taux de gorgement

Le taux de gorgement mesuré dans les cases traitées avec la moustiquaire PermaNet® 2.0 seule (38,9%) ou en association avec le bendiocarb (30,1% avec PID et 28,9% avec BI) a été significativement plus faible que celui observé dans la case témoin (68,8%) ( $P < 0,01$ ). Les résultats montrent aussi que les cases traitées au bendiocarb seul (PID ou BI) ne confèrent aucune protection personnelle contre la piqûre avec des taux de gorgement de 87,8% et 76,3% respectivement.

### Effet létal

Le taux de mortalité observé a été significativement plus élevé dans les cases associant PermaNet® 2.0+PID (66,4%) ou PermaNet® 2.0+ BI (72,6%) que dans la case avec PermaNet® 2.0 seule (44,2%). On note aussi que les associations PermaNet® 2.0+PID (ou BI) donnent une meilleure efficacité que le bendiocarb seul, que ce soit en PID (42,4%) ou en BI (52,5%). Pour le bendiocarb à la même concentration (400 mg/m<sup>2</sup>), la bâche apparaît significativement plus efficace que la PID.

#### **2.2.8.3. Activité résiduelle des supports traités en cases expérimentales**

Avec la souche sensible de référence *An. gambiae* « Kisumu », 10 jours après la mise en route de l'évaluation, les taux de mortalité obtenus ont été de 100% pour la moustiquaire imprégnée (PermaNet® 2.0), les murs et les bâches traités avec le bendiocarb (tableau 2-6).

**Tableau 2-6** : Taux de mortalité de la souche *Anopheles gambiae* « Kisumu » 10 jours après les traitements

Traitements	% KD 60 min	% Mortalité après 24 h	n
Moustiquaire non imprégnée	0.00 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	15
PermaNet® 2.0	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	42
PID+ PermaNet® 2.0	-	100 <sup>b</sup>	33
BI+PermaNet® 2.0	-	100 <sup>b</sup>	28

Les valeurs dans les mêmes colonnes portant la même lettre en exposant ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0.05$ )

21 jours après les traitements, les taux de mortalité obtenus avec la souche sensible de référence de *An. gambiae* « Kisumu » ont toujours été de 100% pour les moustiquaires imprégnées (PermaNet® 2.0) ainsi que pour les bâches imprégnées de bendiocarb. Par contre, le taux de mortalité a été en deçà de 100% pour la PID. Les taux de mortalité enregistrés dans ces traitements ont été respectivement de 39,7% (case 3) et 93% (case 5 en association) (tableau 2-7).

**Tableau 2-7**: Taux de mortalité de la souche *Anopheles gambiae* « Kisumu » 21 jours après les traitements

Traitements	% KD 60 min	% Mort. 24 hrs	n
Moustiquaire non imprégnée	0.00 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	59
PermaNet® 2.0 (bras 2)	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	62
PID (case 3)	-	39,7 <sup>c</sup>	58
BI (case 4)	-	100 <sup>b</sup>	66
PID (case 5)	-	93 <sup>b</sup>	57
PermaNet® 2.0 (case 5)	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	62
BI (case 6)	-	100 <sup>b</sup>	50
PermaNet® 2.0 (case 6)	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	69

Les valeurs dans les mêmes colonnes portant la même lettre en exposant ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0.05$ )

Quatre mois après les traitements, la baisse de l'efficacité insecticide se confirme avec respectivement 29,4% (case 3) et 51,6% (case 5) de mortalité de la souche sensible « Kisumu » de *An. gambiae*. Pour tous les autres traitements, PermaNet® 2.0 et BI, seul ou



en association, la mortalité de la souche sensible de référence demeure maximale après 120 jours (tableau 2-8).

**Tableau 2-8**: Taux de mortalité de la souche *Anopheles gambiae* « Kisumu » 120 jours après les traitements

Traitements	% KD 60 min	% Mort. 24 hrs	n
Moustiquaire non imprégnée	0.00 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	49
PermaNet® 2.0 (case 2)	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	56
PID (case 3)	-	29,4 <sup>c</sup>	75
BI (case 4)	-	100 <sup>b</sup>	62
PID (case 5)	-	51,6 <sup>d</sup>	64
BI (case 6)	-	100 <sup>b</sup>	68

Les valeurs dans les mêmes colonnes portant la même lettre en exposant ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0.05$ )

Les taux de mortalité obtenus avec la population sauvage de *An. gambiae* forme M de VK7, 7 jours après la mise en route de l'évaluation ont été relativement bas et ont varié de 33,3% avec la moustiquaire imprégnée (PermaNet® 2.0), à 78,1% sur les murs traités avec le bendiocarb et 97,6% sur les bâches traitées avec le bendiocarb (tableau 2-9).

**Tableau 2-9**: Taux de mortalité de la population locale de *Anopheles gambiae* « VK7 » 7 jours après les traitements

	% KD 60 min	% Mort. 24 hrs	n
Moustiquaire non imprégnée	0.00 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	36
PermaNet® 2.0	100 <sup>b</sup>	33,3 <sup>b</sup>	42
PID+ PermaNet® 2.0	-	78,1 <sup>c</sup>	32
BI+PermaNet® 2.0	-	97,6 <sup>d</sup>	42

Les valeurs dans les mêmes colonnes portant la même lettre en exposant ne diffèrent pas significativement ( $P \geq 0.05$ )

#### 2.2.8.4. Effet des traitements sur les gènes de résistance *kdr* et *ace I<sup>R</sup>*

325 femelles de *An. gambiae* ont été analysées pour la détermination de leur forme moléculaire, et de leur génotype pour les gènes de résistance *kdr* et *ace I<sup>R</sup>*. Environ 98% des

moustiques traités (321 des 325) ont été de la forme moléculaire M. La fréquence allélique des mutations *kdr* et *ace I<sup>R</sup>* a été respectivement 90% et 11% dans la case témoin.

Les résultats du génotypage (*kdr* et *ace I<sup>R</sup>*) des moustiques capturés dans les cases traitées sont présentés dans le tableau 2-10.

La fréquence allélique du gène *kdr* n'a pas été significativement différente chez les moustiques morts et chez ceux vivants quel que soit le traitement ( $P > 0,53$ ). Par contre, la fréquence allélique du gène *ace I<sup>R</sup>* a été plus élevée chez les moustiques vivants que chez les morts issus des mono-traitements PID et BI ( $P = 0,03$  et  $P = 0,02$ ). Ces résultats suggèrent qu'une pression de sélection a été exercée par ces mono traitements sur le gène de résistance *ace I<sup>R</sup>*. En revanche, avec les combinaisons (Permanet® 2.0+PID et Permanet® 2.0+BI), la fréquence allélique de ce gène n'a pas été significativement différente ( $P = 0,27$  et  $P = 0,20$ ) chez les morts et chez les vivants, suggérant une absence de pression de sélection sur ce gène par les combinaisons.

**Tableau 2-10:** Fréquences alléliques des mutations *kdr* (L1014F) et *ace I<sup>R</sup>* Fr(G119S) chez les moustiques morts et vivants selon le traitement

Treatments	Fr(L1014F)			Fr(G119S)		
	Moustiques vivants (n)	Moustiques morts (n)	p	Moustiques vivants (n)	Moustiques morts (n)	p
<b>PermaNet® 2.0</b>	0,92 (30)	0,92 (30)	1	0,12 (30)	0,03 (30)	0,16
<b>PID bendiocarb</b>	0,91 (40)	0,88 (20)	0,53	0,13 (40)	0,00 (20)	0,03
<b>BI bendiocarb</b>	0,92 (33)	0,92 (26)	1	0,15 (33)	0,02 (26)	0,02
<b>PID+ PermaNet® 2.0</b>	0,90 (30)	0,93 (29)	0,74	0,09 (29)	0,03 (30)	0,27
<b>BI+ PermaNet® 2.0</b>	0,89 (26)	0,87 (34)	1	0,14 (25)	0,06 (34)	0,2

Fr=féquence allélique ; n= nombre de moustiques testés ; P=probabilité

#### 2.2.8.5. Effets secondaires

Les six captureurs-dormeurs impliqués dans l'étude ont été questionnés quotidiennement mais aussi à la fin de l'évaluation sur les effets secondaires éventuels ressentis en dormant dans cet environnement traité aux insecticides. Depuis le début de l'évaluation (27 Octobre 2008) jusqu'à la fin de l'évaluation (31 Décembre 2008), il n'a été rapporté aucun effet secondaire par ces six volontaires. Sur leur demande, il a été mis en permanence à leur disposition des

médicaments antipaludiques (Coartem, Cotexin, Coarsucam) et antipyrétique (paracétamol) avec une surveillance médicale durant toute la durée de l'évaluation. Mais aucun cas de paludisme n'avait été signalé au cours de l'évaluation qui a été close dès que la saison sèche et froide s'est installée.

### **3. Discussion et conclusion**

#### **3.1. Discussion**

Les études des phases I et II nous ont permis d'identifier un support à imprégner et de déterminer une configuration optimale pour le traitement des murs en phase opérationnelle. Le meilleur support a été le polypropylène tissé. Ces études nous ont également permis de montrer l'efficacité du concept de combinaison des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine à longue durée d'action avec les bâches murales imprégnées de bendiocarb contre les moustiques résistants en conditions semi-naturelles. Cette combinaison en conditions semi-naturelles a été efficace aussi bien en termes de réduction du contact homme-vecteurs, qu'en termes de gestion de la résistance.

Une bonne résistance aux lavages du polypropylène tissé comparé aux autres supports a été observée, ce qui s'expliquerait en partie par la structure tissée de ce support. Une partie de l'insecticide pourrait être retenue dans les fibres et ainsi échapper plus longtemps à l'effet « abrasif » des lavages. Par ailleurs, il est possible également qu'une interaction plus forte existe entre le polypropylène et le bendiocarb.

En cas expérimentales avec lâcher-recaptures de moustiques, nos résultats ont montré une efficacité supérieure des associations de moustiquaire imprégnée de deltaméthrine et de support mural imprégné de bendiocarb contre des moustiques *An. gambiae* et *Cx. quinquefasciatus* fortement résistants aux pyréthrinoïdes par rapport à la moustiquaire seule. Juste après le lâcher, nous avons observé que les moustiques se posaient majoritairement sur les murs traités avec le bendiocarb (peu irritant) et ce d'autant plus que les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes sont connues pour leur effet excito-répulsif. La quantité de bendiocarb qu'ils absorbent au niveau des tarse est probablement suffisante pour entraîner leur mort. La quantité de bendiocarb absorbée par les moustiques pourrait même agir en synergie avec la deltaméthrine lorsque les moustiques vont au contact de la moustiquaire pour

prendre leur repas de sang. Des études toxicologiques et électro physiologiques ont démontré cette synergie et proposé une cascade d'événements moléculaires pour l'expliquer (Corbel *et al.*, 2003).

Des supports plastiques traités avec la perméthrine ont déjà été testés au Burkina Faso (Diabate *et al.*, 2006) et ont montré une efficacité proportionnelle à la surface de mur couverte. Mais les taux de mortalité induite par ces supports étaient relativement faibles (44,5% de mortalité avec les 4 murs couverts) en raison notamment de la présence de la mutation *kdr* à une forte fréquence allélique et de la forte irritabilité de la perméthrine vis-à-vis des moustiques. Dans notre étude, nous avons utilisé un insecticide ayant une autre cible que le canal sodium et faiblement irritant (Evans, 1993), ce qui augmente ici l'efficacité létale du plastique mural imprégné de bendiocarb. La couverture seulement du tiers supérieur des murs des cases en effet a eu une efficacité satisfaisante de 80%. L'utilisation de carbamates ou d'organophosphorés sur des matériaux imprégnés contre des populations résistantes de *An. gambiae* a déjà fait l'objet de plusieurs études (Corbel *et al.*, 2002, Curtis, 1996, Guillet *et al.*, 2001). Ces insecticides se sont révélés efficaces et constituent potentiellement de bonnes alternatives contre les vecteurs du paludisme résistants aux pyréthrinoïdes, bien qu'ils ne confèrent que peu de protection personnelle de par leur faible pouvoir irritant (Guillet *et al.*, 2001). Leur utilisation comme outil complémentaire aux moustiquaires imprégnées est donc prometteur en termes de lutte anti vectorielle et de gestion de la résistance. A noter que dans les études précédentes, les carbamates ont été utilisés sur des moustiquaires ou des rideaux. Ceci pose la question du risque encouru par les utilisateurs, en l'occurrence les enfants, car le risque de contact avec l'insecticide carbamate est dans ce cas beaucoup plus élevé. C'est par souci de limiter celui-ci que nous avons testé la couverture du 1/3 supérieur des murs qui s'est d'ailleurs avéré satisfaisante sur le plan de l'efficacité.

Le taux de gorgement de 39% observé avec la PermaNet® 2.0 en conditions semi-naturelles (avec une entrée des moustiques sauvages) indique une réduction de moitié du contact homme-vecteur par rapport à la même moustiquaire non traitée (69%). Ce résultat montre que malgré la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes, la moustiquaire imprégnée constitue toujours un outil efficace de protection personnelle contre les piqûres de moustiques. L'inhibition du taux de gorgement a été très clairement renforcée par l'association de la deltaméthrine avec le bendiocarb surtout en imprégnation sur la bâche. Le bendiocarb seul, que ce soit en PID ou en BI, n'a pas réduit le contact homme-vecteur le taux de gorgement qui est resté similaire voir supérieur à celui obtenu dans la case témoin.

La mortalité observée avec l'association de la moustiquaire Permanet® 2.0 et de la bâche imprégnée (ou de la pulvérisation intra domiciliaire) a été significativement plus élevée que celle observée avec les mono-traitements. D'une manière générale, l'association PermaNet 2.0 + PID ou mieux encore PermaNet 2.0 + BI a permis d'augmenter les taux de mortalité et d'inhibition de gorgement comparativement à la PermaNet 2.0 seule en mettant nettement en évidence le bénéfice d'utiliser cette combinaison pour la lutte contre les vecteurs résistants aux pyréthrinoïdes.

Avec la pulvérisation intra domiciliaire de bendiocarb (PID), la mortalité a été significativement plus faible qu'avec les bâches imprégnées de bendiocarb (BI) seules. Il semblerait que la bâche en polypropylène, contrairement au mur qui absorbe la solution insecticide, permet une meilleure biodisponibilité de l'insecticide en surface, confirmant les résultats des bio-essais. Cela est d'autant plus intéressant que cet effet pourrait compenser la couverture incomplète des bâches sur les murs (placée au 1/3 haut). De façon globale, les faibles taux d'exophilie, d'inhibition du gorgement et de mortalité observés avec la PID s'expliqueraient par une rémanence faible due à la nature du mur (en parpaing) qui ne favoriserait pas une bonne rétention de l'insecticide ou à une dégradation progressive de l'insecticide dont les quantités résiduelles ne suffiraient plus à assurer une bonne efficacité de celui-ci.

La mise au point des supports plastiques pré imprégnés à longue durée d'action constituerait une alternative sérieuse aux pulvérisations intra domiciliaires classiques. L'activité résiduelle du bendiocarb ne dépasse en effet pas 3 mois alors que ces supports plastiques pré imprégnés à longue durée à l'instar des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action pourraient avoir une durée de vie de 3 voire 5 ans.

Un faible effet létal des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine contre les populations sauvages de *An. gambiae* et de *Cx. quinquefasciatus* multi-résistantes aux pyréthrinoïdes a été observé. Ces résultats confirment ceux de Corbel *et al.*, (2004) obtenus dans les cases expérimentales de Ladj (Bénin) et qui avaient montré une faible mortalité des populations résistantes de *An. gambiae* (seulement 50% de mortalité à 1 g/m<sup>2</sup> de perméthrine) sur les moustiquaires imprégnées de perméthrine (Corbel *et al.*, 2004). Une étude plus récente menée sur ces mêmes populations de moustiques a confirmé la baisse d'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïde (lambda-cyhalothrine), soulignant ainsi la nécessité de mettre en place des nouvelles stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme (N'Guessan *et al.*, 2007).

### 3.2. Conclusion

Les résultats présentés ici montrent les bénéfices de l'association de deux classes d'insecticides (pyréthrinoïde, carbamate) à travers des méthodes de lutte anti vectorielle différentes (moustiquaires imprégnées, pulvérisation intra domiciliaire, bâche imprégnée) notamment dans un contexte de multi-résistance à la fois aux pyréthrinoïdes (*kdr*), aux organophosphorés et aux carbamates (*ace-1<sup>R</sup>*). L'association de ces deux méthodes combine donc l'effet protecteur contre les piqûres de la moustiquaire imprégnée de pyréthrinoïdes et l'effet létal des supports imprégnés de bendiocarb. La combinaison au sein d'une même habitation des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes et des bâches murales imprégnées de bendiocarb apparaît donc comme une approche prometteuse aussi bien en termes de lutte anti vectorielle contre le paludisme qu'en termes de gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme. Cette stratégie reste toutefois à être validée par des études à l'échelle communautaire associant une évaluation entomologique, parasitologique et clinique et l'acceptabilité de ces combinaisons (phase III).

## **Chapitre 3 : Etudes à l'échelle communautaire (phase III)**

Face à la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme, les combinaisons d'insecticides résiduels dans les habitations peuvent être une solution. Dans ce contexte, nous avons expérimenté une stratégie associant des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (deltaméthrine) et du bendiocarb en aspersion intra domiciliaire ou en imprégnation de bâches murales. Ce nouveau concept a été évalué en cases expérimentales (en phase II) contre des populations sauvages très résistantes de *An. gambiae* du Bénin (Djènontin *et al.*, 2009) et du Burkina Faso (Djènontin *et al.*, 2010a) avec des résultats prometteurs. Des évaluations en phase III à l'échelle communautaire sont maintenant nécessaires pour la validation finale de cet outil de lutte antivectorielle.

Cette évaluation a été menée dans 28 villages de la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori au sud du Bénin. Puisque très peu de données entomologiques et épidémiologiques sur la zone d'étude étaient disponibles, il a été nécessaire de collecter les données de base avant la mise en place des interventions. A cet effet, 5 enquêtes entomologiques et parasito-cliniques ont été effectuées d'octobre 2007 à mai 2008. Ces enquêtes ont permis de caractériser la faune culicidienne et de mesurer la transmission du paludisme.

Les stratégies de lutte anti vectorielle ont été ensuite mises en place puis, un suivi entomologique, parasitologique et clinique a été effectué afin de mesurer leur impact sur la transmission du paludisme, l'infection et la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans, de même que sur la dynamique de la résistance aux insecticides des vecteurs.

## **1. Données de base de la zone d'étude**

Les données détaillées de ces recherches sont présentées dans les articles 3 et 4 en annexe.

Article 3 : **Djènontin A**, S. Bio Bangana, N. Moiroux, M-C Henry, O. Bousari, J. Chabi, R. Osse, S. Koudenoukpo, V. Corbel, M. Akogbéto, F. Chandre. ***Culicidae* diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study.** *Parasites & vectors* 2010, **3**:83

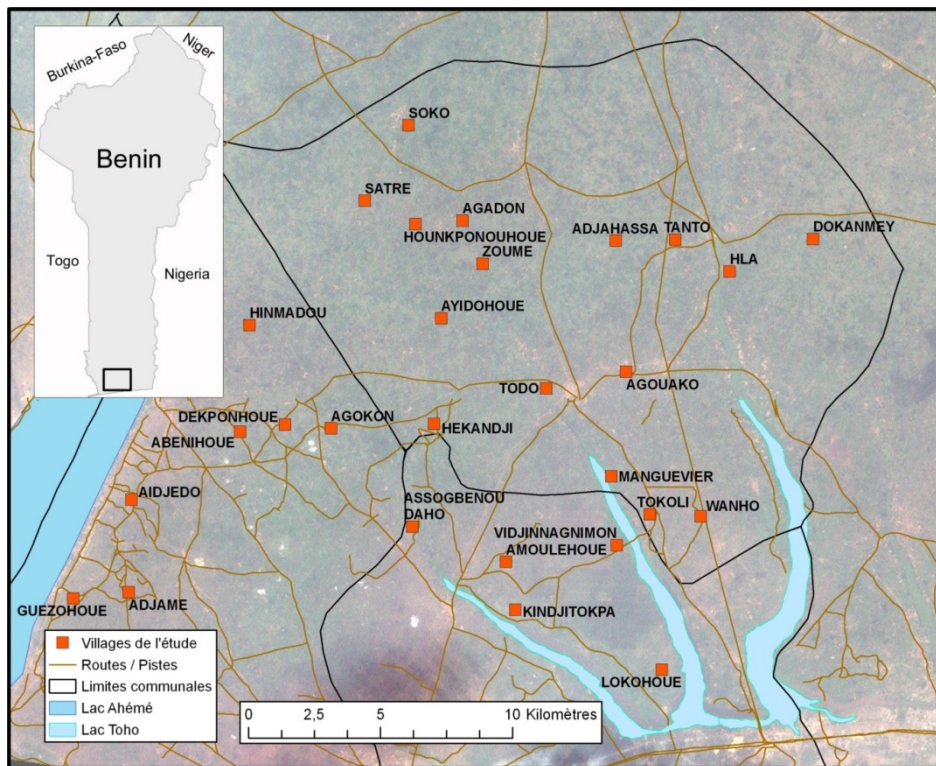
Article 4 : Damien BG, **Djènontin A**, Chandre F, Corbel V, Akogbéto M, Kindé-Gazard D, Henry M-C. **Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin.** *Malaria Journal* 2010, **9**:380



## 1.1. Description de la zone d'étude

La zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori est l'une des 36 zones sanitaires de la République du Bénin. Elle regroupe 176 villages et quartiers de ville et 25 arrondissements. Elle est limitée à l'est par la commune d'Abomey-Calavi, à l'ouest par le département du Mono, au nord par les communes d'Allada et de Zè et au sud par l'océan Atlantique.

Dans cette zone sanitaire, 28 villages ont été choisis (figure 3-1) selon les critères démographiques, de distance inter-villages, d'accessibilité et de l'absence de structure sanitaire. Les villages sélectionnés comprenaient au moins 300 habitants dont au moins 60 enfants de moins de 5 ans et ne possédaient pas de centre de santé, ce qui aurait été l'objet de facteurs de confusion avec nos propres interventions. Pour limiter l'impact des flux de populations anophéliennes d'un village à l'autre la distance entre 2 villages était d'au moins 2 Km.



**Figure 3-1** : Carte de la zone d'étude montrant les villages sélectionnés

### **1.1.1. Milieu naturel**

La zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito est marquée par un climat sub-équatorial caractérisé par deux saisons sèches (Août-Septembre et Décembre-Février), et deux saisons de pluies (Mars-Juillet et Octobre-Novembre). La pluviométrie moyenne annuelle est voisine de 1200 mm, dont 700-800 mm pour la première saison pluvieuse et 400-500 mm pour la seconde saison des pluies. Les températures moyennes mensuelles varient entre 27°C et 31°C. On note une diminution du niveau des précipitations du nord vers le sud et de l'est vers l'ouest.

La partie supérieure de la zone sanitaire est formée par un plateau de terre de barre qui descend vers la vallée du Couffo et la dépression de la Lama. La forte densité de population qui caractérise cette région et la pression exercée par la proximité des grands centres urbains de la côte constituent des débouchés certains pour l'écoulement des produits agricoles.

Cette zone est largement défrichée et la forêt équatoriale originelle n'existe plus qu'en petits îlots d'extension négligeable. Actuellement, la végétation est caractérisée par un bush arbustif, associé à des peuplements plus ou moins denses de palmiers à huile, que l'on retrouve sur les plateaux soit à l'état naturel, soit en plantations industrielles.

### **1.1.2. Caractéristiques démographiques**

La population de cette zone sanitaire selon les résultats du troisième recensement général de la population et des habitations (RGPH3) de février 2002 est de 178314 habitants dont 51,3% de femmes et 48,7% d'hommes. Environ 37,9% de cette population vit en milieu urbain et 62,1% en milieu rural. On rencontre essentiellement les ethnies Aïzo, Fon et Adja. Les principales religions sont le christianisme et/ou l'animisme.

### **1.1.3. Activités économiques**

Les activités économiques dominantes sont le commerce et l'agriculture. Dans cette zone sanitaire comme partout ailleurs au Bénin, les paysans continuent de pratiquer l'agriculture sur brûlis avec des outils rudimentaires tels que la houe, le coupe-coupe, la hache etc., ce qui limite la production qui sert essentiellement à la subsistance des populations rurales. Le maïs et le manioc, base de l'alimentation des populations de la zone viennent largement en tête de la production agricole avec plus de 80% des superficies emblavées. L'arachide vient en tête

des cultures oléagineuses annuelles. Les cultures maraîchères se développent pour satisfaire les besoins des centres urbains.

L'élevage est très peu développé, peu organisé et constitue une activité secondaire pour quelques agriculteurs. Les principales espèces élevées sont les bovins, les ovins et caprins, les porcins et les volailles. Les élevages non conventionnels (lapins, escargots, aulacodes) se développent et constituent une forme de diversification de la production animale.

La pêche est relativement développée à Ouidah et à Kpomassè grâce aux nombreux cours d'eau et mobilise aussi bien des nationaux que des étrangers.

## **1.2. Collecte et traitements des données**

### **1.2.1. Collecte et identification des moustiques**

Les moustiques ont été collectés par des volontaires éveillés. Dans chaque village, 10 hommes ont été choisis en collaboration avec le chef de village. Parmi ces 10 personnes, 2 superviseurs sachant lire et écrire le français ont été désignés, les 8 autres ont été employés comme captureurs. Les captureurs et leurs superviseurs ont signé un consentement éclairé, puis ont été formés. Les captureurs ont été vaccinés contre la fièvre jaune et soignés en cas de maladie par l'équipe médicale locale aux frais du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC).

Les captures ont été organisées toutes les 6 semaines dans les 28 villages. Dans chaque village, à chaque enquête entomologique, les captures ont été organisées pendant 2 nuits consécutives de 22 heures à 6 heures du matin en 4 points représentatifs de l'ensemble du village. En chaque point, 2 captureurs sont placés, l'un à l'intérieur et l'autre à l'extérieur d'une case. Les moustiques capturés ont été regroupés dans des sacs par tranche horaire. Après chaque heure de capture, les 2 superviseurs collectent ces sacs et les rangent selon le lieu de capture. Un contrôle de qualité a été instauré par une équipe du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) qui séjourne dans les villages au moment des captures.

Cette étude a reçu l'avis favorable du Comité National Provisoire d'Ethique pour la Recherche en Santé du Ministère de la Santé de la République du Bénin et du Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique de l'IRD.

### **1.2.2. Traitement des moustiques**

Les moustiques ramenés des villages ont été dénombrés et identifiés à la loupe et à l'aide de clés de détermination (Edwards, 1941, Gillies and Coetzee, 1987, Gillies and De Meillon, 1968). Les femelles de *An. gambiae*, de *An. funestus* et de *An. nili* ont été conservées dans des tubes individuels de 1,5 ml ou 0,5 ml contenant du silicagel et stockées à -20°C. Ces moustiques ont été découpés en 2 parties, tête-thorax et abdomen. La partie tête-thorax a été analysée par test ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay) pour la recherche des antigènes Circum Sporozoite Protein (Wirtz *et al.*, 1987) (voir annexe). L'ADN de l'abdomen a été analysé pour la détermination des espèces du complexe *An. gambiae* (Scott *et al.*, 1993) ou du groupe *An. funestus* (Koekemoer *et al.*, 2002), la détermination des formes moléculaires au sein de l'espèce *An. gambiae s.s* (Favia *et al.*, 2001) et la détermination du génotype des moustiques *An. gambiae s.l.* pour les mutations *kdr* (Martinez Torres *et al.*, 1998) et *ace I<sup>R</sup>* (Weill *et al.*, 2004) (voir protocoles détaillés en annexe).

### **1.2.3. Collecte des données parasitologiques et cliniques**

Une étude épidémiologique descriptive du paludisme combinant une étude longitudinale de la maladie et une étude transversale de l'infestation a été réalisée dans les villages. Elle a porté dans chaque village sur un échantillon de 60 enfants sélectionnés par tirage au sort. Le recueil des données parasitologiques et cliniques a été fait par une équipe médicale constituée d'un médecin stagiaire et de 06 infirmiers aidés par des relais communautaires choisis dans les villages. Les parents des enfants sélectionnés ont été sensibilisés et ont signé un consentement éclairé. Par ailleurs, cette étude a reçu l'accord éthique du Comité National Provisoire pour l'Ethique de la Recherche en Santé (CNPERS) du Ministère de la Santé du Bénin.

L'étude longitudinale a consisté en une détection active des accès palustres menée durant 6 jours consécutifs toutes les 6 semaines par un infirmier qui séjourne dans le village. Le relais communautaire et l'infirmier passent chaque jour (tôt le matin) dans chaque famille pour détecter les enfants malades. Les enfants suspectés malades sont examinés à domicile et une goutte épaisse (GE) est systématiquement prélevée. Quand un accès palustre est suspecté (enfant malade ayant une température axillaire supérieure ou égale à 37°5C ou présentant un autre symptôme évoquant le paludisme), l'enfant est traité avec l'artemether - lumefantrine (Coartem®) en conformité avec les recommandations de l'OMS (WHO, 2006).

Au quatrième jour de chaque période de surveillance clinique, les enfants asymptomatiques c'est-à-dire ceux dont la température axillaire est confirmée inférieure à 37,5°C et ne signalant aucune plainte sont prélevés pour une GE. Les enfants ayant présenté des symptômes palustres les jours suivant l'enquête transversale sont prélevés une deuxième fois avant d'être mis sous traitement.

#### **1.2.4. Analyse des résultats**

Le taux de positivité au CSP de chaque vecteur avec son intervalle de confiance à 95% a été calculé et le Taux d'Inoculation Entomologique (TIE) a été estimé et exprimé en nombre de piqûres infectantes par personne par 100 nuits. Ensuite, le nombre de moustiques et le TIE par village ont été analysés avec un Modèle Linéaire à Effet Mixte (LME) grâce au logiciel d'analyses statistiques R. Ce modèle s'exprime par :

$$\text{Log}(x) = \beta_0 + \beta_{1i} + a_i, \text{ où :}$$

$x$  = Nombre moyen de moustiques (ou TIE moyen) par village par enquête

$\beta_0$  = Valeur estimée du coefficient associé au village de référence

$\beta_{1i}$  Valeur estimée du coefficient associé au village  $i$

$a_i$  = Variance intra-village

$i$  = Indice du village

Des groupes homogènes de villages selon l'indicateur entomologique considéré ont été constitués en prenant en compte le coefficient estimé  $\beta_i$  et la probabilité qui lui est associée. Au sein de chaque groupe, le nombre moyen de moustiques capturés par village par enquête ou le nombre moyen de piqûres infectantes par personne par 100 nuits ont été calculés avec leur intervalle de confiance à 95%.

La différenciation génotypique pour les mutations *kdr* et *ace 1<sup>R</sup>* a été testée par un test exact de Fischer grâce au logiciel Genepop (Raymond and Rousset, 1995).

### **1.3. Résultats**

#### **1.3.1. Densité et diversité des moustiques**

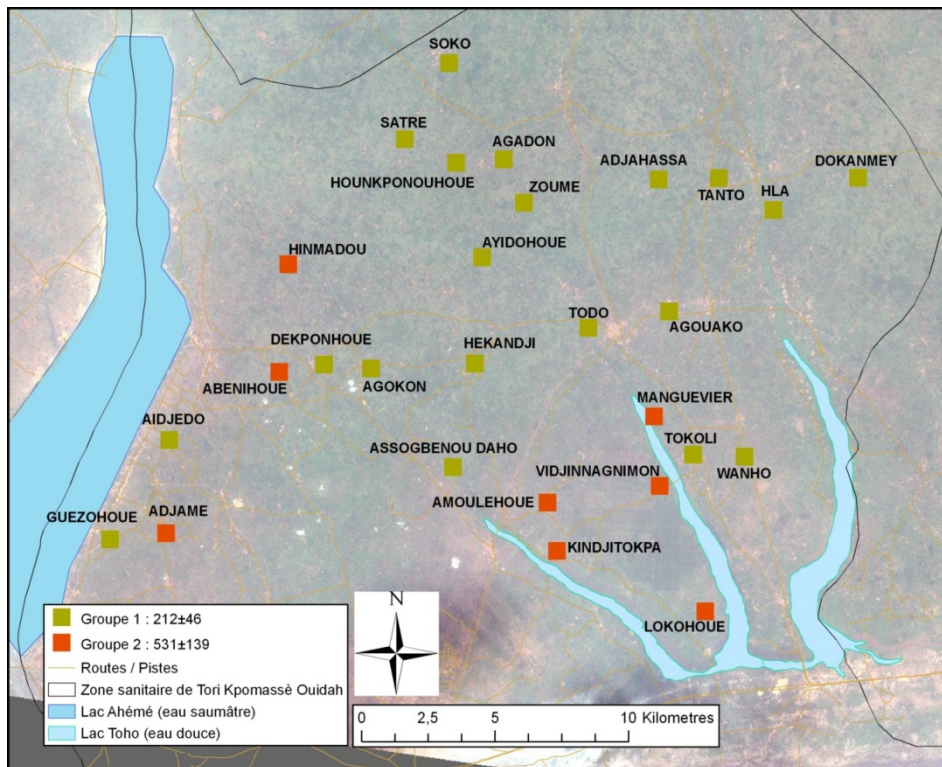
Au total 44 693 moustiques appartenant à 28 espèces ont été capturés d'octobre 2007 à mai

2008. Parmi ces moustiques, 1139 (2,55%) appartenait au genre *Anopheles*, 1487 (3,33%) au genre *Aedes*, 22010 (49,25%) au genre *Culex*, et 20053 (44,87%) au genre *Mansonia*. Les moustiques vecteurs du paludisme capturés ont été au nombre de 892, représentant environ 2% du total des moustiques capturés (tableau 3-1). Parmi les anophèles vecteurs, 318 appartenait au complexe *An. gambiae s.l* et étaient tous membres de l'espèce *An. gambiae s.s.* (217 de forme moléculaire S et 101 de forme M); 568 du groupe *An.funestus* dont un seul individu capturé à Tokoli-Vidjinangnimon était *An. lesoni*, les autres étant membres de l'espèce *An. funestus s.s.* Par ailleurs, 2 *An. nili s.l.* ont été capturés dans les villages de Tanto et de Dékponhoué.

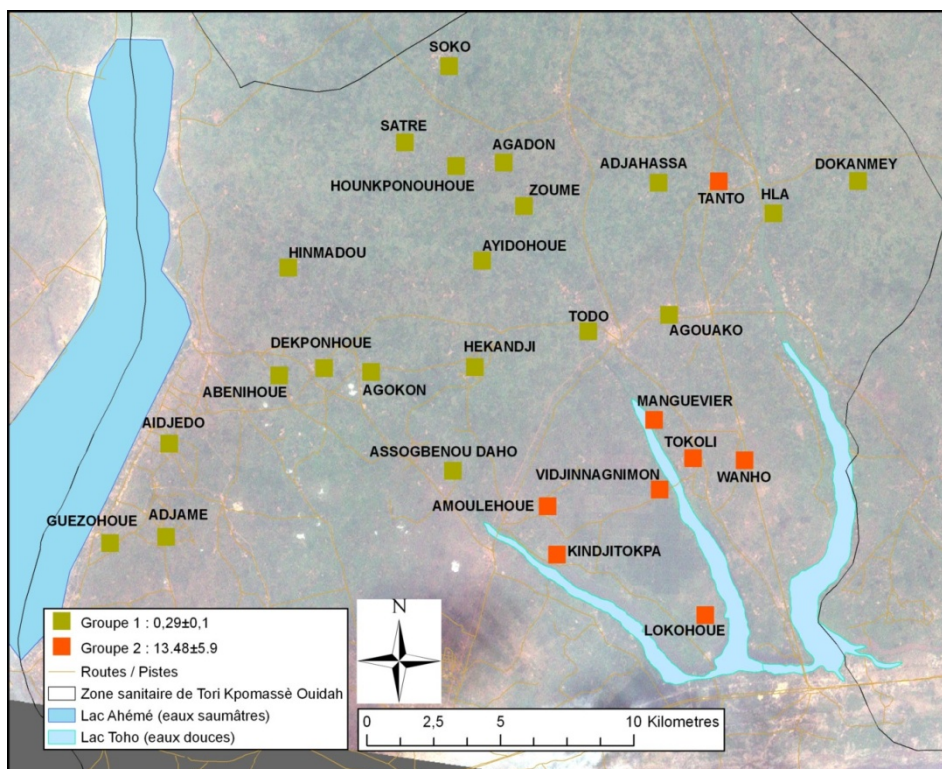
Lorsque nous considérons le nombre de Culicidés, 2 groupes homogènes de villages se distinguent avec respectivement  $212 \pm 46$  et  $531 \pm 139$  moustiques capturés par village par enquête (Figure 3-2). En considérant *An. funestus s.l.*, également 2 groupes de villages s'observent avec  $0,29 \pm 0,1$  et  $13,5 \pm 5,9$  moustiques *An. funestus* (Figure 3-3). Pour *An. gambiae*, en moyenne  $0,4 \pm 0,2$  ;  $1,8 \pm 0,6$  et  $7,4 \pm 3,5$  moustiques ont été capturés par village et par enquête dans 3 différents groupes de villages (Figure 3-4).

**Tableau 3-1:** Espèces de moustiques collectées d'octobre 2007 à mai 2008 dans la zone d'étude

Espèces	Intérieur	Extérieur	Total	%
<i>Aedes aegypti</i>	388	318	706	1.58
<i>Aedes gr. palpalis</i>	12	28	40	0.09
<i>Aedes gr. tarsalis</i>	4	4	8	0.02
<i>Aedes luteocephalus</i>	21	41	62	0.14
<i>Aedes sp</i>	13	37	50	0.11
<i>Aedes vittatus</i>	199	396	595	1.33
<i>Anopheles brohieri</i>	1	0	1	0.00
<i>Anopheles coustani</i>	3	5	8	0.02
<i>Anopheles funestus</i>	314	265	579	1.30
<i>Anopheles gambiae</i>	149	173	322	0.72
<i>Anopheles nili</i>	1	1	2	0.00
<i>Anopheles pharoensis</i>	60	135	195	0.44
<i>Anopheles ziemanni</i>	12	20	32	0.07
<i>Culex annulioris</i>	185	428	613	1.37
<i>Culex duttoni</i>	36	18	54	0.12
<i>Culex fatigans</i>	270	436	706	1.58
<i>Culex gr. decens</i>	4720	8649	13369	29.91
<i>Culex nebulosis</i>	1040	1738	2778	6.22
<i>Culex perfuscus</i>	2	0	2	0.00
<i>Culex poicilipes</i>	2	14	16	0.04
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1170	3213	4383	9.81
<i>Culex tigripes</i>	17	38	55	0.12
<i>Culex sp</i>	17	17	34	0.08
<i>Culex thalassius</i>	10	16	26	0.06
<i>Eretmapodites gr.</i>				
<i>quinquevittatus</i>	0	3	3	0.01
<i>Mansonia africana</i>	7652	12390	20042	44.84
<i>Mansonia uniformis</i>	7	4	11	0.02
<i>Uranotaenia gr bilineata</i>	1	0	1	0.00
<b>Total</b>	<b>16306</b>	<b>28387</b>	<b>44693</b>	

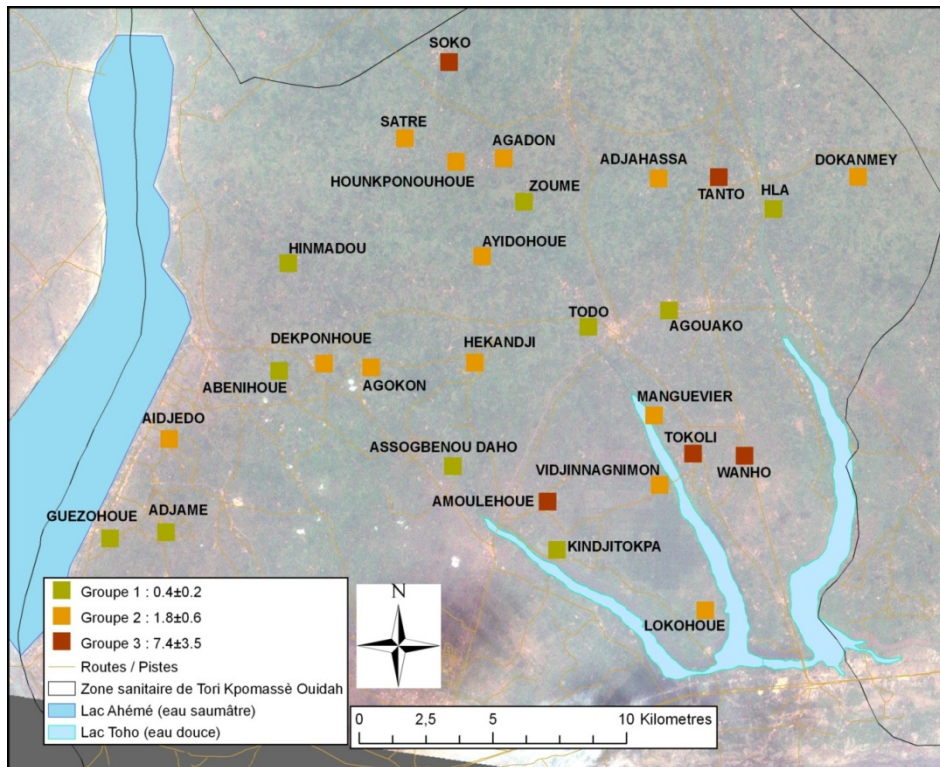


**Figure 3-2 :** Nombre moyen de Culicidés capturés par village et par enquête d’octobre 2007 à mai 2008



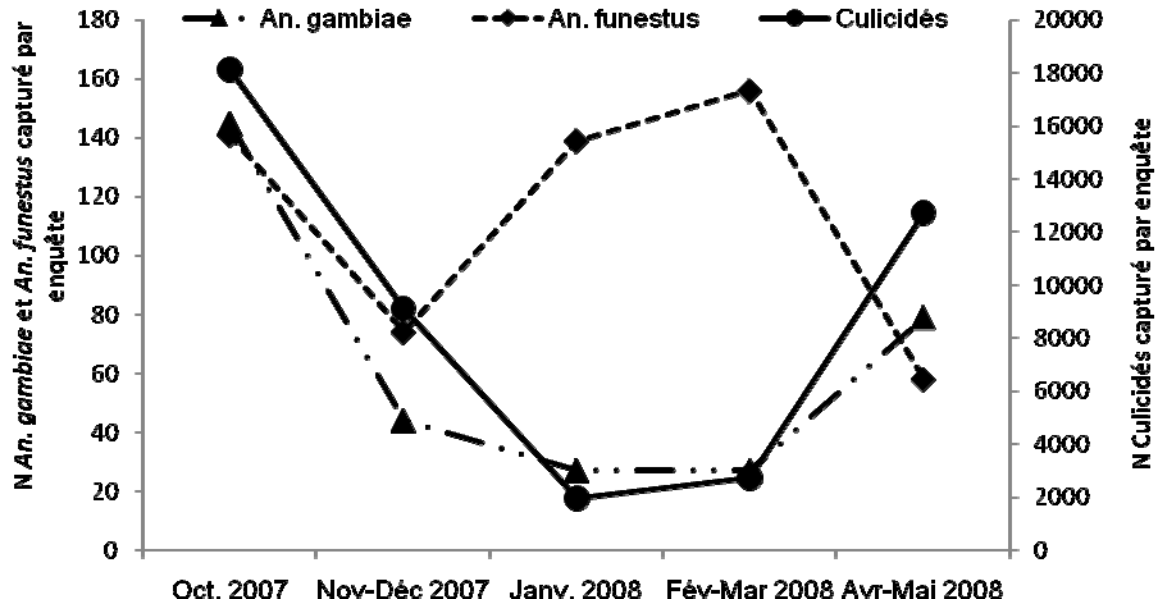
**Figure 3-3 :** Nombre moyen de *An. funestus s.l.* capturés par village et par enquête d’octobre 2007 à mai 2008





**Figure 3-4** : Nombre moyen de *An. gambiae s.l.* capturés par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

Le nombre de moustiques capturés a également varié en fonction des enquêtes (figure 3-5). En octobre, le nombre de Culicidés (18144), et le nombre de *An. gambiae* (145) ont été plus élevés. Ces nombres ont été en revanche plus faibles au cours des enquêtes de janvier et de février-mars, au moment où le nombre de *An. funestus* capturé a été plus élevé (156).

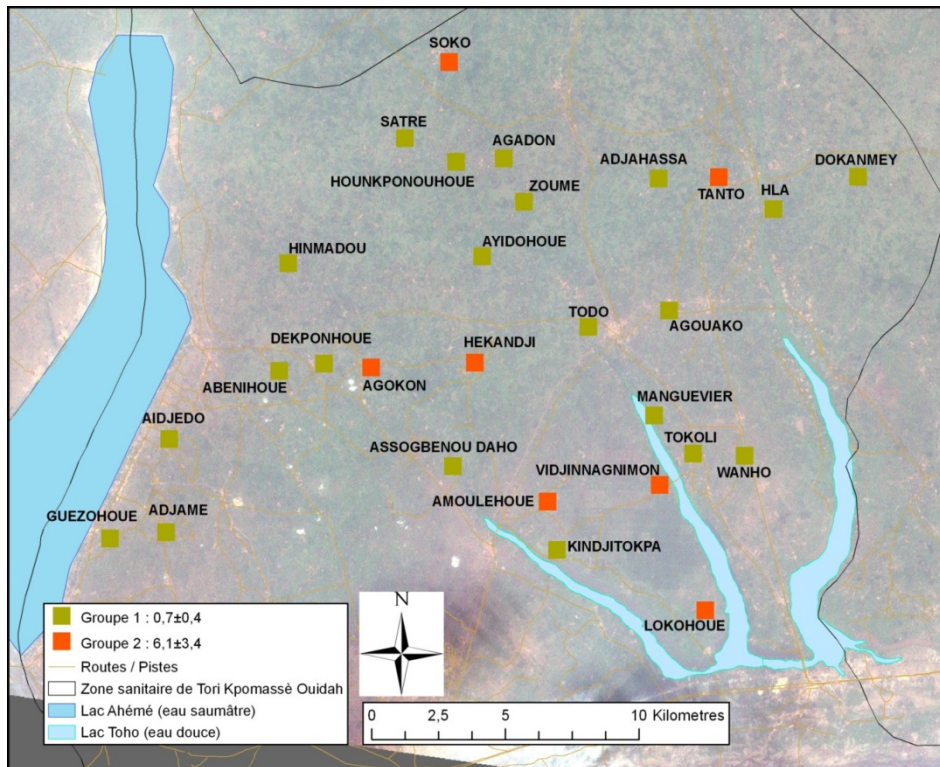


**Figure 3-5 :** Nombre de moustiques capturés par par enquête d’octobre 2007 à mai 2008

### 1.3.2. Infection à l’antigène Circum Sporozoite Protein (CSP) et taux d’inoculation entomologique (TIE)

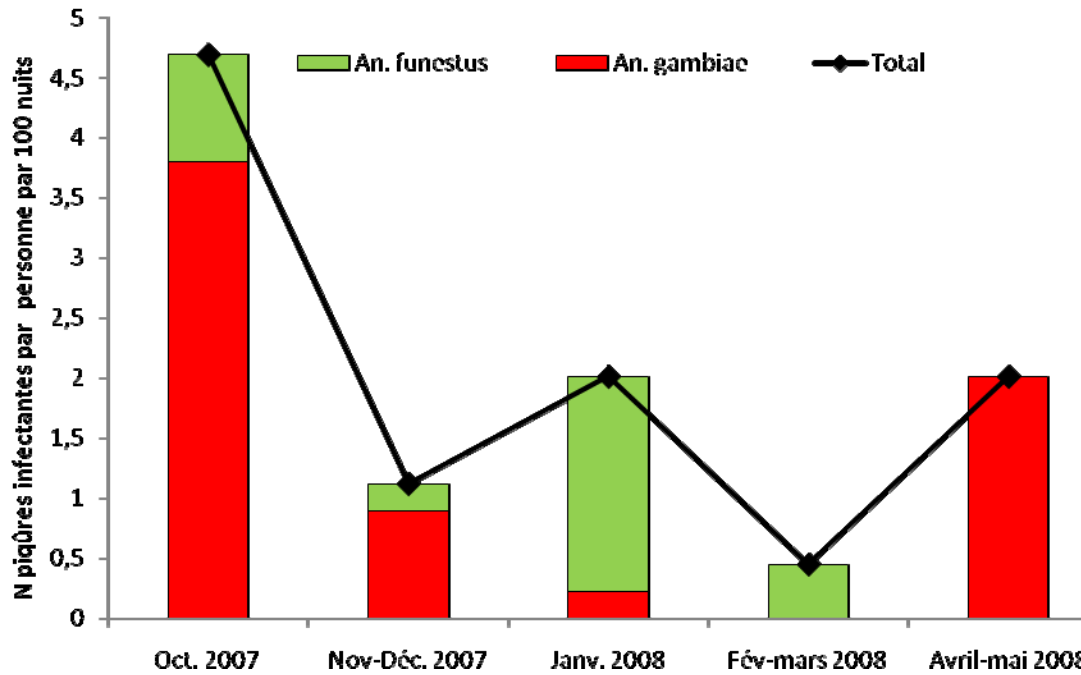
Au total 890 moustiques vecteurs du paludisme dont 322 *An. gambiae* et 568 *An. funestus* ont été testés pour la recherche de l’antigène CSP par ELISA. Parmi ces moustiques, 31 *An. gambiae* et 15 *An. funestus* ont été positifs. Le taux de femelles infectantes a été de  $9,63 \pm 3,2\%$  chez *An. gambiae* et de  $2,64 \pm 1,3\%$  chez *An. funestus* d’octobre 2007 à mai 2008.

Le Taux d’Inoculation Entomologique (nombre de piqûres infectantes de vecteur par personne et par unité de temps) pour cette période sur l’ensemble des villages a été de  $2,05 \pm 1,28$  piqûres infectantes/personne/100 nuits. Mais ce taux, variable selon les villages, montre 2 groupes homogènes de villages différents d’un facteur d’environ 10 avec  $0,7 \pm 0,4$  et  $6,1 \pm 3,4$  piqûres infectantes/personne/100 nuits (Figure 3-6).



**Figure 3-6** : Nombre moyen de piqûres infectantes par personne par 100 nuits par village et par enquête d’octobre 2007 à mai 2008

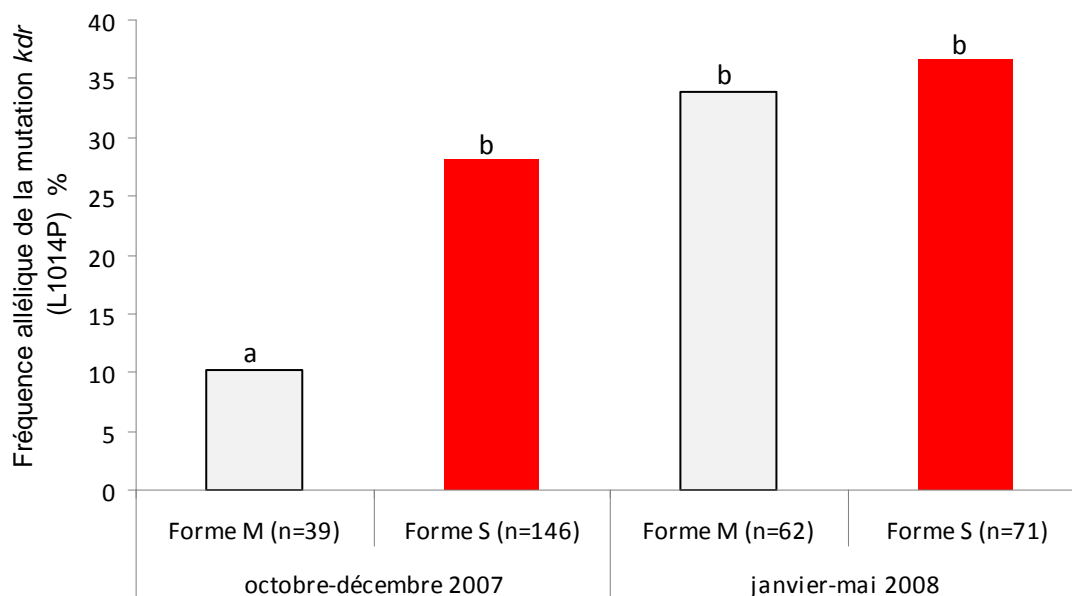
Les variations du TIE en fonction des enquêtes sont présentées par la figure 3-7. Le TIE a été plus élevé en octobre (4,69 piqûres infectantes par personne par 100 nuits) où la transmission a été assurée en grande partie par *An. gambiae*. En revanche, ce taux a été relativement plus faible en février-mars (0,45 piqûres infectantes par personne par 100 nuits) et la transmission au cours de cette période a été exclusivement assurée par *An. funestus*.



**Figure 3-7** : Nombre de piqûres infectantes par personne par 100 nuits par village et par enquête d'octobre 2007 à mai 2008

### 1.3.3. Les gènes de résistance

317 vecteurs ont été analysés pour la détermination de leur génotype pour les mutations *kdr* L1014F et *ace I<sup>R</sup>*. Tous ces moustiques ont été *An. gambiae s.s.* (217 de la forme moléculaire S et 101 de la forme moléculaire M). La fréquence allélique moyenne de la mutation *kdr* a été de 28,9% au cours de la période d'octobre 2007 à mai 2008 chez *An. gambiae*. Au début de l'étude (octobre à décembre 2007) la fréquence allélique de la mutation *kdr* a été significativement plus élevée chez la forme moléculaire S de *An. gambiae s.s.* (28,1%) que chez la forme M (10,3%) (P=0,001). Cette fréquence a significativement augmenté (P<0,001) chez M de janvier à mai 2008 et a atteint 33,9% (Figure 3-8).



Les fréquences alléliques portant les mêmes lettres ne diffèrent pas significativement ( $P > 0,05$ )

**Figure 3-8:** Fréquence allélique de la mutation *kdr* dans les formes moléculaires M et S de *An. gambiae* s.s. d'octobre 2007 à mai 2008 dans la zone d'étude

Quant à la mutation *ace I<sup>R</sup>*, sa fréquence a été très faible (<1%). Seulement 2 individus hétérozygotes de forme moléculaire S (*An. gambiae* s.s.) ont été capturés à Hèkandji au cours du mois d'octobre 2007.

#### 1.3.4. Incidence palustre, densité parasitaire moyenne des infections, et prévalence de l'infection

De décembre 2007 à avril 2008, 27250 homme\*jours d'observation ont été effectués dans les 28 villages. La densité d'incidence clinique du paludisme a été en moyenne de 9 [6 – 14] accès palustres pour 100 enfants-mois. Cette incidence a été très variable en fonction des villages (tableau 3-2). Elle va de 0 [0 – 12] accès palustre pour 100 enfants-mois dans les villages d'Agouako, Dékponhoue, Guézohoué à 23 [9 – 48] accès palustres pour 100 enfants-mois dans le village de Tokoli.

**Tableau 3-2** : Nombre moyen d'accès palustres par 100 enfants – mois en fonction des villages, de décembre 2007 à avril 2008

Villages	N homme*jours d'observation	N cas de maladies	N cas de paludisme confirmés*	Incidence**	IC 95%
Abenihoué	935	159	2	6	[1-23]
Adjahassa	950	160	5	16	[5-37]
Adjame	917	158	4	13	[4-34]
Agadon	1007	172	4	12	[3-31]
Agokon	1015	172	3	9	[2-26]
Agouako	1042	175	0	0	[0-11]
Aidjèdo	1075	183	3	8	[2-24]
Amoulehoue	1045	177	3	9	[2-25]
Assogbénoudaho	882	155	1	3	[0-19]
Ayidohoué	1003	170	3	9	[2-26]
Dekponhoué	930	161	0	0	[0-12]
Dokanmè	1046	176	4	11	[3-29]
Guezohoué	1053	176	0	0	[0-11]
Hekandji	1023	175	2	6	[1-21]
Hinmadou	999	168	1	3	[0-17]
Hla	971	170	2	6	[1-22]
Houkponouhoué	1027	172	3	9	[2-26]
Kindjitokpa	982	166	4	12	[3-31]
Lokohoué	837	141	3	11	[2-31]
Manguevié	930	162	1	3	[0-18]
Satre	924	156	3	10	[2-28]
Soko	1022	173	4	12	[3-30]
Tanto	834	145	4	14	[4-37]
Todo	940	161	2	6	[1-23]
Tokoli	905	155	7	23	[9-48]
Tokoli Vidjin.	1016	178	7	21	[8-43]
Wanho	970	162	6	19	[7-40]
Zoumè	970	167	1	3	[0-17]

\*densité parasitaire  $\geq 2000$  de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$

\*\* N cas/100 enfants\*mois

La densité parasitaire moyenne quant à elle a été en moyenne de 532 [448 – 631] formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$  de sang. Elle a été également très variable selon les villages. Elle a varié de 215 [151 – 307] formes asexuées par  $\mu\text{L}$  de sang dans le village de Lokohoué à 1227 [894 – 1686] formes asexuées par  $\mu\text{L}$  de sang à Tokoli (tableau 3-3).

**Tableau 3-3 :** Nombre de formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$  de sang en fonction des villages, de décembre 2007 à avril 2008

Villages	N observations	N positifs	Densité parasitaire moyenne*	95%CI
Abenihoué	149	6	320	[140-729]
Adjahassa	144	29	343	[206-572]
Adjame	142	22	379	[276-520]
Agadon	161	84	511	[431-607]
Agokon	154	34	891	[713-1112]
Agouako	166	47	339	[283-406]
Aidjèdo	169	32	341	[239-486]
Amoulehoue	162	62	410	[297-566]
Assogbéoudaho	146	37	605	[404-906]
Ayidohoué	160	51	320	[199-515]
Dekponhoué	145	14	221	[131-373]
Dokanmè	166	35	818	[507-1321]
Guezohoué	169	14	302	[205-445]
Hekandji	159	45	439	[332-582]
Hinmadou	160	30	352	[283-438]
Hla	145	51	643	[488-848]
Hounkponouhoué	163	95	705	[555-895]
Kindjitokpa	158	48	487	[394-601]
Lokohoué	127	23	215	[151-307]
Manguevié	146	48	476	[381-595]
Satre	142	59	534	[452-632]
Soko	159	85	745	[584-952]
Tanto	131	73	1008	[838-1214]
Todo	146	44	339	[269-426]
Tokoli	141	51	1227	[894-1686]
Tokoli Vidjin.	157	81	956	[786-1164]
Wanho	147	59	403	[302-537]
Zoumè	157	55	351	[262-471]

\* formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$  de sang

En ce qui concerne la prévalence de l'infestation, elle a été en moyenne de 30,8% [26,2% – 35,4%], et a aussi présenté une grande variation en fonction des villages (tableau 3-4).

La prévalence de l'infection a varié de 4,0% [2,5% - 5,6%] dans le village d'Abénihoué à 58,3% [51,7% - 64,9%] à Hounkponouhoué.

**Tableau 3-4 :** Prévalence de l'infestation palustre en fonction des villages, de décembre 2007 à avril 2008

Villages	N observations	N positifs	Prévalence (%)	95%CI
Abenihoué	149	6	4,0	[2,5-5,6]
Adjahassa	144	29	20,1	[15,6-24,7]
Adjame	142	22	15,5	[12,5-18,5]
Agadon	161	84	52,2	[48,6-55,8]
Agokon	154	34	22,1	[18,1-26,0]
Agouako	166	47	28,3	[24,3-32,4]
Aidjèdo	169	32	18,9	[13,1-24,7]
Amoulehoue	162	62	38,3	[31,9-44,6]
Assogbéoudaho	146	37	25,3	[20,1-30,6]
Ayidohoué	160	51	31,9	[24,6-39,1]
Dekponhoué	145	14	9,7	[6,4-12,9]
Dokanmè	166	35	21,1	[15,0-27,2]
Guezohoué	169	14	8,3	[4,8-11,7]
Hekandji	159	45	28,3	[22,8-33,8]
Hinmadou	160	30	18,8	[15,7-21,8]
Hla	145	51	35,2	[29,9-40,4]
Houkponouhoué	163	95	58,3	[51,7-64,9]
Kindjitokpa	158	48	30,4	[26,1-34,6]
Lokohoué	127	23	18,1	[15,2-21,0]
Manguevié	146	48	32,9	[27,7-38,1]
Satre	142	59	41,5	[35,8-47,3]
Soko	159	85	53,5	[47,2-59,8]
Tanto	131	73	55,7	[49,7-61,8]
Todo	146	44	30,1	[25,3-35,0]
Tokoli	141	51	36,2	[29,8-42,5]
Tokoli Vidjin.	157	81	51,6	[46,7-56,5]
Wanho	147	59	40,1	[34,3-46,0]
Zoumè	157	55	35,0	[29,2-40,9]



## **2. Évaluation communautaire de stratégies de lutte anti vectorielle contre le paludisme combinant deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations**

### **2.1. Stratégies de lutte anti vectorielle mises en place**

Quatre différentes interventions (bras de traitement) de lutte anti vectorielle ont été mises en place dans les 28 villages sélectionnés pour l'étude.

1. Dans le premier bras de traitement, des Moustiquaires Imprégnées d'insecticide à Longue Durée d'action (MILD) de type PermaNet2® ont été distribuées à tous les couchages où dorment des enfants âgés de 0 à 5 ans selon les recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Nous avons considéré ce bras comme témoin et dans la suite, il sera appelé bras « PNLP ».
2. Dans le deuxième bras, que nous avons dénommé bras « MILD », des MILD ont été distribuées à tous les couchages.
3. Dans le troisième bras, la face intérieure des murs, des portes et des fenêtres des cases habitées a été traitée avec du bendiocarb à la dose de 400 mg/m<sup>2</sup>. Ce bras a été dénommé bras « PID ». Dans ce bras, des MILD de type PermaNet2® ont été également distribuées à tous les couchages où dorment des enfants âgés de 0 à 5 ans.
4. Enfin, dans le quatrième bras, des MILD ont été distribuées à tous les couchages et nous avons en plus mis en place à l'intérieur de toutes les cases habitées des bâches plastiques murales imprégnées de bendiocarb (BI) à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup>. Ces bâches ont été placées à environ 1/3 supérieur des murs. Nous avons appelé ce bras « MILD+BI ».

### **2.2. Constitution des bras de traitement**

Après 8 mois de recueil des données avant traitement, 4 critères ont été retenus pour le regroupement des villages en 7 lots homogènes. Ces critères ont été:

- 1- l'incidence d'accès palustres ;
- 2- la densité en *Anopheles gambiae* ;
- 3- la densité en *Anopheles funestus* ;
- 4- la taille du village.

Les villages ont été classés en utilisant chacun de ces critères. Les rangs des villages pour chaque critère ont été pondérés avec un coefficient qui est proportionnel à l'importance du critère. Ainsi, le rang selon le critère incidence d'accès palustres a été affecté du coefficient 5,

celui selon la densité de *Anopheles gambiae* a été affecté du coefficient 2, le rang selon la densité de *Anopheles funestus* a été affecté du coefficient 1 et le rang selon la taille du village a été affecté du coefficient 0,5. La valeur de ces coefficients a été attribuée en considérant que l'incidence palustre, indicateur principal d'efficacité devait être supérieur aux indicateurs entomologiques. Pour les indicateurs entomologiques, la valeur du coefficient attribué à *An. gambiae* a été 2 fois celle de *An. funestus* dans la mesure où c'est *An. gambiae* qui est l'espèce la plus résistante et donc la principale cible de ces stratégies de gestion de la résistance. La taille du village critère démographique secondaire s'est vu attribué le plus faible des coefficients.

Après pondération de ces critères, le rang de chaque village a été déterminé et ils ont été regroupés en 7 lots homogènes de 4 villages. Dans chaque lot, les 4 traitements ont été attribués par tirage au sort aux 4 villages.

### **2.3. Mise en place et suivi des interventions de lutte antivectorielle**

#### **2.3.1. Distribution des Moustiquaires Imprégnées d'insecticide à Longue Durée d'action (MILD)**

Pour préparer la distribution des MILD, un recensement approfondi a été organisé dans les 28 villages (voir fiche de recensement en annexe). Ce recensement nous a permis d'attribuer un code (numéro de la concession dans le village suivi du numéro de la case dans la concession) à chaque case et de dénombrer par case, le nombre total de couchages et le nombre de couchages où dorment des enfants de moins de 5 ans. Ces résultats nous ont permis d'estimer par village le nombre de MILD nécessaires.

Pour la distribution proprement dite, une équipe de 2 personnes aidées par un relais communautaire a travaillé dans chaque village. Cette distribution a démarré par une séance de sensibilisation organisée par l'équipe. Au cours de cette séance, il a été rappelé aux populations les instructions pour une bonne utilisation des MILD.



**Photo 3-1** : Séance de sensibilisation sur l'utilisation des MILD

A la fin de la séance de sensibilisation, les villageois ont été invités à retourner chacun dans son habitation pour attendre l'équipe de distribution. Un membre de l'équipe aidé par le relais communautaire circule alors dans le village avec les fiches de recensement et remet à chaque bénéficiaire de moustiquaire un papier cacheté sur lequel ont été marqués le code du village, le code de la case et le numéro de la moustiquaire dans le village. Le bénéficiaire va ensuite vers l'autre membre de l'équipe installé à un endroit dans le village et remet ce papier. Les informations inscrites sur le papier sont alors transcrites sur la moustiquaire et cette dernière est remise au bénéficiaire. Dans les villages du bras PNLP les moustiquaires ont été remises en échange de celles qui avaient été distribuées par le Programme National de Lutte contre le Paludisme afin de garantir la comparabilité des MILD dans tous les villages.

### **2.3.2. Pulvérisation intra domiciliaire**

Le traitement des cases dans le bras PID a été fait avec un pulvérisateur haute pression HUDSON XPERT conçu pour être utilisé par des professionnels de la lutte contre les insectes nuisibles. Fait en acier inoxydable et en laiton, le pulvérisateur HUDSON XPERT a été développé spécifiquement pour l'application résiduelle intradomiciliaire contre les moustiques vecteurs. Ce pulvérisateur a un réservoir en acier inoxydable permettant de pulvériser à une pression constante de 4,2 bars. Le réservoir d'une capacité de 11.4 litres dispose d'une large ouverture de remplissage avec une fermeture de type came et un joint en Viton TM permettant d'empêcher toute fuite (Photo 3-2). La formulation de bendiocarb que

nous avons utilisée est une poudre mouillable à 80% de matière active emballée dans des sachets de 125 g (FICAM®). Un sachet de formulation a été mélangé à 10 litres d'eau et a servi à traiter environ 250 m<sup>2</sup> de mur afin de parvenir à un dépôt de 400 mg de matière active par m<sup>2</sup>. Les pulvérisations intradomiciliaires ont été faites du 12 au 17 juillet 2008 (1<sup>er</sup> round) et ont été refaites du 14 au 20 Avril 2009 (2<sup>ème</sup> round).

Avant chaque traitement des cases, les habitants ont été invités à ranger leurs effets et à sortir tous leurs aliments et leurs ustensiles de cuisines.



**Photo 3-2** : Pulvérisateur utilisé sur le terrain

### **2.3.3. Imprégnation et installation des bâches dans les habitations**

Les bâches que nous avons imprégnées ont été fabriquées par Filtisac S.A (Abidjan Côte d'Ivoire). Elles sont faites de polypropylène tissé et laminé d'un côté. Le côté laminé a été marqué depuis l'usine par l'insigne « CREC/REFS » afin d'être distingué clairement du côté non laminé (photo 3-3). Ces bâches ont été confectionnées en morceaux de 2,5 m \* 0,80 m (soit 2 m<sup>2</sup>).



**Photo 3-3** : Photo d'un morceau de bâche montrant la face laminée et marquée

La capacité de rétention ( $Cr$ ) de la bâche a été d'abord déterminée. Pour déterminer cette capacité de rétention, nous avons trempé le rouleau dans l'eau jusqu'à saturation et nous l'avons passé sur 2 morceaux de bâche de  $2 \text{ m}^2$  chacun pour les imprégner d'eau. Nous avons ensuite trempé ce rouleau mouillé dans  $500 \text{ ml}$  ( $V1$ ) d'eau pour le saturer à nouveau en eau afin d'imprégner 2 autres morceaux de bâche de  $2 \text{ m}^2$  chacun. Après l'imprégnation, le volume d'eau restant ( $V2$ ) a été mesuré puis nous avons calculé la différence  $V1-V2$  correspondant au volume d'eau retenue par les 2 morceaux de bâche. Cette opération a été reprise 3 fois et nous avons déterminé la valeur moyenne de la capacité de rétention de la bâche. Le volume d'eau moyen nécessaire pour imprégner 2 morceaux de  $2 \text{ m}^2$  a été de  $128 \text{ ml}$ , soit une capacité de rétention ( $Cr$ ) moyenne de  $128/4 = 32 \text{ ml/m}^2$ .

Les bâches ont été imprégnées de benbiocarb à  $200 \text{ mg/m}^2$  sur la face non laminée et avec une résine fixatrice (pure) à  $2,4 \text{ ml/m}^2$ . La composition de cette résine est gardée secrète par le fabricant. Le bendiocarb et la résine nous ont été fournis par Bayer Environmental Science (BES).

L'imprégnation des bâches a été faite avec des rouleaux à peinture par des agents imprégnateurs recrutés et formés à cet effet. Après imprégnation, les morceaux de bâches ont été séchés puis pliés face imprégnée contre face imprégnée. Ces morceaux imprégnés ont été remis en lots de 100 et ont été emballés à nouveau dans des toiles fournies par le fabricant.

Les bâches imprégnées et emballées ont été transportées dans les villages. Dans chaque village, 10 à 20 personnes en fonction de la taille du village ont été sélectionnées puis formées. Après la formation, l'équipe du CREC envoyée dans le village installe elle-même les

bâches dans les premières cases et répond aux préoccupations des agents locaux sélectionnés. Pour la suite de l'installation des bâches, 1 ou 2 membres de l'équipe restent sur place pour la supervision. Les bâches imprégnées ont été fixées sur les murs en terre battue avec des pointes galvanisées et sur les murs en béton avec des attaches que les électriciens bâtiment utilisent pour fixer les fils électriques sur les murs.



**Photo 3-4 :** Bâches imprégnées de bendiocarb installées dans une case avec une MILD

Les bâches ont été imprégnées au cours de la période du 15 au 25 juin 2008. Après cette imprégnation initiale, elles ont été ré-imprégnées environ tous les 4 mois aux dates suivantes :

1<sup>ère</sup> ré-imprégnation : 6 au 13 novembre 2008

2<sup>ème</sup> ré-imprégnation : 2 au 14 mars 2009

3<sup>ème</sup> ré-imprégnation : 23 juillet au 02 août 2009

4<sup>ème</sup> ré-imprégnation : 12 au 24 octobre 2009

#### **2.3.4. Suivi de l'activité résiduelle du bendiocarb sur les différents supports imprégnés**

Après la mise en place des traitements, un suivi régulier a été fait pour vérifier l'efficacité résiduelle des surfaces traitées. Cinq différents supports ont été testés. Il s'agit de :

- Mur en terre de barre
- Mur en sable rouge mélangé avec du ciment
- Mur en sable blanc mélangé avec du ciment
- Porte en bois
- Bâches

Des tests en cône standard OMS ont été effectués tous les mois sur ces supports avec une souche sensible de *An. gambiae* « Kisumu » et une population sauvage locale récoltée à l'état larvaire à Cotonou et élevée en laboratoire.

### **2.3.5. Suivi des MILD**

Le suivi des MILD a permis de déterminer la qualité de leur mise en place et de leur utilisation. Ce suivi a été accompagné d'une sensibilisation à chaque passage de l'équipe.

La stratégie d'échantillonnage a été basée sur la technique LQAS (Lot Quality Assurance Sampling). La fraction d'échantillonnage est supérieure ou égale à 10% environ pour chaque bras. Ainsi, dans chaque bras, 10% à 40% des habitations dans lesquelles une MILD a été attribuée à un couchage ont été tirés au sort. Les données relatives à la présence des MILD dans l'habitation, leur mise en place, leur utilisation, leur état et leur lavage ont été collectées. La collecte des données a été faite à l'aide d'un questionnaire pré-testé par un contrôleur indépendant (voir annexe).

La couverture, l'utilisation, l'état et le taux de lavage des MILD ont été les indicateurs mesurés.

La couverture correspond à la mise en place effective des MILD, vérifiée lors du contrôle. C'est la proportion de MILD présentes dans les habitations qui ont été effectivement mises en place. Elle est considérée comme satisfaisante lorsqu'elle est > 80 %.

L'utilisation correspond à l'usage quotidien des interventions. Elle est la proportion des habitants possédant une MILD pour leur couchage et qui ont dormi effectivement dessous la veille de l'enquête. Une utilisation > 70 % a été considérée comme bonne.

L'état d'entretien permet de savoir si les MILD sont toujours en bon état ou abîmées et aussi de savoir si elles ont été lavées.

Si l'utilisation est mauvaise, une sensibilisation est organisée à la fin du contrôle de qualité. Pour une utilisation < 50 %, l'ensemble du village a été re-sensibilisé et pour une utilisation comprise entre 50 % et 70 % seules les habitations concernées ont été re-sensibilisées.

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

### **2.4.1. Collecte des moustiques**

La collecte des moustiques par des volontaires humains s'est poursuivie après la mise en place des interventions. En plus de cette méthode d'échantillonnage, et afin d'étudier le comportement des moustiques en réponse aux outils de lutte antivectorielle mis en place dans la zone d'étude, nous avons capturé les moustiques par des fenêtres pièges et par la récolte de la faune résiduelle matinale à l'intérieur des habitations. Les pièges ont été placés au niveau des fenêtres de pièces dans lesquelles un seul adulte dort. Dans les bras MILD et MILD+BI, ces cases contenaient une MILD. Les cases du bras MILD+BI contenaient des BI en plus des MILD. Les cases du bras PID ont été traitées par une pulvérisation intradomiciliaire et ne contenaient pas de MILD. Dans le bras PNLP, les cases choisies ne contenaient pas de MILD. Les moustiques ont été collectés dans 864 case\*nuits (216 case\*nuits par bras de traitement) de juillet 2008 à juillet 2009.

Les fenêtres pièges de sortie utilisées sont constituées d'un tulle de térylène monté sur un cadre en fer de forme cubique, de 30 cm d'arête. L'entrée est dessinée dans un cône tronqué de trou de 2,5 cm de diamètre et dont le sommet est à 2,5 cm de la face opposée du piège. Sur chaque fenêtre est placé un contre plaqué de 1m de côté qui porte en son centre une ouverture de 30 cm de côté.

Les pièges ont été placés sur les fenêtres des cases vers l'extérieur (photo 3-4) pendant 3 jours consécutifs, toutes les 6 semaines, de 18 h à 6 h le lendemain. Les moustiques piégés ont été ensuite récupérés à l'aide d'un aspirateur. Après la collecte des moustiques des fenêtres pièges, la faune résiduelle a été récoltée dans les mêmes cases aux environs de 7 heures, à l'aide des bombes aérosols (à base de pyréthriinoïdes) et d'un drap blanc.





**Photo 3-5** : Captures des moustiques par les fenêtres pièges

#### **2.4.2. Identification et traitement des moustiques**

Les moustiques ont été identifiés à la loupe et à l'aide de clés de détermination de la même façon qu'avant la mise en place des interventions. Ceux identifiés comme *An. gambiae* ou *An. funestus* ont été disséqués en vue de la détermination de leur âge physiologique (Detinova 1945). L'état physiologique (gorgés ou non) des moustiques de la faune résiduelle et ceux capturés par pièges a été déterminé. Les moustiques *An. gambiae s.l.* et *An. funestus s.l.* ont été conservés sur silicagel à -20°C et ont subi au laboratoire les mêmes tests qu'avant intervention.

#### **2.5. Collecte des données parasitologiques et cliniques**

Après la mise en place des interventions de lutte antivectorielle, la collecte des données parasitologiques et cliniques sur le paludisme s'est poursuivie dans tous les villages (bras de traitements) selon le même protocole qu'avant intervention.

## 2.6. Analyse des résultats

Les proportions de moustiques morts au cours des bio-essais pour les différentes configurations ont été analysées par une régression logistique avec le logiciel d'analyse statistique XLSTAT (Addinsoft, XLSTAT 2009) (Addinsoft, 2009).

La capture des moustiques par les fenêtres pièges et la récolte de la faune résiduelle matinale ont permis d'estimer la densité totale de moustiques qui pénètrent dans les cases et la proportion qui en ressort. Ces données ont été utilisées pour calculer l'exophilie des moustiques (proportion de moustiques capturés dans les fenêtres pièges par rapport au nombre total de moustiques capturés) dans chaque bras de traitement. Le taux de gorgement a été également déterminé. Les données proportionnelles (pourcentage de moustiques gorgés, et de moustiques capturés dans les fenêtres pièges) ont été analysées par régression logistique (e.g. XL-STAT 2009 Software) (Addinsoft, 2009).

Les fréquences alléliques de la mutation *kdr* chez les moustiques qui se reposent à l'intérieur des cases et ceux capturés dans les fenêtres pièges ont été comparées en fonction des traitements à l'aide du logiciel Genepop (Raymond and Rousset, 1995). De même les fréquences alléliques de cette mutation chez les moustiques gorgés et ceux à jeun ont été comparées en fonction des traitements avec le même logiciel. L'association du gorgement ou de l'exophilie des moustiques avec les formes moléculaires M et S de *An. gambiae s.s* a été évaluée par le calcul des rapports de cote (Odds Ratio) (Bernard and Lapointe, 1995). Les proportions de moustiques capturés dans les fenêtres pièges celle des moustiques ayant pris leurs repas de sang au sein de chaque forme moléculaire ont été comparées à l'aide d'un test exact de Fischer avec le logiciel Graph Pad Prism5.

La proportion de femelles pares (femelles ayant pondu au moins une fois) en fonction des traitements a été analysée par régression logistique. Le nombre total d'anophèles vecteurs capturés dans les différents bras de traitement ont été testés par un test de rang de Kruskal Wallis. Les taux d'agressivité et d'inoculation entomologique ont été estimés avec leur intervalle de confiance à 95% sous l'hypothèse d'une distribution binomiale négative de ces 2 variables. Ces taux ont été ensuite comparés entre interventions en utilisant une approche d'équation d'estimation généralisée (GEE) avec ajustement d'un modèle de régression binomiale négative qui prend en compte l'interdépendance des observations faites dans un même village. Les rapports des taux d'incidence (Incidence Rate Ratio (IRR)) de ces indicateurs pour chaque intervention ont été ensuite estimés avec leur intervalle de confiance.

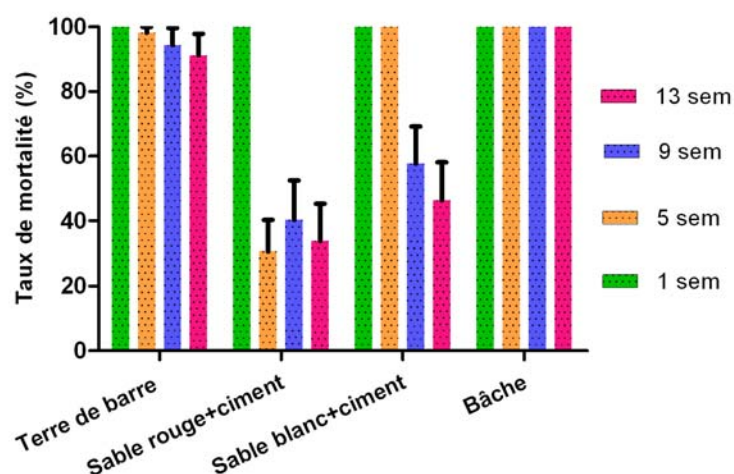
Le génotype pour la mutation *kdr* des moustiques *An. gambiae* a été déterminé avant la mise en place des traitements puis 6, 12 et 18 mois après. La fréquence avant la mise en place des traitements et celle après 18 mois de traitement ont été comparées pour les différentes interventions par un test exact de Fischer avec le logiciel Genepop (Raymond and Rousset, 1995).

L'impact parasitologique et clinique des interventions de lutte antivectorielle a été évalué en termes de densité d'incidence clinique du paludisme à *P. falciparum*, de densité parasitaire moyenne des infections, et de prévalence de l'infestation. Ces paramètres ont été calculés et leurs intervalles de confiance à 95% ont été estimés. La densité d'incidence palustre, le taux de prévalence de l'infestation et la transformation logarithmique de densité parasitaire moyenne des infections ont été analysés par des modèles de régression linéaire et logistique en considérant une distribution binomiale négative des observations et en prenant en compte les deux niveaux d'échantillonnage (villages et individus).

## 2.7. Résultats

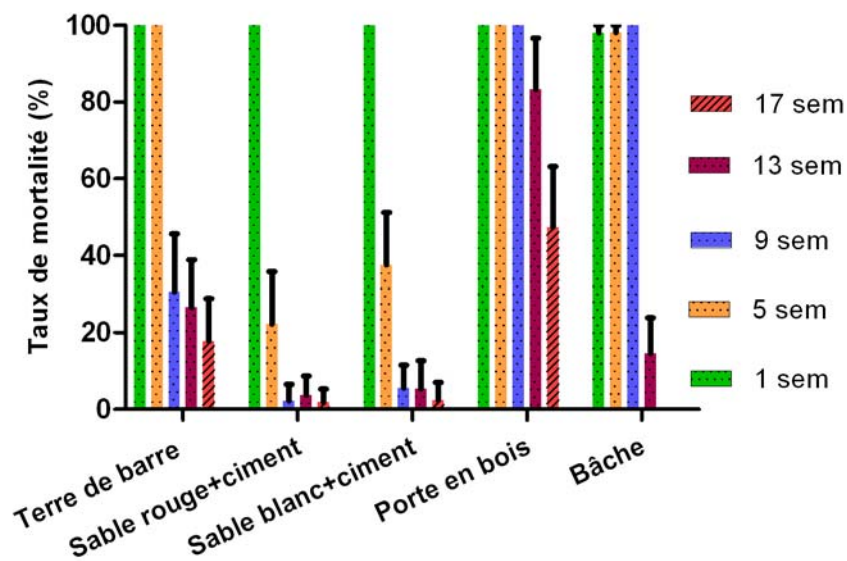
### 2.7.1. Activité résiduelle du bendiocarb sur différents supports

Nous avons réalisé au total 88 bio-essais (dont 48 sur les murs, 10 sur les portes en bois et 30 sur les bâches) avec environ 3439 femelles de *An. gambiae* dont 2478 Kisumu et 961 sauvages. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 3-9 à 3-11.



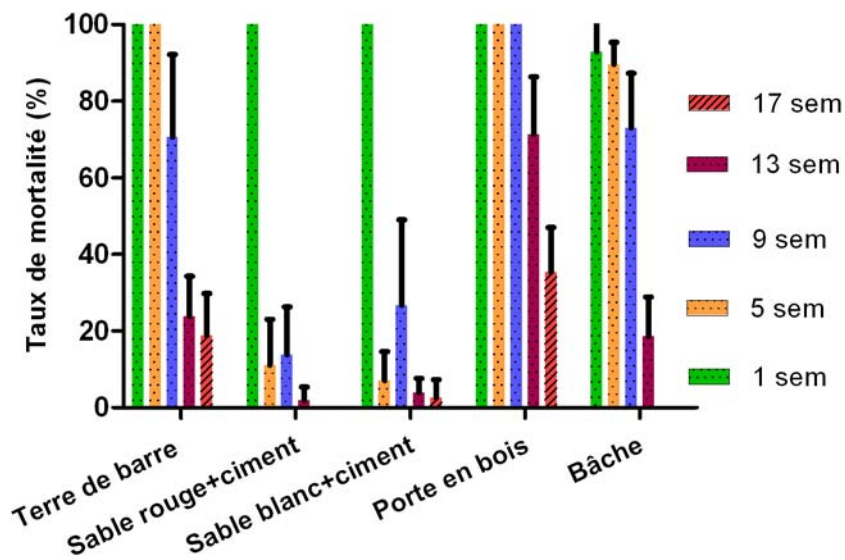
**Figure 3-9** : Mortalité en % de la souche Kisumu de *Anopheles gambiae* exposée aux murs traités par pulvérisation (bendiocarb, 400 mg/m<sup>2</sup>) ou aux bâches imprégnées (bendiocarb, 200 mg/m<sup>2</sup>) après le 1<sup>er</sup> tour de traitement sur le terrain

Une semaine après la première imprégnation, tous les supports ont entraîné une mortalité de 100% de *An. gambiae* Kisumu. Sur les murs en terre de barre, cette mortalité a légèrement baissé à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine mais est restée très élevée (90%) jusqu'à la 13<sup>ème</sup> semaine. Sur les murs en sable rouge+ciment, on observe une forte chute de la mortalité autour de 30% de la 5<sup>ème</sup> à la 13<sup>ème</sup> semaine. Pour les murs en sable blanc+ciment, cette chute ne s'est produite qu'à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine et a été légèrement moins marquée (40-50%). Pour les bâches imprégnées de bendiocarb, la mortalité a été de 100% jusqu'à la 13<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3-10** : Mortalité en % de la souche Kisumu d'*Anopheles gambiae* exposée aux murs et portes traités par pulvérisation (bendiocarb, 400 mg/m<sup>2</sup>) ou aux bâches imprégnées (bendiocarb, 200 mg/m<sup>2</sup>) après le 2<sup>ème</sup> tour de traitement sur le terrain

A la réimprégnation, la mortalité de *An. gambiae* Kisumu a été de 100% sur tous les supports après une semaine. Mais la baisse d'efficacité a été plus marquée et plus rapide qu'après la 1<sup>ère</sup> imprégnation. Sur les murs en terre de barre, cette mortalité a chuté à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine et a été inférieure à 20% à la 17<sup>ème</sup> semaine. Sur les murs en sable rouge+ciment ou en sable blanc+ciment, elle a chuté dès la 5<sup>ème</sup> semaine (< 40%), et a été inférieure à 10% à la 17<sup>ème</sup> semaine. Sur les portes en bois la rémanence a été plus longue puisque la mortalité a légèrement baissé à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine et a été de 47,5% à la 17<sup>ème</sup> semaine. Pour les bâches imprégnées, elle est restée à 100% jusqu'à la 9<sup>ème</sup> semaine et a chuté à moins de 20% à la 13<sup>ème</sup> semaine.



**Figure 3-11:** Mortalité en % d'une population sauvage de *Anopheles gambiae* exposée aux murs et portes traités par pulvérisation (bendiocarb, 400 mg/m<sup>2</sup>) ou aux bâches imprégnées (bendiocarb, 200 mg/m<sup>2</sup>) après le 2<sup>ème</sup> tour de traitement sur le terrain

Sur les murs et les portes traités, la mortalité des *An. gambiae* sauvages a été de 100%, une semaine après l'imprégnation, mais seulement de 93% pour les bâches. Sur les murs et les portes, l'efficacité et la rémanence du bendiocarb semblent avoir été similaires pour les anophèles sauvages et la souche Kisumu. Sur les murs en terre de barre, cette mortalité a chuté à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine (~70%) et a été inférieure à 20% à la 17<sup>ème</sup> semaine. Sur les murs en sable rouge+ciment ou en sable blanc+ciment, elle a chuté dès la 5<sup>ème</sup> semaine (< 20%), et a été pratiquement nulle à la 17<sup>ème</sup> semaine. Sur les portes en bois, la mortalité a baissé à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine (~70%) et a été de 35 % à la 17<sup>ème</sup> semaine. Pour les bâches imprégnées, elle a légèrement baissé à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine et a chuté à moins de 20% à la 17<sup>ème</sup> semaine.

Aussi bien au 1<sup>er</sup> qu'au 2<sup>ème</sup> « round » de traitement, l'efficacité résiduelle du bendiocarb contre les anophèles sauvages et la souche Kisumu a été significativement différente selon les supports imprégnés (P<0,01). Elle a été significativement plus élevée avec la porte en bois et la bâche imprégnées.

### **2.7.2. Taux de couverture et taux d'utilisation des MILD**

Au total 3828 habitations dans lesquelles au moins une MILD a été attribuée ont été visitées au cours de 5 enquêtes. Environ 3000 personnes (ayant un couchage auquel une MILD a été attribuée) ont été prises en compte à chaque enquête. Les résultats du suivi des MILD sont consignés dans le tableau 3-5.

Le taux de couverture en MILD a été en moyenne de 75%. Ce taux a été proche du seuil de 80% fixé dans l'étude. En revanche, le taux d'utilisation des MILD a été faible. Il a été en moyenne de 46 % (contre 70 % attendu). Ce taux a varié dans le temps. Dans la période de septembre à décembre 2008, il a été de 73% à 78% selon les bras. Mais à partir de décembre 2008, une chute drastique de ce taux a été observée (12% à 54% selon les bras). De façon générale, le taux d'utilisation des MILD diminue au cours de la saison sèche et a tendance à s'améliorer après les campagnes de sensibilisation de masse. Plus de 90% des MILD distribuées ont été retrouvées dans les habitations où elles ont été données et près de 90% des MILD retrouvées étaient en bon état. En moyenne 78% des moustiquaires ont été lavées au moins une fois depuis leur distribution.

**Tableau 3-5** : Taux de couverture, taux d'utilisation et état des moustiquaires en fonction des bras et des enquêtes de septembre 2008 à décembre

2009

Périodes	Bras de traitement	N habitations visitées	Couverture				Utilisation			Etat		Lavage	
			N MILD distribuées	N MILD possédées	N MILD placées	Taux±IC95 (%) <sup>1</sup>	N dormeurs	N dormeurs sous MILD	Taux±IC95 (%) <sup>2</sup>	N bon état	Taux±IC95 (%) <sup>3</sup>	N lavées	Taux±IC95 (%) <sup>4</sup>
septembre-décembre 2008*	PNLP	240	275	275	223	81±5	385	293	76±4	264	96±2		
	MILD	234	441	441	350	79±4	897	655	73±3	432	98±1		
	PID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	MILD+BI	239	453	452	357	79±4	988	771	78±3	447	99±1		
décembre 2008-mars 2009	PNLP	240	337	311	177	57±6	1152	173	15±2	279	90±3		
	MILD	234	434	391	270	69±5	931	205	22±3	372	95±2		
	PID	235	287	245	137	56±6	997	120	12±2	240	98±2		
	MILD+BI	239	469	444	355	80±4	976	527	54±3	430	97±2		
avril-juillet 2009*	PNLP	234	315	293	220	75±5	1062	531	50±3	220	75±5	255	87±4
	MILD	235	430	399	319	80±4	876	596	68±3	323	81±4	307	77±4
	PID	239	296	284	213	75±5	971	466	48±3	236	83±4	190	67±5
	MILD+BI	242	414	401	329	82±4	948	578	61±3	317	79±4	249	62±5
août-octobre 2009*	PNLP	218	302	264	203	77±5	1044	376	36±3	198	75±5	243	92±3
	MILD	234	433	408	318	78±4	919	505	55±3	330	81±4	330	81±4
	PID	234	305	269	207	77±5	999	380	38±3	234	87±4	183	68±6
	MILD+BI	239	416	381	293	77±4	892	437	49±3	301	79±4	274	72±5
octobre-décembre 2009	PNLP	68	92	86	62	72±9	327	98	30±5	68	79±9	81	94±5
	MILD	57	108	98	78	80±8	241	104	43±6	79	81±8	81	83±7
	PID	61	80	71	54	76±10	278	70	25±5	59	83±8	54	76±10
	MILD+BI	106	194	181	127	70±7	447	179	40±5	147	81±6	143	79±6
<b>Total</b>		<b>3828</b>	<b>6081</b>	<b>5694</b>	<b>4292</b>	<b>75±1</b>	<b>15330</b>	<b>7064</b>	<b>46±1</b>	<b>4976</b>	<b>87±1</b>	<b>2390</b>	<b>76±1</b>

<sup>1</sup>(N MILD placées/ N MILD possédées)\* 100 ; <sup>2</sup>(N dormeurs sous MILD/ N dormeurs)\*100

<sup>3</sup>(N MILD en bon état/ N MILD possédées) \*100 ; <sup>4</sup> (N MILD/lavées N MILD possédées)\*100

\*Enquêtes précédées de sensibilisation de masse.

### 2.7.3. Comportement des vecteurs du paludisme en réponse aux moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (deltaméthrine) en combinaison avec du bendiocarb en aspersion intra domiciliaire ou en imprégnation de bâches murales

Au total 2186 moustiques dont 446 *An. funestus* et 474 *An. gambiae* ont été collectés de juillet 2008 à juillet 2009. Les résultats en termes de taux d'expulsion et de taux de gorgement sont présentés dans les tableaux 3-6 à 3-13.

#### 2.7.3.1. Exophilie

**Tableau 3-6** : Exophilie de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement

Bras de traitement	Total capturé	Nombre capturé dans les fenêtres pièges	Exophilie (%) ± IC95
PNLP	124	35	28,23 ± 7,92 <sup>a</sup>
MILD	184	60	32,61 ± 6,77 <sup>a</sup>
PID	105	35	33,33 ± 9,02 <sup>a</sup>
MILD+BI	61	34	55,74 ± 12,46 <sup>b</sup>

Dans une même colonne, les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes, P>0,05

L'exophilie a été de 28% chez *An. gambiae* dans le bras PNLP (tableau 3-6). Dans les bras MILD et PID, l'exophilie a été de 33% et n'a pas été significativement différente de celle observée dans le bras PNLP (P=0,41 P=0,40). Par contre, dans le bras MILD+BI, l'exophilie de *An. gambiae* (55,7%) a été significativement plus élevée (P=0,002) que celle observée dans les autres bras.



**Tableau 3-7** : Exophilie de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement et de la fréquence allélique de la mutation *kdr*

Bras de traitement		RR	RS	SS	Fréquence	P
PNLP	Capturés dans les fenêtres pièges	20	9	5	72,06	0,05
	Au repos à l'intérieur	67	14	7	84,09	
MILD	Capturés dans les fenêtres pièges	31	9	18	61,21	<0,001
	Au repos à l'intérieur	80	32	9	79,34	
PID	Capturés dans les fenêtres pièges	25	5	8	72,37	0,406
	Au repos à l'intérieur	48	13	9	77,86	
MILD+BI	Capturés dans les fenêtres pièges	20	11	10	62,20	0,206
	Au repos à l'intérieur	19	6	5	73,33	

La fréquence allélique de la mutation *kdr* au sein des moustiques capturés dans les fenêtres pièges et ceux au repos dans les cases en fonction des traitements est présentée dans le tableau 3-7. Dans les bras PNLP, PID et MILD+BI, la fréquence au sein des moustiques capturés dans les fenêtres pièges et celle au sein des moustiques se reposant dans les cases n'ont pas été significativement différentes ( $P=0,05$  ;  $P=0,406$  et  $P=0,206$ ). Par contre, dans le bras MILD, cette fréquence a été significativement plus forte chez les moustiques qui se reposent à l'intérieur des habitations que chez ceux capturés dans les fenêtres pièges ( $P<0,001$ ).

**Tableau 3-8**: Exophilie des formes moléculaires M et S de *An. gambiae s.s.* en fonction des bras de traitement

Bras de traitements		M	S	Rapport de cote (IC95%)	P
PNLP	Capturés dans les fenêtres pièges	27	5	0,54 (0,16-1,79)	0,32
	Au repos à l'intérieur	80	8		
MILD	Capturés dans les fenêtres pièges	52	2	0	-
	Au repos à l'intérieur	120	0		
PID	Capturés dans les fenêtres pièges	20	14	1,07 (0,47-2,46)	0,87
	Au repos à l'intérieur	40	30		
MILD+BI	Capturés dans les fenêtres pièges	19	15	0,67 (0,23-1,92)	0,59
	Au repos à l'intérieur	17	9		

Quel que soit le traitement, la proportion de moustiques capturés dans les fenêtres pièges ne diffère pas significativement selon les formes moléculaires M et S de *An. gambiae s.s.* ( $P>0,09$ ) (tableau 3-8).

**Tableau 3-9** : Exophilie de *An. funestus* en fonction des bras de traitement

Bras de traitement	Total capturé	Nombre capturé dans les fenêtres pièges	Taux d'expulsion (%) ± IC95
PNLP	124	40	32,26 ±8,22 <sup>a</sup>
MILD	283	191	67,49±5,45 <sup>b</sup>
PID	21	8	38,10±20,77 <sup>a</sup>
MILD+BI	18	13	72,22±20,69 <sup>b</sup>

Dans une même colonne, les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes,  $P>0,05$

L'exophilie de *An. funestus* a été de 32,26% dans le bras PNLP (tableau 3-9). Elle a été significativement plus élevée dans les bras MILD (67,49%,  $P<0,001$ ) et MILD+BI (72,22%,  $P=0,04$ ) comparés au bras PNLP. En revanche, dans le bras PID, l'exophilie de *An. funestus* (38,10%) n'a pas été significativement différente de celui observé dans le bras PNLP ( $P=0,71$ ).

### 2.7.3.2. Taux de gorgement

Le taux de gorgement de *An. gambiae* a été respectivement de 79,94%, 76,09%, 74,29% et 67,21% dans les bras de traitement « PNLP », « MILD », « PID », et «MILD+BI » (tableau 3-10). Aucune différence significative n'a été observée quel que soit le traitement ( $P>0,067$ ).

**Tableau 3-10** : Taux de gorgement de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement

Bras de traitement	Total capturé	Nombre de gorgés	Taux de gorgement
PNLP	124	99	79,84±7,06 <sup>a</sup>
MILD	184	140	76,09±6,16 <sup>a</sup>
PID	105	78	74,29±8,35 <sup>a</sup>
MILD+BI	61	41	67,21±11,78 <sup>a</sup>

Dans une même colonne, les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes,  $P>0,05$

La fréquence allélique de la mutation *kdr* chez les moustiques ayant pris leur repas de sang ne diffère pas significativement de celle des moustiques non gorgés quel que soit le bras de traitement ( $P>0,07$ ) (tableau 3-11)

**Tableau 3-11** : Taux de gorgement de *An. gambiae* en fonction des bras de traitement et de la fréquence allélique de la mutation *kdr*

Traitements	Etat	RR	RS	SS	Fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i>	Valeur de P
PNLP	Gorgés	70	17	11	80,1	0,69
	Non gorgés	17	6	1	83,3	
MILD	Gorgés	85	35	15	75,9	0,07
	Non gorgés	26	6	12	65,9	
PID	Gorgés	56	10	12	78,2	0,21
	Non gorgés	17	8	5	70,0	
MILD+BI	Gorgés	22	9	9	66,3	0,72
	Non gorgés	19	8	6	69,7	

Quel que soit le traitement, le taux de gorgement ne diffère pas significativement selon la forme moléculaire (M ou S) de *An. gambiae s.s.* ( $P>0,13$ ) (tableau 3-12).

**Tableau 3-12**: Taux de gorgement des formes moléculaires M et S de *An. gambiae s.s.* en fonction des bras de traitement

Traitements	Etat	M	S	Rapport de cote (IC95%)	Valeur de P
PNLP	Gorgés	87	11	0,71 (0,14-3,48)	1
	Non gorgés	22	2		
MILD	Gorgés	131	1	3,19 (0,19-52,26)	0,42
	Non gorgés	41	1		
PID	Gorgés	45	32	1,83 (0,78-4,31)	0,19
	Non gorgés	13	17		
MILD+BI	Gorgés	29	11	2,32 (0,87-6,21)	0,13
	Non gorgés	17	15		

Le taux de gorgement a été de 80,65% chez *An. funestus* dans le bras « PNLP » (tableau 3-10). Il a été significativement plus faible dans les bras MILD (53%,  $P<0,001$ ) ; PID (52,38%,  $P=0,005$ ) et MILD+BI (38,89%,  $P<0,001$ ).

**Tableau 3-13:** Taux de gorgement de *An. funestus* en fonction des bras de traitement

Bras de traitement	Total capturé	Nombre gorgés	Taux de gorgement
PNLP	124	100	80,65±6,95 <sup>a</sup>
MILD	283	150	53,00±5,81 <sup>b</sup>
PID	21	11	52,38±21,36 <sup>b</sup>
MILD+BI	18	7	38,89±22,52 <sup>b</sup>

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes,  $P\geq 0,05$

#### 2.7.4. Impacts de la combinaison deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur l'âge physiologique des vecteurs, l'agressivité des vecteurs et le TIE

Au total 2644 anophèles vecteurs ont été disséqués en vue de la détermination de leur âge physiologique. La proportion de moustiques femelles ayant pondu au moins une fois (femelles pares) a été élevée en général quel que soit le traitement et aucune différence significative n'a été observée entre les traitements pour ce paramètre ( $P>0,06$ ). Cette proportion a été respectivement de 82,6% ; 82,3% ; 84% et de 89,4% dans les bras de traitement PNLP ; MILD ; PID et BI. (tableau 3-14).

**Tableau 3-14 :** Proportion de vecteurs pares en fonction des traitements

Bras de traitement	N disséqués	N pares	Taux de parturité
PNLP	741	612	82,6±2,73 <sup>a</sup>
MILD	840	691	82,3±2,58 <sup>a</sup>
PID	582	489	84,0±2,97 <sup>a</sup>
MILD+BI	481	430	89,4±2,75 <sup>a</sup>

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes,  $P\geq 0,05$

Le tableau 3-15 montre le nombre d'anophèles vecteurs (*An. gambiae* et *An. funestus*) capturés à chaque enquête dans chaque bras. Le nombre d'anophèles vecteurs capturés à chaque enquête dans chaque bras ne diffère pas significativement selon les interventions ( $p=0,92$ ).

**Tableau 3-15** : Nombre d'anophèles vecteurs (*An. gambiae* et *An. funestus*) capturés par 16 personnes\*nuit à chaque enquête de janvier à décembre 2009

Traitements	Périodes								Total
	Jan. 2009	Mar-Av. 2009	Avr-Mai 2009	Jui-Juil 2009	Aou 2009	Sept-Oct 2009	Oct-Nov 2009	Déc. 2009	
<b>PNLP</b>	65	26	137	267	100	104	72	42	1038
<b>MILD</b>	168	109	386	294	85	16	38	42	1693
<b>PID</b>	86	24	56	240	100	36	12	5	805
<b>MILD+BI</b>	7	6	84	328	23	11	22	14	794

Les taux d'agressivité des vecteurs et d'inoculation entomologique estimés avec leur intervalle de confiance à 95% sont présentés dans le tableau 3-16, de même que les rapports des taux d'incidence (Incidence Rate Ratio (IRR)) de ces indicateurs pour chaque traitement. Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements pour ces indicateurs. Le taux d'agressivité varie de 55 piqûres /Homme/100 nuits dans le bras MILD+BI à 127 piqûres/Homme/100 nuits dans le bras MILD. Quant au taux d'inoculation entomologique, il a varié de 1,6 piqûres infectantes/Homme/100 nuits dans le bras MILD+BI à 4,2 piqûres infectantes/Homme/100 nuits dans le bras MILD. Le taux d'agressivité a été réduit de 31% (P=0,22) et de 39% (P=0,10) respectivement dans les bras PID et MILD+BI par rapport au témoin. En ce qui concerne la transmission, elle a été réduite dans les bras PID et MILD+BI respectivement de 22% (P=0,59) et 39% (P=0,30) par rapport au bras témoin.

**Tableau 3-16** : Taux d'agressivité et taux d'inoculation entomologique par traitement

	Nombre personne*nuits de capture	Moyenne/ personne/100 nuits	95% IC		Moyenne annuelle	IRR	95%IC	Valeur de P
<b>Taux d'agressivité des vecteurs</b>								
<b>PNLP</b>	896	<b>91</b>	60	138	<b>332</b>	<b>1</b>		
<b>MILD</b>	896	<b>127</b>	84	192	<b>464</b>	<b>1,4</b>	[0,78-2,52]	0,264
<b>PID</b>	896	<b>62</b>	41	95	<b>226</b>	<b>0,69</b>	[0,38-1,25]	0,219
<b>MILD+BI</b>	896	<b>55</b>	36	85	<b>201</b>	<b>0,61</b>	[0,33-1,11]	0,104
<b>Taux d'inoculation entomologique</b>								
<b>PNLP</b>	896	<b>2,6</b>	1,4	4,7	<b>9,5</b>	<b>1</b>		
<b>MILD</b>	896	<b>4,2</b>	2,5	7,1	<b>15,3</b>	<b>1,65</b>	[0,75-3,64]	0,212
<b>PID</b>	896	<b>2</b>	1	3,9	<b>7,3</b>	<b>0,78</b>	[0,32-1,91]	0,59
<b>MILD+BI</b>	896	<b>1,6</b>	0,8	3,2	<b>5,8</b>	<b>0,61</b>	[0,24-1,56]	0,302

### 2.7.5. Impact de la combinaison de deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur l'évolution de la fréquence allélique de la mutation *kdr*

Avant la mise en place des interventions, la fréquence allélique de la mutation *kdr* a été en moyenne de 29 % dans la zone d'étude. Elle a été respectivement de 28%, 27%, 22%, 33% dans les bras de traitement PNLP, MILD, PID et MILD+BI (tableau 3-16). Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements pour cette fréquence ( $P>0,095$ ).

**Tableau 3-17:** Fréquence allélique de la mutation *kdr* chez *An. gambiae* en fonction des villages (traitement) avant la mise en place des interventions

Traitements	RR	RS	SS	Fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i> (%)
<b>PNLP</b>	<b>11</b>	<b>16</b>	<b>40</b>	<b>28</b>
<b>MILD</b>	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>22</b>
<b>PID</b>	<b>9</b>	<b>29</b>	<b>50</b>	<b>27</b>
<b>MILD+BI</b>	<b>16</b>	<b>46</b>	<b>58</b>	<b>33</b>
<b>Total général</b>	<b>38</b>	<b>105</b>	<b>173</b>	<b>29</b>

La fréquence allélique de la mutation *kdr* a significativement augmenté quel que soit le traitement 18 mois après la mise en place des interventions ( $P<0,01$ ). Dans le bras PNLP, elle est passée de 28% à 86%, dans le bras MILD, de 22% à 91%, de 27% à 86% dans le bras PID et de 33% à 74% dans le bras MILD+BI (tableau 3-17). Cette fréquence a été significativement plus élevée ( $P<0,01$ ) dans les bras PNLP, MILD, PID comparativement au bras MILD+BI.

**Tableau 3-18 :** Fréquence allélique de la mutation *kdr* chez *An. gambiae* en fonction des traitements 6, 12 et 18 mois après la mise en place des interventions

Traitements	6 mois après traitement				12 mois après traitement				18 mois après traitement			
	RR	RS	SS	Fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i> (%)	RR	RS	SS	Fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i> (%)	RR	RS	SS	Fréquence allélique de la mutation <i>kdr</i> (%)
<b>PNLP</b>	23	34	12	58	32	21	28	52	53	6	6	86
<b>MILD</b>	20	32	25	47	99	26	117	46	28	4	1	91
<b>PID</b>	25	22	11	62	36	33	6	70	40	4	5	86
<b>MILD+BI</b>	26	38	24	51	28	15	18	58	27	2	9	74
<b>Total général</b>	94	126	72	54	195	95	169	53	148	16	21	84

### 2.7.6. Impact de la combinaison de deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations sur l'incidence palustre, la densité parasitaire moyenne des infections, et la prévalence de l'infestation

Au total 96 188 homme\*jours d'observations ont été effectués et 15 197 gouttes épaisses ont été réalisées après la mise en place des interventions. Les résultats en termes d'incidence palustre, de densité parasitaire moyenne des infections, et de prévalence de l'infestation par bras avant et après la mise en place des interventions sont présentés dans les tableaux 3-19 ; 3-20 ; et 3-21.

La densité moyenne d'incidence clinique ajustée sur l'âge a été comparable dans les 4 bras avant la mise en place des interventions, variant entre 8,4 accès palustres par 100 enfants-mois dans le bras PID et 9,3 accès palustres par 100 enfants-mois dans les bras PNLP et MILD ( $P>0,74$ ). Après intervention, cette densité a été également comparable dans les 4 bras ( $P>0,22$ ). Elle a été respectivement de 5,0 ; 4,8 ; 6,6 et 5,4 accès palustres par 100 enfants-mois dans les bras PNLP ; MILD ; PID et MILD+BI (tableau 3-19).

**Tableau 3-19** : Nombre moyen d'accès palustres par 100 enfants – mois en fonction des bras avant et après intervention

Bras de traitement	N homme*jours d'observation	N cas maladies	N cas paludisme confirmé*	Incidence	IC 95%		IRR	95%CI	Valeur de P
<b>Avant intervention</b>									
PNLP	7073	1194	22	9,3	5,8	14,1	1		0,99
MILD	6792	1158	21	9,3	5,7	14,2	0,99	[0,55-1,80]	0,99
PID	6787	1160	19	8,4	5,1	13,1	0,90	[0,49-1,66]	0,74
MILD + BI	6598	1133	20	9,1	5,6	14,0	0,98	[0,53-1,78]	0,94
<b>Après intervention</b>									
PNLP	25652	4352	43	5,0	3,6	6,8	1		0,49
MILD	23538	3998	38	4,8	3,4	6,6	0,96	[0,61-1,51]	0,85
PID	23192	3947	51	6,6	4,9	8,7	1,31	[0,85-1,99]	0,22
MILD + BI	23806	4077	43	5,4	3,9	7,3	1,08	[0,69-1,67]	0,74

\*Densité parasitaire >2000 parasites/ $\mu$ L

En ce qui concerne la densité parasitaire moyenne, elle n'était pas différente selon les bras avant la mise en place des interventions ( $P>0,17$ ). Cette densité variait entre 470 trophozoïtes *Plasmodium falciparum*/ $\mu$ L dans le bras PNLP et 576 trophozoïtes *Plasmodium falciparum*/ $\mu$ L dans le bras PID. Après intervention, elle est demeurée comparable entre les

bras ( $P>0,28$ ), variant de 647 trophozoïtes *Plasmodium falciparum*/ $\mu\text{L}$  dans le bras MILD à 707 trophozoïtes *Plasmodium falciparum*/ $\mu\text{L}$  dans le bras PNLP (tableau 3-20).

**Tableau 3-20:** Nombre de formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par  $\mu\text{L}$  de sang en fonction des interventions

Bras de traitement	N observations	N positifs au <i>P. falciparum</i>	Densité parasitaire moyenne	IC 95%	P
<b>Avant intervention</b>					
PNLP	1110	292	470	[411-538]	
MILD	1060	319	527	[439-632]	0,49
PID	1071	399	576	[482-688]	0,17
MILD + BI	1030	304	554	[461-667]	0,35
<b>Après intervention</b>					
PNLP	4033	788	707	[634-788]	
MILD	3714	744	647	[600-696]	0,27
PID	3649	935	685	[631-743]	0,68
MILD + BI	3801	630	680	[624-740]	0,74

Quant à la prévalence moyenne de l'infestation, avant la mise en place des interventions, elle n'a pas été significativement différente selon les bras PNLP (26,3%) ; MILD (30,1%) et MILD+BI (29,5%), ( $p>0,14$ ). Cette prévalence a été significativement plus élevée dans le bras PID (37%) comparé au bras témoin PNLP ( $\text{OR}=1,62$  ;  $p<0,01$ ) (tableau 3-21). Après intervention, aucune différence significative n'a également été observée entre les bras PNLP, MILD et MILD+BI ( $P>0,08$ ). La prévalence moyenne de l'infestation a été respectivement de 16,6% ; 19,5% ; et 20% dans les bras MILD+BI, PNLP, et MILD. Dans le bras PID, elle a été trouvée significativement plus élevée (25,6%) par rapport au bras PNLP ( $\text{OR}=1,40$  ;  $p<0,01$ ).

**Tableau 3-21 :** Prévalence de l'infestation palustre en fonction des interventions

Bras de traitement	N observations	N positifs au <i>P. falciparum</i>	Prévalence (%)	IC 95%	OR	IC 95%	Valeur de P
<b>Avant intervention</b>							
PNLP	1110	292	26,3	22,4 30,2	1		
MILD	1060	319	30,1	24,8 35,3	1,20	0,94 1,54	0,14
PID	1071	399	37,3	32,2 42,3	1,62	1,27 2,05	<0,01
MILD + BI	1030	304	29,5	25,2 33,8	1,17	0,91 1,50	0,22
<b>Après intervention</b>							
PNLP	4033	788	19,5	16,6 22,5	1		
MILD	3714	744	20,0	16,0 24,0	0,98	0,80 1,20	0,82
PID	3649	935	25,6	21,0 30,2	1,40	1,16 1,70	<0,01
MILD + BI	3801	630	16,6	13,7 19,5	0,83	0,68 1,02	0,08



### 3. Discussion et conclusion

#### 3.1. Discussion

Les études à l'échelle communautaire ont permis d'une part de fournir des données entomologiques de base sur la zone d'étude, et d'autre part d'évaluer l'impact des différentes stratégies de lutte antivectorielle sur le comportement des vecteurs du paludisme, sur la transmission du paludisme, sur l'infection et la maladie palustre, et sur l'évolution de la fréquence allélique de la mutation *kdr*

Au total 28 différentes espèces ont été capturées dans la zone d'étude avant la mise en place des interventions, alors que Huttel (1950) et Hamon (1954) avaient respectivement collecté 13 espèces (capture d'adultes dans les habitations) et 45 espèces (échantillonnage d'adultes et de larves) dans le Sud-est du Bénin (Cotonou et Porto-Novo). La diversité des moustiques dans notre étude a été plus faible que celle de Hamon, mais nous avons identifié 3 espèces d'anophèles qui n'avaient pas été observées dans les études précédentes. Il s'agit de *An. brohieri*, *An. coustani* et *An. nili*. Ces 3 espèces étaient présentes à très faibles densités dans notre étude, ce qui explique probablement qu'elles n'aient pas été rapportées précédemment. Par ailleurs, les espèces les plus prédominantes capturées au cours de notre étude, *Mansonia africana* et *Culex quinquefasciatus*, n'avaient pas non plus été rapportées par Hamon. L'abondance relative de *Cx. quinquefasciatus*, plutôt adapté aux gîtes larvaires pollués des villes, dans les villages traditionnels du sud Bénin est particulièrement surprenante. Elle pourrait s'expliquer notamment par le stockage dans ces villages d'eau riche en matières organiques utilisée comme refroidisseur pour la production de Sodabi, alcool artisanal distillé du vin de palme.

Les résultats ont montré une forte hétérogénéité en termes de densité des moustiques (en l'occurrence les vecteurs du paludisme), et de transmission du paludisme. Cette hétérogénéité est en partie liée à des différences au niveau du sol de cette zone. Le nord est en effet caractérisé par un plateau fait d'une épaisse couche sablo-argileuse et le sud arrosé par plusieurs ramifications du Lac Toho présente plusieurs bas-fonds.

La densité de *An. funestus* a été plus forte dans les villages près des ramifications du Lac Toho (<2km), confirmant que ce moustique se reproduit dans les cours d'eau ombragé. Dans les villages de la partie nord, le sol, fait d'une épaisse couche sablo-argileuse, favorise une infiltration rapide de l'eau après la pluie, empêchant ainsi la formation des gîtes de *An. gambiae*. Par ailleurs, seulement 2 des 5 enquêtes réalisées avant la mise en place des

interventions ont été conduites en saisons des pluies (début de saisons des pluies). C'est probablement aussi pour ces raisons que la densité des vecteurs du paludisme a été faible au cours de l'évaluation avant intervention. Des études supplémentaires conduites sur une plus longue période et prenant en compte les facteurs environnementaux seraient utiles et permettraient de mieux comprendre les déterminants de la distribution de moustiques dans cette zone.

*Anopheles gambiae* et *An. funestus* ont été les principaux vecteurs du paludisme dans la zone d'étude, ce qui confirme des études antérieures en Afrique de l'ouest (Akogbéto, 1995, Louise *et al.*, 2009). Le taux d'inoculation entomologique de  $2,05 \pm 1,28$  piqûres infectantes par personne par 100 nuits indique que dans la zone d'étude, le paludisme est méso-endémique. Ces données sont corroborées par les données parasitologiques et cliniques collectées dans ces villages au cours de la même période qui indiquent une incidence clinique du paludisme à *Plasmodium falciparum* de 9 [6 – 14] accès palustres pour 100 enfants-mois et une prévalence de 30,8% [26,2% – 35,4%] chez les jeunes enfants asymptomatiques.

La mutation *kdr*, responsable de la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes a été identifiée dans les populations de *An. gambiae* examinées dans cette étude. D'octobre 2007 à mai 2008, la fréquence allélique de cette mutation a augmenté chez la forme moléculaire M de *An. gambiae s.s.* mais pas chez la forme S, indiquant qu'elles subissent probablement des pressions de sélection différentes. L'augmentation de la fréquence allélique de la mutation *kdr* dans les populations de *An. gambiae* est inquiétante étant donné que ce gène associé à des mécanismes métaboliques pourrait avoir un impact significatif sur l'efficacité des MILD, comme l'ont démontré de récentes études en cases expérimentales (WHO, 2007).

Concernant le gène de résistance *ace1<sup>R</sup>*, nous avons confirmé la faible fréquence allélique de cette mutation (<1%) chez *An. gambiae* au sud Bénin (Djogbenou *et al.*, 2008). La faible fréquence allélique de cette mutation suggère soit qu'elle n'a pas encore diffusée dans ces populations ou que la pression sélective exercée sur elle est faible ou inexistante. Il est à noter que le facteur temps est d'une grande importance dans le phénomène de résistance et qu'il est à cet effet nécessaire de surveiller régulièrement l'évolution de cette mutation, étant donné que les campagnes de masse de pulvérisation intradomiciliaire à base de bendiocarb mises en œuvre au Sud du Bénin à travers le programme PMI (President's Malaria Initiative) pourraient augmenter significativement les pressions de sélection.

L'activité résiduelle du bendiocarb a montré une variation en fonction des différents supports aussi bien à l'imprégnation initiale qu'à la réimprégnation. La rémanence a été plus longue sur le bois et les bâches imprégnées qu'avec les murs en terre ou en ciment. Cette variation

avait été observée lors d'une étude menée en Inde sur différents supports (argile, ciment et murs en brique) imprégnés de bendiocarb (Ansari M A and Razdan, 2004). Toutefois au Mozambique il a été observé une rémanence du bendiocarb similaire sur des murs en terre ou en ciment, mais probablement dans des conditions plus favorables puisque l'efficacité à 4 mois était encore de 90 à 100% (Maharaj *et al.*, 2004). La variation de la rémanence du bendiocarb que nous avons observée pourrait s'expliquer par des différences de porosité des surfaces traitées, qui absorberaient plus ou moins la solution insecticide, ou même du pH de ces supports auquel le bendiocarb est relativement sensible. Le ciment par exemple est un milieu très alcalin qui favorise l'hydrolyse de l'insecticide. Le bois a sûrement une plus faible capacité d'absorption que les murs secs et poreux. La forte rémanence du bendiocarb sur la bâche imprégnée de bendiocarb s'explique par sa texture plastique qui empêche l'absorption de la solution insecticide et qui par sa structure tissée qui retient une partie de l'insecticide entre ses mailles. Par ailleurs, il est possible qu'une interaction plus forte existe avec le polypropylène ayant tendance à mieux fixer le bendiocarb, comme c'est le cas pour de nombreux plastiques vis-à-vis des insecticides. Cette forte rémanence du bendiocarb sur le polypropylène tissé confirme nos résultats préliminaires qui ont montré qu'au bout de 10 lavages au savon, ce support imprégné a conservé son efficacité (Djènontin *et al.*, 2009).

L'efficacité du bendiocarb contre la souche sensible de *An gambiae* Kisumu n'a pas été significativement différente de celle observée avec la population sauvage. Cela s'explique par le fait que le bendiocarb agit sur l'acétylcholinestérase alors que la mutation résistante (*Ace I<sup>R</sup>*) est à une très faible fréquence (<1%) et qu'il n'existe pas de mécanisme métabolique de résistance aux carbamates au sein des populations sauvages ayant servi aux bioessais (Corbel *et al.*, 2007).

La couverture moyenne en MILD des populations cibles au cours de l'étude a été globalement bonne (75%) avoisinant les 80 % attendus. En 2001, avant les campagnes nationales de distribution des MILD, dans le Sud du Bénin, seulement 4,3% des maisons possédaient une moustiquaire imprégnée et 2,4% des enfants âgés de moins de 5 ans dormaient sous moustiquaires imprégnées (Kindé-Gazard *et al.*, 2004). L'augmentation significative du taux de couverture après les campagnes de distribution des MILD est tout à fait logique et a déjà été antérieurement constatée (Matovu *et al.*, 2009, Skarbinski *et al.*, 2007, Thwing *et al.*, 2008).

L'utilisation des MILD quant à elle a été faible aussi bien dans la population générale (46 % contre les 70 % attendus) que chez les enfants âgés de moins de 5 ans (54%). Elle diminue en saison sèche et a tendance à s'améliorer après les campagnes de sensibilisation de masse. En

effet les populations sont moins motivées pour utiliser les moustiquaires en absence de nuisance culicidienne, comme c'est le cas en saison sèche qui se conjugue aussi avec de fortes températures nocturnes où les personnes sont à la recherche de courant d'air. Cette même observation a été déjà faite dans diverses études en Afrique de l'ouest (Ahorlu *et al.*, 1997, Toe *et al.*, 2009). L'effet de la sensibilisation des populations sur l'utilisation des MILD est un aspect très important de la lutte contre le paludisme qui doit être pris en compte par les programmes nationaux de lutte. Cette activité doit nécessairement faire appel aux sciences sociales qui permettront de comprendre les raisons qui motivent les gens à utiliser régulièrement une méthode de lutte et/ou d'identifier les messages qui doivent être relayés pour une meilleure adhésion à celle-ci.

La présence d'une moustiquaire imprégnée dans la case de couchage dans les villages MILD n'a pas augmenté le taux de sortie de *An. gambiae* par rapport aux cases sans moustiquaire du bras PNLP, alors qu'il a été significativement augmenté pour *An. funestus*. Par contre, la combinaison des bâches murales imprégnées à la moustiquaire imprégnée a augmenté significativement ce taux par rapport aux cases du bras PNLP. Ces résultats montrent que l'effet excito-répulsif de la deltaméthrine sur *An. gambiae* a été réduit probablement du fait de la résistance de ce vecteur aux pyréthrinoïdes et que la combinaison du bendiocarb à la deltaméthrine améliore l'efficacité de la moustiquaire imprégnée de bendiocarb contre les moustiques résistants. C'est probablement cette réduction de l'effet excito-répulsif de la deltaméthrine sur *An. gambiae* résistants aux pyréthrinoïdes qui explique qu'une fréquence allélique de la mutation *kdr* plus élevée ait été observée chez les *An. gambiae* qui se reposent à l'intérieur des habitations. Ainsi les vecteurs qui devraient être repoussés vers l'extérieur en présence de moustiquaire imprégnée, restent à l'intérieur des cases pour se reposer compte tenu de leur résistance aux pyréthrinoïdes.

Le taux de gorgement de *An. gambiae* n'a pas été significativement différent aussi bien dans les cases du bras PNLP sans moustiquaire que dans les cases des autres bras. Ce qui est la conséquence probable de la résistance de ce vecteur aux pyréthrinoïdes. En outre, la PID ou les BI n'ont pas d'effet sur le taux de gorgement car ces outils de lutte antivectorielle ne constituent pas une barrière réduisant le contact Homme/vecteur.

Aucune réduction significative aussi bien du taux d'agressivité des vecteurs, de l'âge physiologique des vecteurs, de la transmission du paludisme, que de l'infection et de la maladie palustre n'a été observée par rapport au bras témoin PNLP quel que soit le traitement. Nos résultats ne permettent donc pas de mettre en évidence clairement le bénéfice d'utiliser des combinaisons de produits insecticides résiduels (dans les habitations) pour lutter contre

les vecteurs du paludisme résistants aux insecticides. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Le niveau de transmission dans la zone d'étude est très faible et a peut être atteint un seuil où toute intervention supplémentaire à l'intérieur des maisons n'a pas d'impact significatif sur la transmission. La faible nuisance culicidienne dans les villages n'est pas non plus un facteur de motivation pour que les populations s'approprient les outils de lutte antivectorielle mis à leur disposition, comme le montre d'ailleurs les faibles taux d'utilisation des MILD. En effet, dans un autre contexte épidémiologique (dans le département de l'Ouémé, au Sud-Est du Bénin), la combinaison de la PID aux MILD, a donné de bons résultats en termes de réduction de la transmission (Akogbéto, com pers), ce qui souligne la nécessité de reproduire l'essai dans un autre faciès.

La faible activité résiduelle du bendiocarb sur les murs limiterait également les effets de ce produit dans le temps alors que les résultats présentés ici sont un cumul sur une période de 18 mois. Les bâches imprégnées ont été disposées pour couvrir seulement le 1/3 supérieur des murs dans les cases afin d'éviter le contact des enfants avec l'insecticide. Cette couverture partielle a probablement été insuffisante puisque les moustiques peuvent se poser sur les 2/3 non traités des murs. Ceci demande des investigations ultérieures sur le comportement des vecteurs face aux BI. Il est aussi possible que des moustiques des villages voisins non traités, par migration, recolonisent les villages où nous avons effectué l'évaluation, atténuant l'effet de masse et l'impact des interventions de lutte antivectorielle mises en place. L'augmentation de la fréquence allélique de la mutation *kdr* dans tous les bras de traitement montre qu'une pression de sélection est exercée sur ce gène dans la zone d'étude et les déterminants de cette sélection restent à être élucidés. Cependant, dans le bras MILD+BI, cette augmentation a été relativement moindre, suggérant que l'utilisation de deux familles d'insecticides ayant des cibles différentes pourrait retarder la sélection de la mutation *kdr* par rapport aux autres villages.

### **3.2. Conclusion**

Les présents travaux n'ont pas permis de mettre en évidence clairement le bénéfice d'utiliser des combinaisons de produits insecticides résiduels à l'intérieur des habitations pour lutter contre les vecteurs du paludisme résistants aux insecticides, dans une zone où la transmission est faible. Il mériterait maintenant de confirmer ou d'infirmer les résultats de cette stratégie dans un autre faciès entomologique (transmission et résistance de vecteurs) et épidémiologique afin de démontrer l'intérêt de ces combinaisons à l'échelle opérationnelle.

De nombreux pays ont maintenant adopté la distribution massive de moustiquaires imprégnées dans leur programme national de lutte contre le paludisme. Fort de résultats encourageants obtenus dans plusieurs endroits en matière de réduction de la morbidité, certains d'entre eux ainsi que des agences internationales souhaiteraient aller plus loin dans la voie de l'élimination. La combinaison des moustiquaires imprégnées avec des programmes de pulvérisation intradomiciliaire ou de traitements larvicides sont des stratégies envisagées. Mais afin d'éviter la dispersion des efforts et un découragement des pouvoirs publics comme ce fut le cas après le peu de succès du programme d'éradication du paludisme, il est primordial de savoir quelles sont les combinaisons les plus efficaces et dans quel contexte il est possible de les utiliser.

Nos travaux ont montré que *An. funestus s.s.* est relativement plus abondant que *An. gambiae* dans notre zone d'étude. Avec un taux de positivité à la CSP assez important, ce vecteur peut être considéré comme un vecteur majeur du paludisme au sud du Bénin. Par ailleurs, les stratégies de lutte anti vectorielle mises en place ont été relativement plus efficaces contre ce vecteur probablement à cause de sa sensibilité aux insecticides et peut être de son comportement plus endophile. Toutefois des gènes de résistance existent chez cette espèce dans d'autres pays d'Afrique et ont même été incriminés dans des échecs opérationnels (Hargreaves *et al.*, 2000). La connaissance de la structuration génétique des populations de ce vecteur est un préalable indispensable pour estimer les flux de gènes, par exemple de résistance, entre elles. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier la structure génétique des populations de *An. funestus* et d'évaluer si un impact des différentes stratégies de lutte anti vectorielle pouvait être observé sur ces populations.

**Chapitre 4 : Impact des stratégies de lutte  
antivectorielle sur la structure génétique des  
populations de *Anopheles funestus* s.s. au  
Bénin**

Le moustique *Anopheles funestus* s.s. est l'un des cinq vecteurs majeurs du paludisme en Afrique où cette maladie est un problème majeur de santé publique (Mouchet *et al.*, 2004). *An. funestus* s.s. occupe une grande gamme de niches écologiques, est fortement anthropophile, et est susceptible aux parasites. La capacité vectorielle de ce vecteur peut parfois dépasser celui de *An. gambiae* dans certaines localités (Fontenille *et al.*, 1997, Gillies and De Meillon, 1968, Mbogo *et al.*, 1999). Les larves de *An. funestus* s.s. se développent dans les marais permanents ou semi-permanents ou dans des flaques d'eau permanentes, le long des cours d'eau, par opposition à celles du complexe *An. gambiae* qui préfèrent des habitats aquatiques temporaires (Gillies and De Meillon, 1968). De ce fait, *An. funestus* s.s. est moins dépendant des pluies et devient abondant pendant la saison sèche quand les densités de *An. gambiae* sont basses (Minakawa *et al.*, 2001). *An. funestus* s.s. est ainsi souvent considéré comme une espèce vectrice responsable de la transmission du paludisme pendant la saison sèche (Mbogo *et al.*, 2003).

*An. funestus* s.s. appartient à un groupe de plusieurs espèces presque identiques morphologiquement (Gillies and Coetzee, 1987, Gillies and De Meillon, 1968). Il s'agit de *An. funestus* Giles (ou *An. funestus* sensu stricto), *An. rivulorum* Leeson, *An. parensis* Gillies, *An. vaneedeni* Gillies et Coetzee, *An. lesoni* Evans, *An. fuscivenosus* Leeson, *An. aruni* Sobti, *An. brucei* Service, et *An. confusus* Evans et Leeson (Gillies and Coetzee, 1987). *An. funestus* s.s. et *An. rivulorum* sont les seules espèces dans le groupe *An. funestus* qui ont été incriminées comme vecteurs du paludisme en conditions naturelles (Gillies and De Meillon, 1968, Wilkes *et al.*, 1996).

En raison des difficultés liées au maintien en élevage de ce moustique, pendant longtemps, il n'a pas fait l'objet de la même attention que *An. gambiae*. Cependant, de récents travaux ont permis de maintenir en élevage deux souches de *An. funestus* et d'identifier plusieurs marqueurs microsatellites (Cohuet *et al.*, 2004, Hunt *et al.*, 2005). Ces travaux ont facilité des études plus détaillées de cette espèce. Les marqueurs microsatellites ont été utilisés pour étudier la structure génétique des populations de *An. funestus* s.s et leur flux de gènes (Cohuet *et al.*, 2005, Crampton *et al.*, 1992, Michel *et al.*, 2005, Wondji *et al.*, 2005). La bonne connaissance de la structure génétique des populations vectorielles permet de mieux comprendre la dynamique de la transmission et peut contribuer au développement de nouvelles stratégies de lutte antivectorielle et de gestion de la résistance aux insecticides.

Au Bénin, où *An. funestus* s.s. est fortement impliqué dans la transmission du paludisme (Djènontin *et al.*, 2010b), les données sur la génétique des populations de ce vecteur ne sont pas disponibles. Par ailleurs, les stratégies de lutte antivectorielle mises en place dans la zone



sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori, dans le cadre de la présente thèse, ont été relativement plus efficaces contre ce vecteur probablement à cause de son statut de sensibilité (Bustamante, com. pers.). L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact des différentes stratégies de lutte antivectorielle sur la variabilité génétique des populations et de rechercher s'il est possible de savoir si les populations présentes dans les villages traités étaient des populations locales qui ont échappé aux traitements ou si ce sont des populations venant des villages voisins non traités.

## **1. Généralités sur la génétique des populations**

### **1.1. Estimation de la structuration des populations**

La structuration des populations peut être étudiée à travers deux méthodes : les méthodes directes et les méthodes indirectes.

#### **1.1.1. Les méthodes directes**

Les méthodes directes sont basées sur les observations du déplacement des insectes. Ces méthodes directes ou observationnelles (capture-marquage-recapture) ont été utilisées traditionnellement dans le but de quantifier le flux de gènes entre populations ou pour étudier la dispersion (Service, 1993). Elles apportent de bonnes estimations directes de la dispersion, et elles peuvent donner des indications précises sur le comportement d'une espèce dans une population et dans un environnement hétérogène. En général, les méthodes directes correspondent à la mesure d'un trait de vie contemporain des individus, alors que les méthodes indirectes indiquent l'historique de la migration dans la structuration génétique de la population.

#### **1.1.2. Les méthodes indirectes basées sur la génétique des populations**

Les analyses de génétique des populations permettent de mieux évaluer l'importance des échanges génétiques que les méthodes directes. En effet il y a souvent une forte mortalité chez les individus marqués, et un ratio de re-capture faible dans la plupart des cas, ce qui peut sous-estimer l'intensité des flux de gènes. Les méthodes directes perdent de la précision sur des événements sporadiques ou sur des événements qui se produisent sur de grandes

distances. Par ailleurs, les méthodes de traçage ne prennent pas en compte les processus qui se passent après l'arrivée de l'individu dans son nouvel environnement, comme sa viabilité, la compatibilité sexuelle ou la compétition. Enfin, les méthodes directes vont concentrer les individus sur un seul point de départ, biaisant de fait les estimations de la dispersion.

Les méthodes indirectes peuvent être extrêmement efficaces pour une estimation historique de la connectivité génétique entre populations, ou pour évaluer la contribution du flux de gènes dans la structure génétique à travers un ensemble de populations. Il existe différents types d'approches utilisées pour estimer la différenciation entre les populations. Le chercheur américain Sewall Wright différencia trois niveaux de structuration de la population, sur lesquels il calcula des estimateurs basés sur les rapports de l'hétérozygotie totale attendue dans l'ensemble des populations ( $H_T$ ), la moyenne de l'hétérozygotie attendue à l'intérieur des populations ( $H_W$ ) et entre paires de populations ( $H_b$ ). Il assume pour ces calculs un modèle en îles, avec  $n$  populations de taille  $N$ , qui échangent des migrants à un taux  $m$ , en panmixie. Le premier niveau, c'est le  $F_{IS}$  « inbreeding coefficient », et il décrit la divergence entre l'hétérozygotie observée et attendue à l'intérieur des populations (From the Individual to the Subpopulation). Le deuxième niveau, l'index de fixation  $F_{ST}$  mesure la variation de l'hétérozygotie à l'intérieur des populations par rapport à la population totale (From the Subpopulation to the Total). Le troisième niveau, le  $F_{IT}$ , décrit la variation de l'hétérozygotie à l'intérieur des individus en rapport avec cette population, due à un accouplement non aléatoire à l'intérieur des sous-populations ( $F_{IS}$ ) et à la sous-division de la population globale ( $F_{ST}$ ). Lorsque  $F$  est significativement supérieur à zéro, il est relié au nombre de migrants efficaces ( $Nm$ ) échangés entre les sous populations à chaque génération par l'équation  $Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ .

## **1.2. Les marqueurs en génétique des populations**

Il existe de nombreux marqueurs utilisés en génétique des populations : Isoenzymes, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Microsatellites, séquences d'ADN mitochondrial et nucléaire, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).

Dans la présente étude, nous avons utilisé les microsatellites.

### 1.3. Les marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont les marqueurs les plus populaires et les plus puissants qui s'utilisent actuellement en génétique (Awise *et al.*, 2004). Il existe une énorme gamme de marqueurs microsatellites qui, grâce à l'avancée technologique de ces dernières années, peuvent être abordables d'un point de vue technique et économique. Cependant, il faut tenir compte des propriétés de chaque marqueur microsatellite pour minimiser les erreurs et éviter des suppositions statistiques dans le calcul de la variation génétique. Quel que soit le marqueur utilisé, une de ses caractéristiques essentielles pour être employé dans les études sur la génétique des populations est la neutralité. En effet, si les marqueurs sont soumis à une pression de sélection, les fréquences alléliques ne reflètent pas seulement le degré de différenciation parmi les populations. Ainsi, les marqueurs génétiques employés pour étudier la variation génétique entre populations doivent être neutres pour permettre une évaluation non biaisée du flux de gènes entre populations et distinguer les processus évolutifs (Nielsen, 2005).

Les marqueurs microsatellites sont composés de courtes séquences d'ADN non codant répétées (normalement di-, tri-, ou tétranucléotides) en tandem. Ils présentent un polymorphisme de longueur lié à la variation du nombre de copies répétées (allèles microsatellites). Les « short tandem repeat » ou « microsatellites » ont été découverts à la fin des années 1980 (Weber and May, 1989) et rapidement ils ont montré des propriétés intéressantes pour les études de génétiques: ils sont abondants et éparpillés à travers le génome de la majorité des plantes et des animaux en incluant les moustiques vecteurs du paludisme (Lanzaro *et al.*, 1995). Leurs allèles sont co-dominants et sont situés dans des régions non codantes du génome, ainsi, ils sont généralement considérés comme neutres. Ils présentent un taux de mutation élevé (autour de  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$ ), qui les rend très favorables pour étudier la variation génétique entre populations de la même espèce. La conservation de loci microsatellites d'une espèce à une autre a été démontrée à travers des groupes d'animaux (Stallings, 1995), et elle permet l'utilisation d'amorces hétérologues pour des études comparatives de la variabilité génétique entre espèces proches (Simard *et al.*, 1999, Slotman *et al.*, 2007).

Cependant, plusieurs contraintes sont à prendre en compte dans les études basées sur les microsatellites. Dans certains cas, les microsatellites peuvent se trouver proches de gènes soumis à une sélection et donc ne pas être complètement neutres. Un inconvénient majeur est qu'un grand nombre de mutations peuvent donner comme résultat un allèle de taille voisine

correspondant à celle d'un autre allèle existant. Ainsi, le processus de mutation a une tendance imparfaite à être « par pas » ou « stepwise » (voir modèles mutationnels ci-dessous). Ainsi, plusieurs auteurs ont conseillé d'utiliser les relations entre tailles de loci microsatellites en plus de la fréquence des allèles, pour étudier les distances génétiques entre populations (Goldstein *et al.*, 1995). Par ailleurs, les microsatellites présentent un rythme rapide d'évolution, et des allèles de même taille ne sont pas nécessairement identiques par descendance (homéoplasie) (Estoup *et al.*, 2002). Cette caractéristique des microsatellites peut biaiser l'interprétation des résultats, notamment dans les études de structuration géographique des populations (Balloux and Goudet, 2002, Balloux and Lugon-Moulin, 2002, Fumagalli *et al.*, 2002). C'est pourquoi différents modèles de mutation de ces marqueurs ont été développés. Un autre problème important des microsatellites est l'existence d'allèles nuls qui ont tendance à surestimer le nombre d'homozygotes.

#### **1.4. Modèles de mutation des marqueurs microsatellites**

Il existe différents modèles de mutation des marqueurs microsatellites qui ont été utilisés pour l'analyse des données microsatellites. Ce sont des modèles mutationnels « par pas ». Il s'agit de :

*Infinite Alleles Model (IAM)* : Chaque mutation est unique et les mutations ne sont pas réversibles. Il signifie que deux allèles égaux ont le même ancêtre. Ce modèle n'est pas très bien adapté aux microsatellites car les microsatellites peuvent muter beaucoup, avec pour conséquence des allèles identiques mais provenant des ancêtres différents.

*Stepwise mutation model (SMM)* : La mutation augmente ou diminue la taille d'un allèle d'une unité. En conséquence, deux allèles qui diffèrent d'une seule unité sont plus proches génétiquement que ceux qui diffèrent de plusieurs unités.

*Generalized stepwise model (GSM)* : La mutation change la taille d'un allèle de  $x$  unités, où  $x$  est une variable aléatoire (qui suit une loi de distribution donnée). Le *SMM* est un cas particulier de *GSM* avec  $x = -1$  ou  $1$ .

*Two-Phased Mutation model (TPM)* : Dans ce modèle, la mutation se fait en deux phases.

## **2. Collecte, génotypage des moustiques aux loci microsatellites et analyse des données**

### **2.1. Echantillonnage des moustiques**

La présente étude a été faite avec les moustiques *An. funestus* s.s. collectés dans les villages Wanho (traitement PNLP), Lokohoué (traitement MILD), Tokoli Vidjinnagnimon (traitement MILD), Tokoli (traitement PID) et Amouléhoué (traitement MILD+BI), de février à mai 2008 (avant intervention) et d'avril à juillet 2009 (environ 1 an après la mise en place des interventions). Ces villages ont été choisis compte tenu du nombre de femelles de cette espèce capturée (>10) au cours des enquêtes entomologiques.

### **2.2. Identification spécifique et génotypage aux loci microsatellites des moustiques**

#### **2.2.1. Extraction de l'ADN**

L'ADN génomique a été extrait de l'abdomen, des ailes et des pattes de chaque moustique suivant le protocole de (Cornel and Collins, 1996) que nous avons légèrement modifié. Après extraction, cet ADN a été re-suspendu dans l'eau stérile (voir protocole détaillé en annexe).

#### **2.2.2. Identification spécifique des moustiques par PCR**

L'identification spécifique au sein du groupe *An. funestus* a été faite par PCR (Polymerase Chain Reaction) selon un protocole basé sur celui de Koekemoer *et al.* (2002) (Koekemoer *et al.*, 2002). Une analyse exhaustive de ces moustiques a été faite afin de confirmer les résultats de l'identification morphologique et de permettre ainsi une interprétation correcte des données sur les marqueurs microsatellites. Six espèces ont été recherchées par PCR avec les amorces : *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. parensis*, *An. rivulorum*, *An. lesoni*, *An. rivulorum like*, selon le protocole décrit par (Cohuet *et al.*, 2003) (voir protocole détaillé en annexe).

#### **2.2.3. Génotypage aux loci microsatellites des moustiques**

Le génotype des moustiques a été déterminé à 11 loci microsatellites choisis à partir de données publiées (Cohuet *et al.*, 2002, Sharakhov *et al.*, 2004, Sinkins *et al.*, 2000). Ces marqueurs ont été sélectionnés sur la base de leur grand polymorphisme, de l'absence

apparente d'allèles nuls, de leur taille (comprise entre 70 et 205 paires de bases) et de leur répartition sur l'ensemble des bras chromosomiques (tableau 4-1).

**Tableau 4-1** : Taille, localisation et marquage des loci microsatellites utilisés

Locus	Motifs répétés	Localisation	Amorces (5'-3')	Marquages	Couleurs	Taille en paires de bases
FunL	(GT)8	2L	F:AACAGTGGGAAGGCAAATTGC R:GCACGGTTACCACTGCTCA	NED	jaune	140-166
AFUB11	(CTG)3+5+2+2		F:CAGTTTCTGCGTGGAGGAAT R:AGCAGCTGATGAGCCATCTC	6FAM	Bleu	188-191
FunO	(CA)6TA(AC)4	2R	F:GCACACATTTGAGGCAGC R:GCCCACATTCTGCACCTT	6FAM	Bleu	110-132
AFND32	(TG)2TT(TG)3AG(TG)6		F:GAAGCATTGTTGGGTTAGACTC R:GCAGTTGTTTACCTTTCACTG	NED	jaune	103-121
FunF	(TG)9	3L	F:GCCTTCAGTTTCGATTGGCG R:AATAAGATGCGACCGTGGC	6FAM	Bleu	104-118
FUNK	(GT)9		F:GCGCTCCGCAAACATA R:ACTCACACCCCATTTCTGTG	NED	jaune	184-202
FunG	(TG)9	3R	F:GAGCAAGCAGCTTACTGCAC R:ACGTTCAGTGCACATCAATG	NED	jaune	146-168
AF7	(GT)8		F:TGCATCATTGACTCGGAAG R:AACGGCACTACCGTTCACTG	NED	jaune	70-84
AF19	(GT)12		F:CAGAACCACTTCGATTCAAC R:CCTGCACTCAGAAACACAC	6FAM	Bleu	172-205
AF20	(GT)7+2		F:AGAACCACATTAGGGAACAG R:TTTACAACCAGCAGCACAC	VIC	vert	123-139
FunQ	(TG)9	X	F:GCAAAGTCTAGTAAATGTTTCC R:ACATTTCCACAATTTGCGC	VIC	vert	84-98
FUNE	(CA)7TA(CA)3		F:GACCGGTTCTGGTATCGTC R:ATCGAGTCACCCAATTCTCC	VIC	vert	136-154

Chaque locus a été amplifié par PCR avec des amorces marquées (voir protocole détaillé en annexe). Les produits PCR ont été dilués et mélangés selon leur taille et la couleur de marquage des amorces. Ces mélanges ont été ensuite migrés au séquenceur ABI 3130XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) avec du 500 Liz internal size standard. La taille des fragments (allèles) a été déterminée à l'aide du logiciel GENEMAPPER V4.0 software (Applied Biosystems) et les génotypes ont été attribués à chaque moustique pour chaque locus microsatellite.

### 2.3. Analyse des résultats

Les paramètres génétiques ( $F_{IS}$ , richesse allélique ( $R_s$ ), hétérozygotie attendue ( $H_e$ ), hétérozygotie observée ( $H_o$ )) par locus et dans chaque village avant et après la mise en place des interventions ont été estimés avec les logiciels FSTAT V2.9.3 (Goudet, 1995) et GENETIX V4.02 (Dawson and Belkhir, 2001). Ces paramètres ont été comparés entre villages avant et après traitement par un test de Wilcoxon avec le logiciel R.

L'analyse de la structuration des populations a été faite avec le logiciel STRUCTURE V2.1. Cette analyse a été faite en minimisant les déséquilibres de liaison entre loci et sans faire des suppositions à priori, selon la procédure décrite par (Pritchard *et al.*, 2000). Afin d'évaluer la différenciation génétique (expansion ou goulot d'étranglement) causée par les différents outils de lutte antivectorielle mis en place dans les villages, des tests d'hétérozygotie ont été effectués pour l'équilibre mutation-dérive avec le logiciel BOTTLENECK V1.0.02 (Cornuet and Luikart, 1996). Ce logiciel compare deux estimations de l'hétérozygotie attendue, l'une basée sur la fréquence allélique ( $H_e$ ) et l'autre basée sur le nombre d'allèles et la taille de l'échantillon ( $H_{eq}$ ). Dans une population en équilibre mutation-dérive, ces deux estimations ne devraient pas être significativement différentes ( $H_e \approx H_{eq}$ ). Si dans la population étudiée, il y a un goulot d'étranglement, les allèles rares seront perdus par dérive génétique et l'estimation de  $H_{eq}$  va diminuer plus rapidement que celle de  $H_e$  ( $H_e > H_{eq}$ ); dans le cas contraire (expansion),  $H_e < H_{eq}$ . Les estimations de  $H_e$  et de  $H_{eq}$  ont été faites en utilisant deux modèles de mutation des allèles microsatellites au cours de leur évolution. Il s'agit du modèle de mutation en deux phases (Two-Phased Mutation model (TPM)) (Kimura *et al.* 1978), avec des fractions de mutations uniques fixées à 70%, 80% et 90%, et le modèle de mutation par pas (Stepwise Mutation Model (SMM)) (Braginets *et al.*, 2003, Di Rienzo *et al.*, 1994).

La taille effective des populations a été calculée avant et après la mise en place des interventions avec le logiciel MNe 1.0. Ce calcul repose sur la théorie de « l'approche temporelle » dans les changements au niveau des fréquences alléliques des microsatellites. En effet, sous la supposition d'absence de mutation, de sélection ou de migration, les changements des fréquences alléliques des microsatellites sont le résultat de dérive génétique dont la force est inversement proportionnelle à la taille de l'échantillon.

### 3. Résultats

#### 3.1. Impact des interventions sur la diversité génétique des populations

Le génotype de 426 *An. funestus s.s.* collectés dans 5 villages avant et après la mise en place des interventions a été déterminé à 11 loci microsatellites répartis sur l'ensemble du génome du moustique. Les paramètres de variabilité génétique au sein de la population de *An. funestus s.s.* de chaque village pour chaque locus avant et après la mise en place des interventions sont présentés dans le tableau 4-2. La richesse allélique ( $R_s$ ) moyenne globale a été de 2,86 allèles par locus microsatellite. Elle a varié de 1,9 allèle par locus microsatellite (AFB11) à 3,3 allèles par locus microsatellite (FUNK). En ce qui concerne la richesse allélique moyenne par village, une légère différence significative a été notée entre la richesse allélique moyenne dans le village de Tokoli (2,75 allèles par locus microsatellite) et celle dans le village de Tokoli Vidjinnangnimon (2,90 allèles par locus microsatellite) ( $P=0,01$ ) avant la mise en place des interventions. Aucune différence significative de la richesse allélique n'a été observée avant et après traitement quel que soit le village ( $P>0,20$ ).

Quel que soit le village, avant ou après la mise en place des interventions, aucune indication de déviation par rapport à la panmixie n'a été observée à l'intérieur de la population de *An. funestus s.s.*, suggérant un pool de gènes homogène, sans subdivision apparente. Néanmoins, quelques déviations significatives par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg, probablement imputables aux fluctuations stochastiques dues au faible nombre de spécimens collectés dans certains villages, ont été observées au locus FUNL. C'est le cas du village de Tokoli Vidjinnangnimon avant traitement ( $F_{IS}=0,203$  ;  $p<0,001$ ), et des villages de Wanho et de Lokohoué après traitement ( $F_{IS}=0,327$  ;  $p<0,001$  et  $F_{IS}=0,272$  ;  $p<0,001$ ).



**Tableau 4-2 :** Variabilité génétique à 11 loci microsatellites des populations de *An. funestus* dans les villages avant et après la mise en place des interventions

		Before intervention					After intervention					Global 2n=858	
		Wanho	Tokolividjin.	Lokohoue	Tokoli	Amoulehoue	PNLP	MILD	PID	MILD+BI			
		2n=16	2n=166	2n=68	2n=30	2n=16	Wanho 2n=78	Tokolividjin. 2n=146	Lokohoue 2n=174	Tokoli 2n=102	Amoulehoue 2n=62		
X	FUNQ	<b>Rs</b>	2,68	2,56	2,41	2,04	2,92	2,59	2,55	2,49	2,47	2,68	2,54
		Fis	0,44	0,24	0,10	0,18	0,06	0,17	0,21	0,16	0,25	-0,08	0,17
		He	0,74	0,69	0,63	0,56	0,79	0,70	0,69	0,66	0,67	0,72	0,69
2R	AF32	<b>Rs</b>	3,10	2,96	3,03	3,03	3,18	2,98	3,02	3,00	2,95	2,99	3,02
		Fis	0,11	0,07	-0,05	0,02	0,13	0,25	0,18	0,01	0,16	-0,05	0,08
		He	0,83	0,80	0,81	0,81	0,85	0,80	0,81	0,80	0,79	0,80	0,81
2L	FUNO	<b>Rs</b>	2,81	3,06	3,09	2,94	2,76	3,13	3,02	2,99	2,94	3,03	2,98
		Fis	0,36	0,08	0,09	0,10	-0,14	-0,03	0,14	0,00	0,12	0,14	0,09
		He	0,76	0,82	0,83	0,79	0,76	0,84	0,81	0,80	0,79	0,81	0,80
3R	AFUB11	<b>Rs</b>	3,34	3,15	3,09	3,17	3,40	3,08	3,16	3,22	3,18	3,19	3,20
		Fis	0,31	<b>0,20</b>	0,23	0,29	0,46	<b>0,33</b>	0,09	<b>0,27</b>	0,03	0,19	0,24
		He	0,88	0,84	0,82	0,83	0,89	0,82	0,84	0,85	0,84	0,85	0,85
3L	AF19	<b>Rs</b>	0,63	0,67	0,64	0,60	0,50	0,55	0,76	0,62	0,82	0,69	0,65
		Fis	1,86	2,16	2,07	1,61	1,50	1,87	2,05	1,95	2,00	2,02	1,91
		He	-0,19	0,06	0,10	0,20	-0,04	-0,16	0,02	-0,10	0,08	0,00	0,00
3R	AF7	<b>Rs</b>	0,43	0,54	0,52	0,33	0,24	0,42	0,49	0,45	0,49	0,49	0,44
		Fis	0,50	0,51	0,47	0,27	0,25	0,49	0,48	0,49	0,45	0,48	0,44
		He	0,75	0,70	0,65	0,92	0,63	0,79	0,73	0,76	0,88	0,79	0,76
3R	AF20	<b>Rs</b>	2,10	2,64	2,38	2,32	3,05	2,59	2,72	2,55	2,65	2,47	2,55
		Fis	0,29	0,09	0,17	0,01	-0,07	0,15	0,17	0,00	0,06	0,10	<b>0,10</b>
		He	0,52	0,71	0,64	0,58	0,83	0,69	0,72	0,67	0,71	0,65	0,67
3R	FUNG	<b>Rs</b>	0,38	0,64	0,53	0,57	0,88	0,59	0,60	0,67	0,67	0,59	0,61
		Fis	3,10	3,08	2,97	3,04	2,82	3,06	2,97	2,95	3,06	2,77	2,98
		He	-0,07	0,05	0,08	0,02	0,03	-0,07	-0,05	0,00	0,05	0,14	0,02
3R	FUNK	<b>Rs</b>	0,83	0,82	0,79	0,81	0,78	0,82	0,80	0,79	0,82	0,75	0,80
		Fis	0,88	0,78	0,74	0,80	0,75	0,87	0,84	0,79	0,78	0,65	0,79
		He	2,96	3,13	3,15	3,00	3,25	3,08	3,13	3,17	3,24	3,11	3,12
3L	FUNF	<b>Rs</b>	0,12	-0,04	-0,02	0,35	-0,17	-0,06	0,07	0,14	0,01	-0,09	0,03
		Fis	0,80	0,83	0,84	0,81	0,87	0,82	0,83	0,84	0,86	0,83	0,83
		He	0,71	0,86	0,85	0,54	1,00	0,87	0,78	0,72	0,85	0,90	0,81
3L	FUNK	<b>Rs</b>	3,13	2,93	2,85	2,79	2,95	2,89	2,90	2,93	2,80	3,00	2,91
		Fis	-0,21	-0,04	0,03	0,10	0,07	-0,04	0,04	0,04	-0,02	-0,09	-0,01
		He	0,84	0,79	0,77	0,74	0,80	0,78	0,78	0,79	0,76	0,81	0,79
Global	Global	<b>Rs</b>	1,00	0,82	0,75	0,67	0,75	0,81	0,75	0,75	0,77	0,88	0,80
		Fis	4,00	3,26	3,02	3,55	3,20	3,23	3,25	3,29	3,03	3,27	3,31
		He	0,00	0,00	0,11	0,08	0,27	0,10	0,03	0,07	0,06	0,25	0,10
Global	Global	<b>Rs</b>	1,00	0,86	0,80	0,92	0,87	0,86	0,85	0,87	0,81	0,86	0,87
		Fis	0,77	0,77	0,75	0,72	0,77	0,76	0,76	0,76	0,75	0,76	0,76
		He	0,68	0,72	0,68	0,65	0,71	0,71	0,70	0,71	0,71	0,72	0,70

**Caractère gras :**  $p < 0,05$  après correction de Bonferonni

L'hétérozygotie observée quant à elle a varié de 0,65 (Tokoli) à 0,72 (Tokoli Vidjinangninmon) avant la mise en place des interventions et de 0,70 (Tokoli Vidjinangninmon) à 0,72 (Amouléhoué) après cette mise en place. Elle n'a pas été significativement différente dans les villages avant et après intervention ( $P > 0,32$ ) (tableau 4-3).

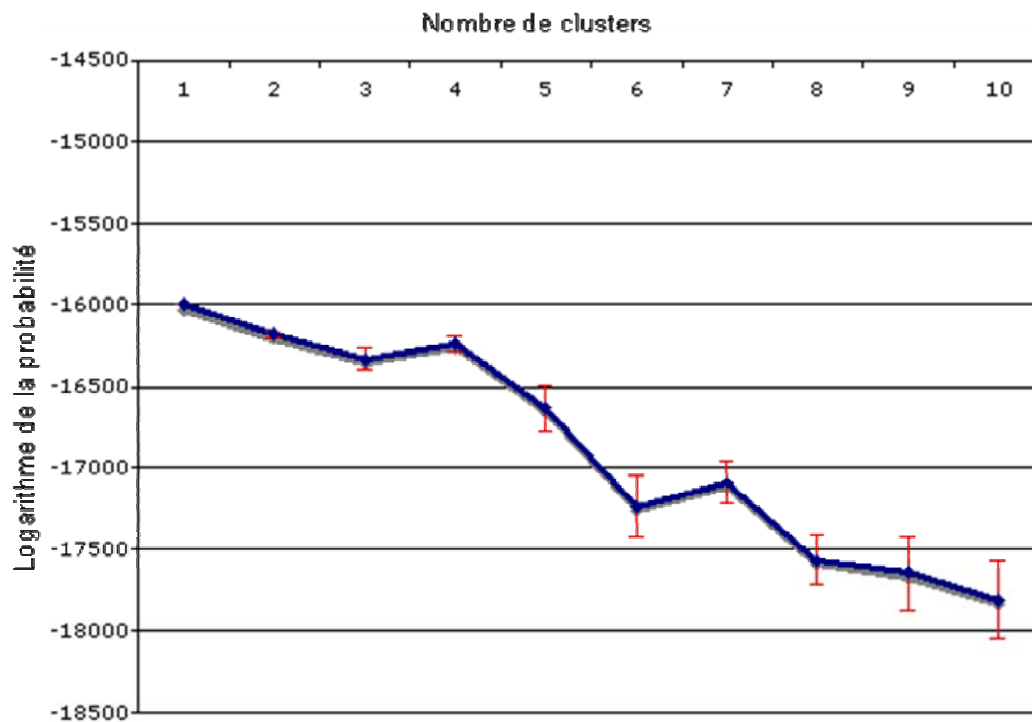
**Tableau 4-3** : Hétérozygotie observée avant et après traitement par village

Villages	Avant intervention	Après intervention	Valeur de P
Wanho	0,68	0,71	0,83
Tokoli Vidjin.	0,72	0,70	0,32
Lokohoue	0,68	0,71	0,32
Tokoli	0,65	0,71	0,32
Amouléhoué	0,71	0,72	0,70

### 3.2. Impact des interventions sur la structure génétique et la dynamique de la population

L'index de fixation  $F_{ST}$  qui mesure la réduction de l'hétérozygotie à l'intérieur des populations par rapport à la population totale n'a pas été significatif quel que soit le village avant et après traitement ( $F_{ST} < 0,0568$  et  $P > 0,05$ ).

L'analyse de la structuration au sein des populations de *An. funestus* s.s. collectées dans les 5 villages avant et après traitement a montré que la probabilité pour les moustiques collectés d'appartenir à une même population (1 cluster) est la plus forte [ $P(K|X)=1$ ] (figure 4-1), suggérant une absence de structuration de la population de *An. funestus* de la zone d'étude aussi bien avant et qu'après traitement.



**Figure 4-1** : Logarithme de la probabilité en fonction du nombre de clusters

Le tableau 4-4 montre le nombre de loci ayant présenté un déficit d'hétérozygotes sous différents modèles de mutation. Quel que soit le modèle de mutation, aucun goulot d'étranglement n'a été observé au sein de cette population après la mise en place des interventions.

**Tableau 4-4 :** Test d'hétérozygotie au sein des populations de *An. funestus* des villages avant et après la mise en place des interventions

Villages	Traitements		TPM			SMM
			70%	80%	90%	
Wanho	PNLP	Avant	4	4	4	6
		Après	5	5	7	9*
Tokoli	MILD	Avant	3	6	6	10**
		Après	2	3	4	10**
Lokohoué	MILD	Avant	2	3	6	8
		Après	5	6	9*	10***
Tokoli	PID	Avant	4	4	5	5
		Après	3	4	5	11***
Amoulehoulé	MILD+BI	Avant	2	2	2	2
		Après	4	4	4	8

\*P < 0,05 ; \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001 (Test de rang de Wilcoxon, valeurs de P pour l'équilibre mutation-dérive)

### 3.3. Taille effective de la population

Les estimations de la taille effective ( $N_e$ ) de la population pour l'intervalle de temps compris entre les deux périodes d'échantillonnage (avant et après la mise en place des interventions) ont été faites en considérant des valeurs moyennes de 12, 15, et 20 générations. Ces estimations ont été faites en combinant les informations sur les 11 loci microsatellites. Les valeurs de  $N_e$  obtenues et leurs intervalles de confiance : 7782 [1483 -  $\infty$ ] ; 9727 [1854 -  $\infty$ ] ; et 12967 [2472 -  $\infty$ ] pour respectivement 12 ; 15 ; et 20 générations, qui reflètent la taille minimale de la population atteinte au cours de l'intervalle de temps considéré, ont été très élevées.

## 4. Discussion et conclusion

### 4.1. Discussion

De la présente étude, il ressort que les moustiques *An. funestus s.s* collectés dans les villages de l'étude font partie d'une même population et les interventions de lutte antivectorielle n'ont pas eu un impact sur cette population.

L'absence de structuration génétique observée dans la présente étude contraste avec les résultats des travaux de Braginetts *et al.*, (2003) au Kenya qui ont observé une différenciation génétique entre populations de *An. funestus s.s.* de la région côtière et de la région occidentale (Braginetts *et al.*, 2003). Les auteurs ont expliqué cette différenciation par une barrière géographique (la vallée du Rift) qui séparait les deux populations. L'absence de structuration constatée dans cette étude n'est donc pas surprenante dans la mesure où aucune barrière physique n'existait entre les villages où nous avons échantillonné les moustiques ce qui permet un flux de gènes important. En outre, la zone d'étude a une étendue relativement faible avec une superficie d'environ 800 km<sup>2</sup> et une distance de moins de 30 km séparant les villages les plus éloignés. Si cette absence de structuration se confirmait à une échelle plus importante (l'ensemble du Bénin par exemple), alors une expansion rapide des gènes d'intérêt (gènes de résistance par exemple) est possible au sein de ces vecteurs. Il est donc important de vérifier cette absence de structuration à une plus grande échelle et de réaliser un suivi de la résistance chez ce moustique.

Les outils de lutte antivectorielle mis en place n'ont pas eu d'impact sur la diversité génétique de la population de *An. funestus s.s.* Wondji *et al* (2005) en étudiant l'impact de la mise en place des moustiquaires imprégnées sur la structure génétique chez *An. arabiensis* ont fait une observation similaire (Wondji *et al.*, 2005). Une explication possible de ce résultat est que la population résiduelle (après l'effet des outils mis en place) est assez importante. En effet, même si les outils de lutte antivectorielle induisent une forte mortalité au sein des moustiques, la taille assez grande de la population résiduelle et le temps relativement long qui s'est écoulé entre la mise en place des interventions et l'échantillonnage permettraient de retenir presque toute la diversité génétique de cette population. Une autre explication possible de ces résultats est une ré invasion des villages traités par des populations de *An. funestus s.s.* venant des villages environnants n'ayant pas reçu des interventions de lutte antivectorielle.

Les tailles effectives estimées ont été très élevées, suggérant comme nous venons de le dire, une population résiduelle importante. Ces résultats montrent que malgré la mise en place des interventions de lutte antivectorielle, la taille de la population de *An. funestus s.s.* ne descend pas en deçà d'un seuil qui est de l'ordre de plusieurs centaines ou de plusieurs milliers d'individus. Toutefois, l'estimation de la taille effective doit être prise ici avec précaution, dans la mesure où cette estimation a été basée sur plusieurs hypothèses dont l'absence de mutation et de migration. En ce qui concerne l'absence de mutation, il est raisonnable d'estimer que l'influence de la mutation est négligeable étant donné le faible intervalle de temps considéré (~1 an), même si l'on considère des loci avec un taux de mutation élevé. Par contre, pour ce qui est de l'absence de migration, il est fort possible que des moustiques des villages environnants au cours de leur dispersion viennent dans les villages de notre étude. De ce fait, l'hypothèse de l'absence de migration ne serait probablement pas respectée. Il est donc possible que l'estimation de la taille effective soit biaisée.

#### **4.2. Conclusion**

Cette étude fournit des informations sur la structure génétique de *An. funestus s.s.* dans 5 villages de la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori. Un flux important de gènes a été observé entre ces villages et aucune structuration de la population de ce vecteur n'a été notée. En outre, les résultats de cette étude montrent que les interventions mises en place dans les villages n'ont pas eu d'impact sur la diversité génétique de *An. funestus s.s.*

Une étude de la génétique des populations de ce vecteur prenant en compte des individus collectés dans diverses localités du Bénin est nécessaire afin de confirmer l'absence de structuration observée à une échelle plus importante.

## **Chapitre 5 : Conclusions générales et perspectives**

L'un des objectifs du millénaire pour le développement (OMD) est de combattre le VIH/SIDA, le paludisme, la tuberculose et d'autres maladies. En ce qui concerne le paludisme, le taux de mortalité des enfants de moins de 5 ans devrait être réduit de deux tiers d'ici 2015. A l'heure actuelle, de plus en plus de pays africains s'investissent avec l'appui des partenaires financiers (UNICEF, Fonds Mondial, PMI...) dans la lutte contre le paludisme à travers la distribution massive de moustiquaires imprégnées pour protéger leurs populations contre cette maladie. Mais la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes ne cesse de s'étendre. Il est donc primordial de rechercher des stratégies alternatives permettant de maintenir l'efficacité des outils actuels et de gérer la résistance aux insecticides de ces vecteurs. Cette thèse repose sur l'expérimentation d'une stratégie de lutte contre les vecteurs du paludisme et de gestion de leur résistance aux insecticides. Cette stratégie consiste à combiner à l'intérieur des habitations, deux traitements insecticides résiduels, en l'occurrence les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (deltaméthrine) et le bendiocarb en aspersion intradomiciliaire ou en imprégnation de bâches murales.

Les résultats que nous avons obtenus au laboratoire et en conditions semi-naturelles ont été prometteurs, mais l'essai contrôlé randomisé réalisé dans 28 villages de la zone sanitaire Ouidah-Kpomassè-Tori au sud du Bénin n'a pas montré de bénéfice en termes de réduction de la transmission du paludisme, de l'infection et de la maladie palustre chez les enfants de moins de 5 ans de l'utilisation de telles combinaisons. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats comme des facteurs anthropo-sociologiques (perception et utilisation des traitements), opérationnels (effet résiduel du bendiocarb, couverture des bâches), biologiques (comportement des vecteurs, résistance des vecteurs aux insecticides) et épidémiologiques (faible niveau de transmission dans la zone d'étude, indicateur principal d'efficacité basé sur la cible privilégiée de toutes les interventions (enfants < 5 ans)). Il ressort donc de cette étude que dans le cadre de la lutte antivectorielle contre le paludisme, plusieurs facteurs sont à prendre en compte. Par ailleurs, la recherche d'autres stratégies alternatives de lutte antivectorielle et de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides doit se poursuivre.

## 1. Contraintes opérationnelles de la lutte antivectorielle

Nous l'avons montré dans la présente étude que l'activité résiduelle de l'insecticide utilisé pour le traitement des murs ou des bâches a été limitée dans le temps. En cas expérimentales, puisque les essais n'ont duré qu'une cinquantaine de jours, il est possible que l'impact de cette baisse de l'activité résiduelle sur les indicateurs entomologiques mesurés ne soit pas bien perceptible. Le suivi des traitements à l'échelle communautaire étant plus long, nous nous sommes rendu compte que pour être efficaces, les pulvérisations intradomiciliaires avec le bendiocarb doivent être répétées au moins 4 fois dans une année (la rémanence de ce produit ne dépassant pas 3 mois). Pour des raisons économique et logistique, ce nombre de traitement par an n'est pas envisageable dans le contexte de l'Afrique au sud du Sahara. Il est indispensable de rechercher d'autres alternatives. Les matériaux imprégnés d'insecticide à longue durée d'action représenteraient alors une alternative sérieuse pour le traitement des murs.

Les bâches en polypropylène tissées et imprégnées de bendiocarb que nous avons utilisées dans la présente étude ont eu une activité résiduelle relativement plus élevée que celle de la pulvérisation intra domiciliaire classique (environ 4 mois). Néanmoins, les contraintes liées à leur réimprégnation (3 fois par an) et les problèmes de sécurité que cet outil pourrait poser en l'occurrence pour les enfants (compte tenu de la biodisponibilité plus importante de l'insecticide sur les bâches) font qu'en l'état, les bâches murales imprégnées ne peuvent pas remplacer la pulvérisation intradomiciliaire classique. C'est en effet pour cette raison que nous n'avons couvert dans cette étude que le tiers supérieur des murs afin d'éviter le contact de l'insecticide avec les enfants. Nous pensons toutefois que ces contraintes peuvent être levées si à l'instar des moustiquaires, il est développé des bâches murales imprégnées à longue durée d'action. Ceci réglerait d'une part le problème de réimprégnation et d'autre part celui de l'inocuité pour les utilisateurs. Il est à noter que les bâches murales imprégnées de perméthrine depuis l'usine ont déjà été mises au point et évaluées dans une récente étude au Burkina Faso (Chandre *et al.*, 2010). Une collaboration avec les industries est alors souhaitée. Cette collaboration permettra d'évaluer à nouveau en zone de résistance des vecteurs aux insecticides le concept de combinaison de deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations en utilisant des outils d'une activité résiduelle plus longue et avec une couverture complète des murs par les bâches imprégnées. Cette étude devra être faite dans un



contexte épidémiologique caractérisé par une forte nuisance culicidienne et une forte transmission du paludisme (où le taux d'utilisation des moustiquaires imprégnées par les populations serait élevé).

## **2. Contraintes anthropo-sociologiques de la lutte antivectorielle**

La distribution des moustiquaires au sein des communautés suscite un engouement de la part de ces dernières. Mais cet engouement ne doit pas être considéré comme une adhésion totale de ces communautés pour l'utilisation des moustiquaires comme outil de prévention contre le paludisme. Un fait important qui ressort de notre étude est le faible taux d'utilisation des moustiquaires imprégnées au sein des communautés. La population ne semble pas utiliser les moustiquaires pour se protéger contre le paludisme mais plutôt pour se protéger des piqûres de moustiques. Ainsi, la nuisance culicidienne étant assez faible dans notre zone d'étude (Djènonin *et al.*, 2010b), l'utilisation des moustiquaires imprégnées a été faible aussi bien dans la population générale que chez les enfants âgés de moins de 5 ans. Cette utilisation diminue en saison sèche. Il est à noter toutefois que leur sensibilisation répétée a tendance à améliorer cette utilisation. Ainsi, les autorités chargées de la lutte contre le paludisme devraient considérer la sensibilisation des populations sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées non pas comme une activité marginale, mais comme une activité aussi importante (sinon plus importante) que leur distribution. Compte tenu de son importance, cette activité devra être conçue par des spécialistes en socio-anthropologie et concerner aussi l'hygiène et l'assainissement du milieu. Au cours de nos passages dans les villages en effet, nous avons constaté que les populations ne font pas toujours la relation entre les larves de moustiques et les adultes responsables de la nuisance et de la transmission du paludisme. Ceci suppose que la lutte antivectorielle doit reposer sur une approche multidisciplinaire.

En ce qui concerne la pulvérisation intra domiciliaire, une réticence a été parfois observée de la part des populations qui ont tendance à considérer comme dangereux le produit qui est utilisé pour traiter leurs habitations. Les agents pulvérisateurs en effet prennent des protections parfois spectaculaires (corps presque entièrement protégé, masque sur le visage, bottes aux pieds.....). Une fois encore, des bâches imprégnées en usine qui seraient remises aux populations (comme se fait la distribution des moustiquaires imprégnées) entraîneraient moins de réticence.

### **3. Comportement des vecteurs et lutte antivectorielle**

Une stratégie de lutte antivectorielle n'est réellement efficace que si elle tient compte de la bio-écologie et du comportement du vecteur cible. Or les mécanismes mis en jeu par les vecteurs hématophages dans la localisation de l'hôte vertébré, dans la prise du repas de sang et le repos sont très complexes (Lyimo and Ferguson, 2009). Ceux-ci peuvent également être fortement modifiés et/ou altérés par la présence d'insecticides résiduels (Dogan *et al.*, 1999, Malima *et al.*, 2009). A titre d'exemple, Siegert *et al.*, (2009) ont montré que la fréquence de pose des anophèles sur des moustiquaires imprégnées de pyréthriinoïdes était très différente selon l'insecticide utilisé et fortement en défaveur de l'insecticide plus excito-répulsif (Siegert *et al.*, 2009). Or la réduction du temps de contact du moustique avec la moustiquaire imprégnée a pour conséquence de diminuer son efficacité knockdown et létale. Il est évident que le comportement du moustique sera différent selon la méthode utilisée, l'espèce vectrice ciblée (*An. funestus* versus *An. gambiae*), la forme moléculaire (M versus S) et la présence d'un ou de plusieurs gènes de résistance aux insecticides. La présence des bâches murales dans les habitations serait également susceptible de modifier le comportement des moustiques en fonction des espèces et des formes moléculaires. Il est alors nécessaire d'entreprendre des recherches sur le comportement des vecteurs pour une optimisation des actions de lutte antivectorielle. Afin de mieux appréhender le comportement des moustiques en présence et en absence de produits insecticides, des approches de modélisation spatiale doivent être entreprises. Ces études pourront être réalisées au laboratoire (tunnel) et sur le terrain (cases expérimentales) par des systèmes de « vidéo tracking » (2D et 3D) permettant de mesurer précisément le comportement de vol, de sonde, de piqûre et de repos des moustiques vecteurs. Ceci permettra de déterminer la façon de couvrir les murs avec les bâches imprégnées à longue durée d'action pour une meilleure efficacité de cet outil. Ces recherches permettront en outre de développer de nouvelles méthodes de piégeage et/ou des stratégies de lutte antivectorielle plus efficaces sur le terrain.

### **4. Stratégies alternatives de lutte antivectorielle**

Les recherches de stratégies alternatives de lutte contre les vecteurs du paludisme doivent être menées sur plusieurs fronts et en plusieurs étapes afin de n'écarter aucune piste intéressante. A court terme, la mise en place de stratégies de lutte intégrée contre les vecteurs et les parasites doit être une priorité. Il faut également « préserver » les produits insecticides

disponibles dans l'arsenal chimique (en particulier les pyréthriinoïdes), en favorisant l'utilisation de familles d'insecticides non-pyréthriinoïde pour les applications hors « moustiquaires » tels que les pulvérisations intradomiciliaires ou pulvérisations spatiales. Des résultats prometteurs ont été obtenus à l'aide de nouvelles familles d'insecticides tels que les pyroles (N'Guessan et al 2007) et/ou les champignons entomopathogènes (Blanford *et al.*, 2005, Scholte *et al.*, 2005). Ces derniers (e.g. *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*) ont montré une efficacité insecticide intéressante contre les anophèles vecteurs du paludisme en Afrique et présentent l'avantage de ne pas montrer de résistance croisée avec les insecticides chimiques conventionnels (Farenhorst *et al.*, 2009). Malheureusement, comme beaucoup de nouvelles familles d'insecticides testées, leur mode d'action est relativement lent (7-10 jours), ce qui présente l'inconvénient de réduire potentiellement la protection personnelle et ainsi limiter l'utilisation des traitements par les communautés. En revanche, comme suggéré par plusieurs auteurs (Read *et al.*, 2009), les insecticides dits à action lente (IAL) pourraient contribuer à une meilleure gestion des résistances en affectant moins la fitness (succès reproductif) des moustiques que les insecticides classiques à action rapide (car ils permettraient aux femelles d'effectuer 1 ou 2 cycles gonotrophiques avant d'être éliminées). Cette théorie, qui ne manque pas d'originalité, devrait être testée et validée sur le terrain en conditions contrôlées. Une autre voie de recherche qui peut être explorée à court terme est un concept de lutte antivectorielle basé sur l'approche « attirer et tuer ». Ce concept développé et testé en Israël a fait l'objet d'une étude récemment menée au Mali. Il consiste à l'utilisation de jus sucré (qui naturellement attire les moustiques) mais rendu toxique par un insecticide oral, l'acide borique. L'utilisation de cette méthode contre les vecteurs du paludisme *An. gambiae* a donné des résultats encourageants (Muller *et al.*, 2010).

A moyen terme, il faudra compter sur la lutte génétique. Celle ci fait appel à deux grandes méthodes ; la technique de l'insecte stérile (TIS) et la technique de l'insecte génétiquement modifié (IGM) (Beaty, 2000). La première technique est utilisée depuis les années 60 pour le contrôle des populations de moustiques avec plus ou moins de succès en raison de nombreuses difficultés d'ordre opérationnel (stérilisation, transports, fitness, recolonisation, etc.), éthique et financier (Benedict and Robinson, 2003). La deuxième consiste à introduire un gène d'intérêt au sein d'un moustique afin d'annihiler sa descendance (Atkinson *et al.*, 2001), ou de le rendre réfractaire au développement d'un pathogène (Knols *et al.*, 2007). Les projets visant à relâcher des moustiques mâles stériles ont été relancés sur les vecteurs du paludisme (Klassen, 2009) en particulier au Soudan (Helinski *et al.*, 2008) et à l'île de la Réunion (Fontenille com. pers.). Cette dernière étude menée en milieu fermé (insulaire), où

réside une seule espèce d'anophèles (*An. arabiensis*) et où les moyens mis en œuvre sont importants (implications des collectivités, de l'état, et de nombreuses équipes de recherche) permettra certainement d'apporter des réponses concrètes sur la faisabilité et l'intérêt d'utiliser cette stratégie pour le contrôle des populations de vecteurs. Concernant les anophèles génétiquement modifiés, de gros progrès ont été réalisés pour améliorer leur fitness (Marrelli *et al.*, 2007), ce qui laisse entrevoir de meilleures perspectives pour la réalisation d'études expérimentales sur le terrain. Il est bien entendu plus difficile de se projeter dans le long terme. Il est certain que la cartographie complète des génomes des principales espèces vectrices du paludisme (*Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*) et le développement des outils modernes de génétique et de génomique fonctionnelle permettront de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides, l'adaptation des vecteurs à leur environnement, les gènes de l'immunité et/ou encore les processus olfactifs impliqués dans la reconnaissance et l'attraction de l'hôte vertébré. Nous pouvons également espérer contourner plus efficacement les résistances chez les vecteurs par l'utilisation d'agents biologiques permettant d'augmenter l'efficacité des insecticides existants vis-à-vis des vecteurs du paludisme. En effet, il a été récemment montré la potentialité d'utiliser des virus recombinants génétiquement modifiés comme agents « synergisants » permettant d'augmenter la sensibilité des récepteurs cibles aux insecticides. Cette approche originale vient d'observations récentes réalisées sur les voies de signalisation intracellulaire (phosphorylation/déphosphorylation) impliquées dans la régulation de la conformation moléculaire des cibles membranaires visées par les insecticides (Alix *et al.*, 2002, Courjaret *et al.*, 2003, Thany *et al.*, 2007, Lapied *et al.*, 2009). En effet, l'activation des récepteurs cibles des insecticides via des kinases et/ou des phosphatases pourrait augmenter leur sensibilité d'un facteur de x1000 (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010). Cette stratégie innovante mêlant recherche fondamentale et appliquée souscrit parfaitement aux priorités de recherches actuelles visant à mieux gérer les résistances tout en réduisant l'impact des pesticides chimiques sur l'environnement.

## Références bibliographiques

1. ABDALLA H., MATAMBO T. S., KOEKEMOER L. L., MNZAVA A. P., HUNT R. H., COETZEE M. Insecticide susceptibility and vector status of natural populations of *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008, 102 (3), 263-271.
2. ADDINSOFT. XLSTAT, Data analysis and statistics with Microsoft Excel. Paris, France, 2009.
3. AHORLU C. K., DUNYO S. K., AFARI E. A., KORAM K. A., NKURUMAH F. K. Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control. *Trop Med Int Health*, 1997, 2 (5), 488-99.
4. AKOGBÉTO M. Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake. *Ann Soc Belg Med Trop*, 1995, 75 (3), 219-27.
5. AKOGBÉTO M. C., DJOUAKA R. F., KINDE-GAZARD D. A. Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malar J*, 2006, 5, 22.
6. AKOGBÉTO M., YAKOUBOU S. Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets, Benin, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot.*, 1999, 92 (2), 123-130.
7. AKOGBÉTO M. C, PADONOU G. G., GBÉNOU D., IRISH S., YADOLETON A. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J*, 2010, 9, 204.
8. ALIX P., GROLLEAU F., HUE B. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase regulates GABA-activated Cl<sup>-</sup> current in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol*, 2002, 87 (6), 2972-82.
9. ALONSO P. L., SMITH T., SCHELLENBERG J. R., MASANJA H., MWANKUSYE S., URASSA H., BASTOS DE AZEVEDO I., CHONGELA J., KOBERO S., MENENDEZ C., ET AL. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet*, 1994, 344 (8931), 1175-81.
10. ALPHEY L., BEARD C. B., BILLINGSLEY P., COETZEE M., CRISANTI A., CURTIS C., EGGLESTON P., GODFRAY C., HEMINGWAY J., JACOBS LORENA M., JAMES A. A., KAFATOS F. C., MUKWAYA L. G., PATON M., POWELL J. R., SCHNEIDER W., SCOTT T. W., SINA B., SINDEN R., SINKINS S., SPIELMAN A., TOURE Y., COLLINS F. H. Malaria

- control with genetically manipulated insect vectors. *Science Washington*, 2002, 298 (5591), 119-121.
11. ANSARI M A, RAZDAN R K. Impact of residual spraying of bendiocarb against the malaria vector *Anopheles culicifaces* in selected villages of the Ghaziabad District, Uttar Pradesh, India. *J Am Mosq Control Assoc*, 2004, 20 (4), 418-23.
  12. ATKINSON P. W., PINKERTON A. C., DA O' BROCHTA. Genetic transformation systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 2001, 46, 317-346.
  13. AVISE J. C., POWER A. J., WALKER D. Genetic sex determination, gender identification and pseudohermaphroditism in the knobbed whelk, *Busycon carica* (Mollusca: Melongenidae). *Proc Biol Sci*, 2004, 271 (1539), 641-6.
  14. BALLOUX F., GOUDET J. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Mol Ecol*, 2002, 11 (4), 771-83.
  15. BALLOUX F., LUGON-MOULIN N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*, 2002, 11 (2), 155-65.
  16. BEATY BARRY J. Genetic manipulation of vectors: a potential novel approach for control of vector-borne diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (19), 10295-10297.
  17. BEIER J. C. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 1998, 43, 519-543.
  18. BENEDICT M. Q., ROBINSON A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol*, 2003, 19 (8), 349-55.
  19. BERNARD P.-M., LAPOINTE C. Mesures statistiques en épidémiologie. *Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy*, 1995, p. 89.
  20. BILLINGSLEY P., SINDEN R. Determinants of Malaria-Mosquito Specificity. *Parasitol. Today* 1997, 13, 297-301.
  21. BLANFORD S., CHAN B. H., JENKINS N., SIM D., TURNER R. J., READ A. F., THOMAS M. B. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 2005, 308 (5728), 1638-41.
  22. BOETE C. Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. *Trends Parasitol*, 2005, 21 (10), 445-7.
  23. BRAGINETS O. P., MINAKAWA N., MBOGO C. M., YAN G. Population genetic structure of the African malaria mosquito *Anopheles funestus* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69 (3), 303-8.

24. BROOKE B. D., KLOKE G., HUNT R. H., KOEKEMOER L. L., TEMU E. A., TAYLOR M. E., SMALL G., HEMINGWAY J., COETZEE M. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 2001, 91 (4), 265-272.
25. BRUN A., CUANY A., LE MOUËL T., BERGE J., AMICHOT M. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem Mol Biol*, 1996, 26 (7), 697-703.
26. CHANDRE F., DABIRE R. K., HOUGARD J. M., DJOGBENOU L. S., IRISH S. R., ROWLAND M., N'GUESSAN R. Field efficacy of pyrethroid treated plastic sheeting (durable lining) in combination with long lasting insecticidal nets against malaria vectors. *Parasit Vectors*, 2010, 3 (1), 65.
27. CHANDRE F., DARRIET F., MANGUIN S., BRENGUES C., CARNEVALE P., GUILLET P. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae s.s.* from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc*, 1999, 15 (1), 53-9.
28. CHOUAIBOU M., ETANG J., BREVAULT T., Nwane P., HINZOUNBE C. K., MIMPFOUNDI R., SIMARD F. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae s.l.* from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop Med Int Health*, 2008, 13 (4), 476-86.
29. COHUET A., DIA I., SIMARD F., RAYMOND M., FONTENILLE D. Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data. *Insect Mol Biol*, 2004, 13 (3), 251-8.
30. COHUET A., DIA I., SIMARD F., RAYMOND M., ROUSSET F., ANTONIO NKONDJIO C., AWONO AMBENE P. H., WONDJI C. S., FONTENILLE D. Gene flow between chromosomal forms of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon, Central Africa, and its relevance in malaria fighting. *Genetics*, 2005, 169 (1), 301-311.
31. COHUET A., KRISHNAKUMAR S., SIMARD F., MORLAIS I., KOUTSOS A., FONTENILLE D., MINDRINOS M., KAFATOS F. C. SNP discovery and molecular evolution in *Anopheles gambiae*, with special emphasis on innate immune system. *BMC Genomics*, 2008, 9, 227.
32. COHUET A., OSTA M. A., MORLAIS I., AWONO-AMBENE P. H., MICHEL K., SIMARD F., CHRISTOPHIDES G. K., FONTENILLE D., KAFATOS F. C. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep*, 2006, 7 (12), 1285-9.

33. COHUET A., SIMARD F., BERTHOMIEU A., RAYMOND M., FONTENILLE D., ET AL. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol. Ecol. Notes*, 2002, 2, 498-500.
34. COHUET A., SIMARD F., TOTO J. C., KENGNE P., COETZEE M., FONTENILLE D. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69 (2), 200-5.
35. CORBEL V., CHANDRE F., BRENGUES C., AKOGBÉTO M., LARDEUX F., HOUGARD J. M., 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 (1), 22.
36. CORBEL V., CHANDRE F., DARRIET F., LARDEUX F., HOUGARD J. M. Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med Vet Entomol*, 2003, 17 (2), 158-64.
37. CORBEL V., DARRIET F., CHANDRE F., HOUGARD J. M. Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite*, 2002, 9 (3), 255-9.
38. CORBEL V., N'GUESSAN R., BRENGUES C., CHANDRE F., DJOGBENOU L., MARTIN T., AKOGBÉTO M., HOUGARD J. M., ROWLAND M. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*, 2007, 101 (3), 207-16.
39. CORNEL A. J., COLLINS F. H. . PCR of the ribosomal DNA intergenic spacer regions as a method for identifying mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Methods Mol. Biol.*, 1996, 50, 321-332.
40. CORNUET J.M. , LUIKART G. . Description and poweranalysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 1996, 144, 2001-2014.
41. COURJARET R., GROLEAU F., LAPIED B. Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci*, 2003, 17 (10), 2023-34.
42. CRAMPTON J. M., COMLEY I., EGGLESTON P., HILL S., HUGHES M., KNAPP T., LYCETT G., URWIN R., WARREN A. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1992, 87 (3), 43-9.
43. CUANY A., HANDANI J., BERGE J., FOURNIER D., RAYMOND M., GEORGHIOU G. P., PASTEUR N. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes. *Pestic. Biochem. & Physiol*, 1993, 45 (1), 1-6.



44. CURTIS C. F. Impregnated bednets, malaria control and child mortality in Africa. *Trop Med Int Health*, 1996, 1 (2), 137-8.
45. CYRANOSKI D. Sterile mosquitoes near take-off. *Nature*, 2008, 453 (7194), 435.
46. DABIRE K. R., DIABATE A., DJOGBENOU L., OUARI A., N'GUESSAN R., OUEDRAOGO J. B., HOUGARD J. M., CHANDRE F., BALDET T. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J*, 2008, 7, 188.
47. DARRIET F., GUILLET P., CHANDRE F., N'GUESSAN R., DOANNIO J. M. C., RIVIERE F., CARNEVALE P. Présence et évolution de la résistance aux pyréthrinoides et au DDT chez deux populations de *Anopheles gambiae* s.s. d'Afrique de l'Ouest. In: WHO/CTD/VBC/97.1001, WHO/MAL/97.1081. *World Health Organization, WHO/CTD/VBC/97.1001, WHO/MAL/97.1081*, 1997, 15 p.
48. DARRIET F., GUILLET P., N'GUESSAN R., DOANNIO J. M., KOFFI A., KONAN L. Y., CARNEVALE P. [Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets]. *Med Trop (Mars)*, 1998, 58 (4), 349-54
49. DARRIET F., N' GUESSAN R., KOFFI A. A., KONAN L., DOANNIO J. M. C., CHANDRE F., CARNEVALE P. Impact of the resistance to pyrethroids on the efficacy of impregnated bednets used as a means of prevention against malaria: results of the evaluation carried out with deltamethrin SC in experimental huts. *Bull Soc Pathol Exot*, 2000, 93 (2), 131-134.
50. DARRIET F., N'GUESSAN R., HOUGARD J. M., TRAORE-LAMIZANA M., CARNEVALE P. An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts. *Bull Soc Pathol Exot*, 2002, 95 (4), 299-303
51. DAWSON K. J., BELKHIR K. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genet Res*, 2001, 78 (1), 59-77.
52. DETINOVA T. S. Determination of the physiological age of female anopheles from the change of the tracheal system of the ovaries. *Med. Parazit. (Mosk.)*, 1945, 14, 45
53. DI RIENZO A, PETERSON A.C, GARZA J.C, VALDES A.M, SLATKIN M Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 3166-3170.
54. DIABATE A., CHANDRE F., ROWLAND M., N'GUESSAN R., DUCHON S., DABIRE K. R., HOUGARD J. M. The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors. *Trop Med Int Health*, 2006, 11 (5), 597-603.

55. DIMOPOULOS G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol*, 2003, 5 (1), 3-14.
56. DJÈNONTIN A., BIO-BANGANA S., MOIROUX N., HENRY M. C., 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*, 2010b, 3, 83.
57. DJÈNONTIN A., CHABI J., BALDET T., IRISH S., PENNETIER C., HOUGARD J. M., CORBEL V., AKOGBÉTO M., CHANDRE F. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J*, 2009, 8, 233.
58. DJÈNONTIN A., CHANDRE F., DABIRÉ K. R., CHABI J., N'GUESSAN R., BALDET T., AKOGBÉTO M., CORBEL V. The Indoor Use of Plastic Sheeting Impregnated with Carbamate in Combination with Long Lasting Insecticidal Mosquito Nets for the Control of Pyrethroid-resistant Malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2010a, 83 (2), 266–270.
59. DJOGBENOU L., DABIRE R., DIABATE A., KENGNE P., AKOGBÉTO M., HOUGARD J. M., CHANDRE F. Identification and geographic distribution of the *ace I<sup>R</sup>* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78 (2), 298-302.
60. DJOUAKA R. F., BAKARE A. A., COULIBALY O. N., AKOGBÉTO M. C., RANSON H., HEMINGWAY J., STRODE C. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*, 2008, 9, 538.
61. DOGAN E. B., AYRES J. W., ROSSIGNOL P. A. Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. *Med Vet Entomol*, 1999, 13 (1), 97-100.
62. EDWARDS FW Mosquitoes of the Ethiopian Region III. Culicine adults and pupae. *British Museum (Nat Hist), London*, 1941.
63. ELISSA N., MOUCHET J., RIVIERE F., MEUNIER J. Y., YAO K. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med Trop*, 1993, 73 (4), 291-4.
64. ESTOUP A., JARNE P., CORNUET J. M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol Ecol*, 2002, 11 (9), 1591-604.

65. ETANG J., MANGA L., CHANDRE F., GUILLET P., FONDJO E., MIMPFUNDI R., TOTO J. C., FONTENILLE D. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J Med Entomol*, 2003, 40 (4), 491-7.
66. EVANS R. G. Laboratory evaluation of irritancy of bendiocarb, lambda cyhalothrin and DDT to *Anopheles gambiae*. *J Am Mosq Cont Assoc* 1993, 9 (3), 285-293.
67. FANELLO C., KOLACZINSKI J. H., CONWAY D. J., CARNEVALE P., CURTIS C. F. The kdr pyrethroid resistance gene in *Anopheles gambiae*: tests of non-pyrethroid insecticides and a new detection method for the gene. *Parassitologia*, 1999, 41 (1-3), 323-6.
68. FARENHORST M., MOUATCHO J. C., KIKANKIE C. K., BROOKE B. D., HUNT R. H., THOMAS M. B., KOEKEMOER L. L., KNOLS B. G., COETZEE M. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (41), 17443-7.
69. 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 Molecular Biology*, 2001, 10 (1), 19-23.
70. FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIAGNE N., SOKHNA C., LEMASSON J. J., DIATTA M., KONATE L., FAYE F., ROGIER C., TRAPE J. F. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56 (3), 247-53.
71. FONTENILLE D., SIMARD F. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004, 27 (5), 357-75.
72. FOURNIER D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact*, 2005.
73. FUMAGALLI L., SNOJ A., JESENSEK D., BALLOUX F., JUG T., DURON O., BROSSIER F., CRIVELLI A. J., BERREBI P. Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Mol Ecol*, 2002, 11 (12), 2711-6.
74. GILLIES MT, COETZEE M. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *Publications of the South African Institute for Medical Research 55. SAIMR, Johannesburg*, 1987.
75. GILLIES MT, DE MEILLON B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. Publication of the South African Institute of Medical. *Research*, 1968, 54, 343.

76. GOLDSTEIN D. B., RUIZ LINARES A., CAVALLI-SFORZA L. L., FELDMAN M. W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 1995, 139 (1), 463-71.
77. GOUDET J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *J Hered*, 1995, 86, 485-486.
78. GUILLET P., N'GUESSAN R., DARRIET F., TRAORE-LAMIZANA M., CHANDRE F., CARNEVALE P. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol*, 2001, 15 (1), 105-12.
79. HAMON J. Contribution à l'étude des Culicidés de la région de Porto-Novo (Bas-Dahomey). *Ann. parasitologie*, 1954, T. XXIX, n° 5-6.
80. HARGREAVES K., HUNT R. H., BROOKE B. D., MTHEMBU J., WEETO M. M., AWOLOLA T. S., COETZEE M. *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in South Africa. *Med Vet Entomol*, 2003, 17 (4), 417-22.
81. HARGREAVES K., KOEKEMOER L. L., BROOKE B. D., HUNT R. H., MTHEMBU J., COETZEE M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol*, 2000, 14 (2), 181-189.
82. HELINSKI M. E., HASSAN M. M., EL-MOTASIM W. M., MALCOLM C. A., KNOLS B. G., EL-SAYED B. Towards a sterile insect technique field release of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: irradiation, transportation, and field cage experimentation. *Malar J*, 2008, 7 (1), 65.
83. HEMINGWAY J., KARUNARATNE S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol*, 1998, 12 (1), 1-12.
84. HENRY M. C., ASSI S. B., ROGIER C., DOSSOU-YOVO J., CHANDRE F., GUILLET P., CARNEVALE P. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*, 2005, 73 (5), 859-64.
85. HOUGARD J. M., CORBEL V., N'GUESSAN R., DARRIET F., CHANDRE F., AKOGBÉTO M., BALDET T., GUILLET P., CARNEVALE P., TRAORE-LAMIZANA M. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res*, 2003, 93 (6), 491-8.

86. HOUGARD J. M., FONTENILLE D., CHANDRE F., DARRIET F., CARNEVALE P., GUILLET P. Combating malaria vectors in Africa: current directions of research. *Trends in Parasitology*, 2002, 18 (7), 283-286.
87. HUNT R. H., BROOKE B. D., PILLAY C., KOEKEMOER L. L., COETZEE M. Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Med Vet Entomol*, 2005, 19 (3), 271-5.
88. HUTTEL J. Note sur la repartition des moustiques dans le Bas-Dahomey. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1950, 43, n° 9-10, 563-566.
89. KERAH-HINZOUNBE C., PEKA M., Nwane P., DONAN-GOUNI I., ETANG J., SAME-EKOBO A., SIMARD F. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from south-western Chad, Central Africa. *Malar J*, 2008, 7, 192.
90. KINDE-GAZARD D, GBENOU D, TOHON C, DA SILVA C, NAHUM A, MASSOUGBODJI A. Indicateurs de suivi et d'évaluation en 2001 de l'initiative « Faire reculer le paludisme » au Bénin. *Bull Soc Pathol Exot*, 2004, 97, 349-352.
91. KISZEWSKI A., MELLINGER A., SPIELMAN, MALANEY P., SACHS E., SACHS J. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 70, 486-98.
92. KLASSEN W. Introduction: development of the sterile insect technique for African malaria vectors. *Malar J*, 2009, 8 Suppl 2, 11.
93. KNOLS B. G., BOSSIN H. C., MUKABANA W. R., ROBINSON A. S. Transgenic mosquitoes and the fight against malaria: managing technology push in a turbulent GMO world. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77 (6 Suppl), 232-42.
94. KOEKEMOER L. L., KAMAU L., HUNT R. H., COETZEE M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 66 (6), 804-11.
95. LANZARO G. C., ZHENG L., TOURE Y. T., TRAORE S. F., KAFATOS F. C., VERNICK K. D. Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*, 1995, 4 (2), 105-12.
96. LAPIED B., PENNETIER C., APAIRE-MARCHAIS V., LICZNAR P., CORBEL V. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol*, 2009, 27 (4), 190-8.
97. LAVIALLE-DEFAIX C., MOIGNOT B., LEGROS C., LAPIED B. How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated

- JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333 (1), 264-72.
98. LENGELER C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria (Review). *The Cochrane Library* 2008, (Issue 3).
  99. LOUISE A., KELLY-HOPE L., ELLIS MCKENZIE F. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J* 2009, 8:19
  100. LYIMO I. N., FERGUSON H. M. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol*, 2009, 25 (4), 189-96.
  101. LYSENKO A. J. A., BELJAEV A. E. An analysis of the geographical distribution of *Plasmodium ovale*. *Bull WHO*, 1969, 40, 383-394.
  102. MAHARAJ R., CASIMIRO S., MTHEMBU S. D., SHARP B. L. The residual life of bendiocarb: a field-based evaluation from Mozambique. *J Med Entomol*, 2004, 41 (1), 130-2.
  103. MALCOLM C. A. Current status of pyrethroid resistance in anophelines. *Parasitol Today*, 1988, 4 (7), S13-5.
  104. MALIMA R. C., OXBOROUGH R. M., TUNGU P. K., MAXWELL C., LYIMO I., MWINGIRA V., MOSHA F. W., MATOWO J., MAGESA S. M., ROWLAND M. W. Behavioural and insecticidal effects of organophosphate-, carbamate- and pyrethroid-treated mosquito nets against African malaria vectors. *Med Vet Entomol*, 2009, 23 (4), 317-25.
  105. MARRELLI M. T., LI C., RASGON J. L., JACOBS-LORENA M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (13), 5580-3.
  106. MARTINEZ TORRES D., CHANDRE F., WILLIAMSON M. S., DARRIET F., BERGE J. B., DEVONSHIRE A. L., GUILLET P., PASTEUR N., PAURON D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 1998, 7 (2), 179-184.
  107. MATOVU F., GOODMAN C., WISEMAN V., MWENGEE W. How equitable is bed net ownership and utilisation in Tanzania? A practical application of the principles of horizontal and vertical equity. *Malar J*, 2009, 8, 109.
  108. MBOGO C. M., MWANGANGI J. M., NZOVU J., GU W., YAN G., GUNTER J. T., SWALM C., KEATING J., REGENS J. L., SHILILU J. I., GITHURE J. I., BEIER J. C. Spatial and temporal heterogeneity of *Anopheles* mosquitoes and *Plasmodium falciparum* transmission along the Kenyan coast. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 68 (6), 734-42.

109. MBOGO C. N., KABIRU E. W., GLASS G. E., FORSTER D., SNOW R. W., KHAMALA C. P., OUMA J. H., GITHURE J. I., MARSH K., BEIER J. C. Vector-related case-control study of severe malaria in Kilifi District, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60 (5), 781-5.
110. MENDIS K., SINA B. J., MARCHESINI P., CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 64 (1-2), 97-106.
111. MICHEL A. P., GUELBEOGO W. M., GRUSHKO O., SCHEMERHORN B. J., KERN M., WILLARD M. B., SAGNON N., COSTANTINI C., BESANSKY N. J. Molecular differentiation between chromosomally defined incipient species of *Anopheles funestus*. *Insect Mol Biol*, 2005, 14 (4), 375-87.
112. MINAKAWA N., GITHURE J. I., BEIER J. C., YAN G. Anopheline mosquito survival strategies during the dry period in Western Kenya. *J Med Entomol*, 2001, 38 (3), 388-392.
113. MINISTERE DE LA SANTE DE LA REPUBLIQUE DU BENIN. Annuaire des statistiques sanitaires *SNIGS/DPP/MS*, 2007, 248 p.
114. MOUCHES C., PAUPLIN Y., AGARWAL M., LEMIEUX L., HERZOG M., ABADON M., BEYSSAT ARNAOUTY V., HYRIEN O., ROBERT DE SAINT VINCENT B., GEORGHIOU G. P., PASTEUR N., SAINT VINCENT B. R. DE, VINCENT B. R. DE SAINT, ARNAOUTY V. BEYSSAT. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87 (7), 2574-2578.
115. MOUCHET J. [DDT and public health]. *Sante*, 1994, 4 (4), 257-62
116. MOUCHET J. Mini-Review: agriculture and Vector Resistance. *Insect Sci. Applic.*, 1988, 9 (3), 291-302.
117. MOUCHET J., CARNEVALE P., JULVEZ J., MANGUIN S., RICHARD-LENOBLE D., SIRCOULON J. Biodiversité du paludisme dans le monde. *John Libbey Eurotext, Paris*, 2004, 428
118. MULLER G. C., BEIER J. C., TRAORE S. F., TOURE M. B., TRAORE M. M., BAH S., DOUMBIA S., SCHLEIN Y. Field experiments of *Anopheles gambiae* attraction to local fruits/seedpods and flowering plants in Mali to optimize strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods. *Malar J*, 2010, 9 (1), 262.
119. 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 (2), 199-206.

120. NAJERA J. A. Malaria control: achievements, problems and strategies. *Parassitologia*, 2001, 43 (1-2), 1-89.
121. NASSIR E., ABDEL-MUHSIN A. M., SULIAMAN S., KENYON F., KHEIR A., GEHA H., FERGUSON H. M., WALLIKER D., BABIKER H. A. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol*, 2005, 35 (1), 49-55.
122. NIELSEN R. Molecular signatures of natural selection. *Annu Rev Genet*, 2005, 39, 197-218.
123. Nwane P., Etang J., Chouaibou M., Toto J. C., Kerah-Hinzoumbe C., Mimpfoundi R., Awono-Ambene H. P., Simard F. Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infect Dis*, 2009, 9, 163.
124. PAYNE C. D. The GLIM System Release 3.77 Manual. *Numerical Algrithm Group Ltd, Oxford*, 1987.
125. PENILLA R. P., RODRIGUEZ A. D., HEMINGWAY J., TORRES J. L., SOLIS F., RODRIGUEZ M. H. Changes in glutathione S-transferase activity in DDT resistant natural Mexican populations of *Anopheles albimanus* under different insecticide resistance management strategies. *Pestic. Biochem. & Physiol*, 2006, 86 (2), 63-71.
126. PENNETIER C., CORBEL V., BOKO P., ODJO A., N'GUESSAN R., LAPIED B., HOUGARD J. M. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J*, 2007, 6, 38.
127. PENNETIER C., COSTANTINI C., CORBEL V., LICCIARDI S., DABIRE R. K., LAPIED B., CHANDRE F., HOUGARD J. M. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14 (11), 1707-14.
128. PENNETIER C., COSTANTINI C., CORBEL V., LICCIARDI S., DABIRE R. K., LAPIED B., CHANDRE F., HOUGARD J. M. Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS ONE*, 2009, 4 (11), e7896.
129. PRAPANTHADARA L., HEMINGWAY J., KETTERMAN A. J. DDT-resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera :Culicidae) from Zinzibar, Tanzania based on increased DDT-deshydrochlorinase activity of glutathion-S-transferases. *Bull Entomol Res*, 1995a, 85, 267-274.



130. PRAPANTHADARA L., HEMINGWAY J., KETTERMAN A. J. Partial purification and characterization of Glutathion-S-Transferase involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, 1995b, 47, 119-133.
131. PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000, 155, 945-959.
132. PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME AU BENIN. Politique nationale de lutte contre le paludisme et cadre stratégique de mise en œuvre. *MSP Cotonou Bénin*, 2005, 50p.
133. RANSON H., JENSEN B., VULULE J. M., WANG X., HEMINGWAY J., COLLINS F. H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 2000, 9 (5), 491-497.
134. RAYMOND M., ROUSSET F. GENEPOP Version 1.2, a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 1995, (26), 248-249.
135. READ A. F., LYNCH P. A., THOMAS M. B. How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol*, 2009, 7 (4), e1000058.
136. RODHAIN F., PEREZ C. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. *Paris, France*, 1985, 458p.
137. SANTOLAMAZZA F., CALZETTA M., ETANG J., BARRESE E., DIA I., CACCONE A., DONNELLY M. J., PETRARCA V., SIMARD F., PINTO J., DELLA TORRE A. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J*, 2008, 7 (1), 74.
138. SCHOLTE E. J., NG'HABI K., KIHONDA J., TAKKEN W., PAAIJMANS K., ABDULLA S., KILLEEN G. F., KNOLS B. G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 2005, 308 (5728), 1641-2.
139. SCOTT J. A., BROGDON W. G., COLLINS F. H. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 49 (4), 520-9.
140. SERVICE M. Mosquito ecology field sampling methods. *Elsevier Applied Science New York*, 1993, ( 2nd ed).
141. SHARAKHOV I., BRAGINETS O., GRUSHKO O., COHUET A., GUELBEOGO W. M., BOCCOLINI D., WEILL M., COSTANTINI C., SAGNON N., FONTENILLE D., YAN G., BESANSKY N. J. A microsatellite map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. *J Hered*, 2004, 95 (1), 29-34.

142. SIEGERT P. Y., WALKER E., MILLER J. R. Differential behavioral responses of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) modulate mortality caused by pyrethroid-treated bednets. *J Econ Entomol*, 2009, 102 (6), 2061-71.
143. SIMARD F., FONTENILLE D., LEHMANN T., GIROD R., BRUTUS L., GOPAUL R., DOURNON C., COLLINS F. H. High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60 (6), 1000-9.
144. SINKINS S. P., HACKETT B. J., COSTANTINI C., VULULE J., LING Y. Y., COLLINS F. H., BESANSKY N. J. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol*, 2000, 9 (4), 490-2.
145. SKARBINSKI J., MASSAGA J. J., ROWE A. K., KACHUR S. P. Distribution of free untreated bednets bundled with insecticide via an integrated child health campaign in Lindi Region, Tanzania: lessons for future campaigns. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76 (6), 1100-6.
146. SLOTMAN M. A., TRIPET F., CORNEL A. J., MENESES C. R., LEE Y., REIMER L. J., THIEMANN T. C., FONDJO E., FOFANA A., TRAORE S. F., LANZARO G. C. Evidence for subdivision within the M molecular form of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*, 2007, 16 (3), 639-49.
147. SNOW R. W., GUERRA C. A., NOOR A. M., MYINT H. Y., HAY S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2005, 434 (7030), 214-7.
148. STALLINGS R. L. Conservation and evolution of (CT)<sub>n</sub>/(GA)<sub>n</sub> microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. *Genomics*, 1995, 25 (1), 107-13.
149. THANY S. H., LENAERS G., RAYMOND-DELPECH V., SATTELLE D. B., LAPIED B. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28 (1), 14-22.
150. THWING J, HOCHBERG N, VANDEN ENG J, ISSIFI S, ELIADES MJ, MINKOULOU E, WOLKON A, GADO H, IBRAHIM O, NEWMAN RD, LAMA M. Insecticide-treated net ownership and usage in Niger after a nationwide integrated campaign. *Trop Med Int Health*, 2008, 13 (6), 827-34.
151. TOE L. P., SKOVMAND O., DABIRE K. R., DIABATE A., DIALLO Y., GUIGUEMDE T. R., DOANNIO J. M., AKOGBÉTO M., BALDET T., GRUENAI S. M. E. Decreased motivation

- in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. *Malar J*, 2009, 8, 175.
152. VULULE J M. Elevated oxydase and esterase levels associated with permethrine tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrine-impregnated net. *Med Vet Entomol*, 1999, 13, 239-244.
  153. WANG J., NGUYEN V., GLEN J., HENDERSON B., SAUL A., MILLER L. H. Improved yield of recombinant merozoite Surface protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* using chemically defined media. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90 (7), 838-47.
  154. WEBER J. L., MAY P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 1989, 44 (3), 388-96.
  155. 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), 1-7.
  156. WHITE B. J., HAHN M. W., POMBI M., CASSONE B. J., LOBO N. F., SIMARD F., BESANSKY N. J. Localization of candidate regions maintaining a common polymorphic inversion (2La) in *Anopheles gambiae*. In: PLoS genetics. *PLoS Genet*, 2007, 3 (12), e217.
  157. WHO. Evaluation de la santé. *Rapport sur la Santé dans le monde. La vie au 21è siècle, une perspective pour tous*, World Health Organisation (ed), Genève Suisse, 1998, 43-65.
  158. WHO. Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). *WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP*, 2006, 3.
  159. WHO. Guidelines for the treatment of malaria. *Geneva: World Health Organization*, 2006, 253 p.
  160. WHO. Report of the twelfth WHOPES Working group meeting. *WHO/HTM/NTD/WHOPES*, 2009, 1.
  161. WHO. Report on the Tenth WHOPES working Group Meeting. *World Health Organisation, Geneva, WHO/CDS/NTD/WHOPES/2007.1.*, 2007.
  162. WHO. Resistance of disease vectors to pesticides. 1976, WHO/VBC/ 76.609 10 pp.
  163. WHO. World Malaria Report 2010.
  164. WHO. The world malaria report 2005. *Geneva, World Health Organization*, 2005, Available: <http://rbm.who.int/wmr2005/>.

165. WILKES T. J., MATOLA Y. G., CHARLWOOD J. D. *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Med Vet Entomol*, 1996, 10 (1), 108-10.
166. WIRTZ R.A., ZAVALA F., CHAROENVIT Y., CAMPBELL G.H., BURKOT TR., SCHNEIDER I., ESSER K.M., BEAUDOIN R.L., ANDRE R.G. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ* 1987, 65 39-45.
167. WONDJI C. S., HUNT R. H., PIGNATELLI P., STEEN K., COETZEE M., BESANSKY N., LOBO N., COLLINS F. H., HEMINGWAY J., RANSON H. An integrated genetic and physical map for the malaria vector *Anopheles funestus*. *Genetics*, 2005, 171 (4), 1779-87.
168. WONDJI C., SIMARD F., LEHMANN T., FONDJO E., SAME-EKOBO A., FONTENILLE D. Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. *Mol Ecol*, 2005, 14 (12), 3683-93.
169. YADOLETON A. W., ASIDI A., DJOUAKA R. F., BRAIMA J., AGOSSOU C. D., AKOGBÉTO M. C. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J*, 2009, 8, 103.
170. YADOLETON A. W., PADONOU G., ASIDI A., MOIROUX N., BIO-BANGANNA S., CORBEL V., N'GUESSAN R., GBENOU D., YACOUBOU I., GAZARD K., AKOGBÉTO M. C. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J*, 2010, 9, 83.
171. ZAIM M., AITIO A., NAKASHIMA N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol*, 2000, 14 (1), 1-5.

## Annexe 1 : Curriculum Vitae

# Curriculum Vitae

## Etat Civil

**Nom** : DJENONTIN

**Prénoms** : Tognihou Armel

**Date et lieu de naissance** : 16 août 1973 à Covè

**Nationalité** : Béninoise

**Situation matrimoniale** : Marié, 2 enfants

**Téléphone** : (00229)97608376/(00229)94117086

**E-mail** : [armel.djenontin@ird.fr](mailto:armel.djenontin@ird.fr), [armeldj@yahoo.fr](mailto:armeldj@yahoo.fr)

**Domicile** : Carré S/B Ahossougbéta/Togba, Abomey-Calavi

## Cursus Scolaire et Universitaire

**2011** : Thèse de Doctorat à l'Université d'Abomey-Calavi, Mention Très Honorable avec Félicitations du Jury, « Stratégies de gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme et impact opérationnel en Afrique de l'Ouest »

**2007** : Master International en Entomologie Médicale et Vétérinaire à l'Université d'Abomey-Calavi, Mention Bien, « Stratégie de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme : association d'un support traité avec le bendiocarb avec les moustiquaires imprégnées »

**2002** : Certificat d'Aptitude au Professorat de l'Enseignement Secondaire option Biologie-Géologie Mention Bien « Les grossesses non désirées en milieu scolaire : causes, conséquences, et approches de solution : cas du Collège d'Enseignement Général d'Abomey-Calavi »

**1997** : Maitrise ès Sciences Naturelles à l'Université d'Abomey-Calavi

**1996** : Licence ès Sciences Naturelles à l'Université d'Abomey-Calavi

**1995** : DUES II Chimie Biologie Géologie à l'Université d'Abomey-Calavi

**1992** : Baccalauréat série D au CEG de Covè

**1988** : Brevet d'Etude du Premier Cycle au CEG Covè

**1984** : Certificat Elémentaire de Fin d'Etude de Base à l'Ecole Primaire Publique de Gounli, Covè

#### Autres formations

**2008** : Diplôme Universitaire en Méthodes Statistiques en Santé, à L'Institut de Santé Publique, d'Épidémiologie et de Développement, Université Victor Segalen Bordeaux 2

**2010** : Formation en statistique sur le logiciel R au campus international de recherche de l'Université Cheick Anta Diop de Dakar, Sénégal

#### Cursus professionnel

**2007-2011** : Stage de recherches au Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CERC) au Bénin et au Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN) en France

**1997-2006** : Enseignement de Biologie dans les Collèges d'Enseignement Secondaire

#### Domaines de compétences

Evaluation des outils de lutte anti vectorielle (phases I, II, et III)

Echantillonnage et identification des moustiques

Mesure de la transmission du paludisme

Génétique de la résistance aux insecticides des vecteurs, stratégies de lutte antivectorielle et de gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs

Statistique

## Régions d'expérience

Afrique : Bénin (longue durée), Côte d'Ivoire, Togo, Nigéria, Ghana, Burkina Faso, Sénégal, Kenya (courtes durées)

Europe : France (Montpellier) (longue durée), Espagne (courte durée), Belgique (courte durée)

Amérique : Etats-Unis (Washington) (courte durée)

## Expertises

Reviewer pour le journal *Parasites & Vectors*

## Publications scientifiques

1. **Djènontin A**, S. Bio Bangana, N. Moiroux, M-C Henry, O. Bousari, J. Chabi, R. Osse, S. Koudenoukpo, V. Corbel, M. Akogbeto, F. Chandre. ***Culicidae* diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study.** *Parasites & vectors* 2010, **3**:83
2. **Djènontin A.**, F. Chandre, Dabire R, J. Chabi, T. Baldet, J.-M. Hougard, M. Akogbeto, V. Corbel. **Indoor use of carbamate treated plastic sheetings in combination with impregnated bed nets to better control pyrethroid-resistant malaria vectors.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, 83 (2)
3. **Djènontin A**, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, J.M. Houagrd, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F. **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets** *Malaria Journal* 2009, **8**:233
4. Georgia B Damien, **Armel Djènontin**, Christophe Rogier, Vincent Corbel, Sahabi B Bangana, Fabrice Chandre, Martin Akogbéto, Dorothée Kindé-Gazard, Achille Massougbodji, Marie-Claire Henry. **Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin.** *Malaria Journal* 2010, **9**:380



5. Nicolas Moiroux, Olayidé Bousari, **Armel Djènantin**, Georgia Damien, Gilles Cottrell, Marie-Claire Henry, Hélène Guis, Vincent Corbel. **Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin, West Africa.** *Submitted in Emerging Infectious diseases*
6. **Djènantin A.**, R. Osse, J. Chabi, V. Corbel, M. Akogbeto, F. Chandre. **Malaria vectors behavihour in response to community use of LLIN alone or in combination with ITPS or IRS.** *In prep.*
7. **Djènantin A.**, D. Ayala, R. Osse, J. Chabi, V. Corbel, M. Akogbeto, F. Chandre. **Impact of vector control strategies on the genetic structure of *Anopheles funestus* in Benin, West Africa.** *In prep*


#### Conférences scientifiques

1. **Djènantin A.**, Damien B.G., Henry M-C, Chandre F., Rogier C., Osse R., Chabi J., Akogbéto M, Corbel V. Évaluation communautaire de stratégies de lutte anti vectorielle contre le paludisme combinant deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations : Étude post intervention. **Symposium international « Paludisme et Trypanosomose Humaine Africaine: nouvelles stratégies de prévention et de contrôle » Palais des Congrès de Cotonou (Bénin), 07 et 08 octobre 2010. Communication orale**
2. Damien B.G., **Djènantin A.**, Henry M-C, Chandre F., Rogier C., Osse R., Chabi J., Akogbéto M, Corbel V. Gestion de la résistance des vecteurs du paludisme au Sud Bénin : évaluation communautaire de stratégies combinant deux traitements insecticides résiduels à l'intérieur des habitations. **Symposium international « Paludisme et Trypanosomose Humaine Africaine: nouvelles stratégies de prévention et de contrôle » Palais des Congrès de Cotonou (Bénin), 07 et 08 octobre 2010. Communication orale**
3. **Djènantin A.**, Chandre F., Osse R., Chabi J., Akogbeto M., Corbel V. Usage communautaire des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD) en combinaison avec des bâches plastiques murales imprégnées de bendiocarb (BPIB) pour la gestion de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme. **VII**

**Conférence Internationale Francophone d'Entomologie, 5 au 10 juillet 2010 à Louvain-la-Neuve (Belgique). *Communication Orale***

4. **Djènontin A.**, F. Chandre, Dabire R., J. Chabi, T. Baldet, J.-M. Hougard, M. Akogbeto, V. Corbel. Indoor use of carbamate treated plastic sheeting in combination with long lasting insecticidal nets to control pyrethroid resistant malaria vectors in West Africa. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58<sup>th</sup> Annual Meeting, November 18-22, 2009, Marriott Wardman Park in Washington, DC. *Communication Orale***
5. **Djènontin A.** F. Chandre, Dabire R., J. Chabi, T. Baldet, J.-M. Hougard, M. Akogbeto, V. Corbel. Indoor use of carbamate treated plastic sheeting in combination with long lasting insecticidal nets to control pyrethroid resistant malaria vectors. **Fifth MIM Pan-African Malaria Conference, 2-6 November 2009, Nairobi, Kenya, *Communication Orale***
6. **Djènontin A.**, Chandre F., Baldet T., Hougard J.M., Akogbeto M. Gestion de la résistance aux insecticides des vecteurs du paludisme : association d'un support traité avec un carbamate avec les moustiquaires. Conférence international du CIRDES, 24-27 Novembre 2008, IRSP, Ouidah, Bénin. ***Communication Orale.***
7. **Djènontin A.**, Chandre F., Osse R., Chabi J., Akogbeto M., Corbel V. Community use of Long Lasting Insecticidal Net in combination with Carbamate Treated Plastic Sheeting for insecticide resistance management in malaria vectors. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene 59th Annual Meeting November, 3-7, 2010 Atlanta Marriott Marquis Atlanta, Georgia USA. *Poster***
8. Ossè R., **Djènontin A.**, Chabi J., Corbel V., Chandre F. et Akogbéto M. Comportement des anophèles en présence des moustiquaires imprégnées de deltaméthrine et/ou des supports imprégnés de bendiocarb à l'échelle communautaire. **Symposium international « Paludisme et Trypanosomose Humaine Africaine: nouvelles stratégies de prévention et de contrôle » Palais des Congrès de Cotonou (Bénin), 07 et 08 octobre 2010. *Poster***

9. Bio Bangana AS, **Djènontin A**, F. Chandre, V. Corbel, J. Chabi, R. Osse, S. Koudénoukpo, M. Boko, MC. Akogbéto. Characterization of mosquito fauna in Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito Sanitary Zone in Benin (West Africa). **Fifth MIM Pan-African Malaria Conference, 2-6 November 2009, Nairobi, Kenya, Poster**
10. Damien BG, **Djènontin A**, Chandre F, Corbel V, Akogbéto M, Kindé-Gazard D, Henry M-C. Malaria situation in southern Benin after the national ITNs distribution. **Fifth MIM Pan-African Malaria Conference, 2-6 November 2009, Nairobi, Kenya, Poster**



## Annexe 2 : Articles

Research

Open Access

## Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets

Armel Djènontin<sup>1,2</sup>, Joseph Chabi<sup>2</sup>, Thierry Baldet<sup>2</sup>, Seth Irish<sup>4</sup>,  
Cédric Pennetier<sup>3</sup>, Jean-Marc Hougard<sup>2</sup>, Vincent Corbel<sup>\*2</sup>, Martin Akogbéto<sup>1</sup>  
and Fabrice Chandre<sup>3</sup>

Address: <sup>1</sup>CREC, Cotonou, Bénin, <sup>2</sup>CREC/IRD UR016, Cotonou, Bénin, <sup>3</sup>LIN/IRD UR016, Montpellier, France and <sup>4</sup>London School of Tropical Medicine and Hygiene, London, UK

Email: Armel Djènontin - [armeldj@yahoo.fr](mailto:armeldj@yahoo.fr); Joseph Chabi - [joseph.chabi@ird.fr](mailto:joseph.chabi@ird.fr); Thierry Baldet - [thierry.baldet@ird.fr](mailto:thierry.baldet@ird.fr); Seth Irish - [seth.irish@lshtm.ac.uk](mailto:seth.irish@lshtm.ac.uk); Cédric Pennetier - [c.pennetier@sussex.ac.uk](mailto:c.pennetier@sussex.ac.uk); Jean-Marc Hougard - [jean-marc.hougard@ird.fr](mailto:jean-marc.hougard@ird.fr); Vincent Corbel\* - [vincent.corbel@ird.fr](mailto:vincent.corbel@ird.fr); Martin Akogbéto - [akogbetom@yahoo.fr](mailto:akogbetom@yahoo.fr); Fabrice Chandre - [fabrice.chandre@ird.fr](mailto:fabrice.chandre@ird.fr)

\* Corresponding author

Published: 20 October 2009

Received: 22 May 2009

*Malaria Journal* 2009, **8**:233 doi:10.1186/1475-2875-8-233

Accepted: 20 October 2009

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/233>

© 2009 Djènontin 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:** Pyrethroid resistance is now widespread in *Anopheles gambiae*, the major vector for malaria in sub-Saharan Africa. This resistance may compromise malaria vector control strategies that are currently in use in endemic areas. In this context, a new tool for management of resistant mosquitoes based on the combination of a pyrethroid-treated bed net and carbamate-treated plastic sheeting was developed.

**Methods:** In the laboratory, the insecticidal activity and wash resistance of four carbamate-treated materials: a cotton/polyester blend, a polyvinyl chloride tarpaulin, a cotton/polyester blend covered on one side with polyurethane, and a mesh of polypropylene fibres was tested. These materials were treated with bendiocarb at 100 mg/m<sup>2</sup> and 200 mg/m<sup>2</sup> with and without a binding resin to find the best combination for field studies. Secondly, experimental hut trials were performed in southern Benin to test the efficacy of the combined use of a pyrethroid-treated bed net and the carbamate-treated material that was the most wash-resistant against wild populations of pyrethroid-resistant *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus*.

**Results:** Material made of polypropylene mesh (PPW) provided the best wash resistance (up to 10 washes), regardless of the insecticide dose, the type of washing, or the presence or absence of the binding resin. The experimental hut trial showed that the combination of carbamate-treated PPW and a pyrethroid-treated bed net was extremely effective in terms of mortality and inhibition of blood feeding of pyrethroid-resistant *An. gambiae*. This efficacy was found to be proportional to the total surface of the walls. This combination showed a moderate effect against wild populations of *Cx. quinquefasciatus*, which were strongly resistant to pyrethroid.

**Conclusion:** These preliminary results should be confirmed, including evaluation of entomological, parasitological, and clinical parameters. Selective pressure on resistance mechanisms within the vector population, effects on other pest insects, and the acceptability of this management strategy in the community also need to be evaluated.

## Background

Malaria is one of the main public health problems in Africa, causing more than one million deaths per year and placing a strong burden on developing African countries [1]. Vector control remains an important component of malaria prevention. The two main methods of malarial vector control are indoor residual spraying (IRS) and insecticide-treated nets (ITNs). The choice of method depends not only on the epidemiological setting and the strategic objectives of vector control, but also on the feasibility and existence of an appropriate delivery structure. In most countries of sub-Saharan Africa, where malaria transmission is stable and infrastructures for large-scale IRS do not exist, ITNs are more cost-effective. Recently, the development of long-lasting insecticidal nets (LLINs), which resist loss of insecticide during washing and extend the residual efficacy of the insecticide, has addressed the technical and logistical constraints associated with re-impregnation of insecticide on the nets. During the last decade, LLINs have become the predominant method of preventing malaria in many malaria-affected countries [1,2]. More than eighty studies carried out around the world have shown the effectiveness of treated nets in reducing the incidence of malaria morbidity by 50% [2]. In Benin, the National Malaria Control Programme of the Ministry of Health has implemented a large campaign of LLIN distribution to pregnant women and children younger than five years of age, the groups most affected by malaria [1].

Pyrethroids are the only insecticides used for the treatment of nets because of their high efficacy and fast effect at low doses, their excito-repellent properties, their residual effects, and their low toxicity in mammals [3]. Unfortunately, resistance to pyrethroids is now widespread among *Anopheles gambiae*, the main malarial vector, notably in West African countries, including Cote d'Ivoire [4], Burkina Faso [5,6], Ghana [7], Nigeria [8], Mali [9], and Benin [10,11]. This resistance is due to a target site modification [12] and/or an increase in the ability of the mosquitoes to metabolize the insecticide (metabolic resistance). Target site modification is based on point mutations in a voltage-gated sodium channel (L1014F in West Africa and L1014S in East Africa) that confers cross-resistance to pyrethroids and DDT [13,14]. Pyrethroid resistance based on metabolic detoxification is mainly due to an increase in the activity of mono-oxygenases and secondarily to an increase of the activity of esterases [11,15].

Many questions remain about the impact of pyrethroid resistance on the effectiveness of LLINs against malarial vectors. To this point, studies performed in areas with pyrethroid-resistant mosquitoes (e.g., Cote d'Ivoire) have not shown a significant decrease in the effectiveness of

pyrethroid-treated mosquito nets, either entomologically [16,17] or parasitologically and clinically [18]. However, a recent study in experimental huts in a *kdr*-type-resistant area in the southern part of Benin (Ladji) showed dramatic decreases in ITN and IRS efficacies against *An. gambiae* in terms of mortality rate and prevention of bites as compared to a northern area without resistance (Malanville) [19]. These results show that it is urgent to develop alternative strategies of vector control to maintain efficacy against resistant mosquitoes and also to limit the expansion of pyrethroid resistance in malaria vectors.

In this context, the efficacy of a new concept of malaria vector control by combining carbamate-treated wall plastic sheeting and pyrethroid-treated nets (ITNs) was studied. Mixing insecticides with different modes of action is one resistance management strategy. In contrast to previous "two-in-one" strategies, which combine two insecticides with different modes of action onto the same mosquito net [20-22], this concept has the advantage of reducing human contact with carbamates, a class of insecticides that is not recommended by the WHO for bed net impregnation. It combines the blood feeding inhibition effect of ITNs and the lethal effect of carbamate-treated plastic sheeting, which mimics a long lasting indoor residual spraying.

In the present study, first, the efficacy and wash resistance of different materials treated with bendiocarb (a carbamate approved by the WHO for IRS) at the doses of 100 mg/m<sup>2</sup> and 200 mg/m<sup>2</sup>, with or without a binding resin, were evaluated in the laboratory. Then, the material that had the best wash resistance, as determined by laboratory trials was tested in experimental huts in combination with deltamethrin-treated nets against *kdr*-resistant populations of *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus*.

## Methods

### Laboratory evaluation

#### Mosquitoes

The pyrethroid-susceptible "Kisumu" strain of *An. gambiae*, originated from Kenya, was used for the bioassays. This reference strain is maintained at the insectary of the Entomological Research Centre of Cotonou (CREC).

#### Insecticides

A wettable powder (WP 80 W FICAM) formulation of bendiocarb was used for the treatment of netting materials. This insecticide is an irreversible acetylcholinesterase inhibitor acting on the insect central nervous system [23]. A fixing resin was used to ease the impregnation of the material with a brush and to improve its wash resistance. Bendiocarb and the fixing resin were provided by Bayer Environmental Science (Lyon, France).

#### Treatment and washing of the materials

The following materials were used for the study:

- 1) blue fabric made of 35% cotton and 65% polyester (CP);
- 2) tent material made of the same fabric, but covered on one side with waterproof polyurethane (CPPU);
- 3) rice sack from the local market, made of woven polypropylene (fibres 2 mm wide; PPW);
- 4) thick waterproof tarpaulin made of polyvinyl chloride (PVC).

Each type of material was cut into 25 cm × 25 cm pieces and then treated with bendiocarb at 100 mg/m<sup>2</sup> or 200 mg/m<sup>2</sup> using a brush. These doses have been recommended by the WHO for classical IRS [24]. The doses tested were lower than the 400 mg/m<sup>2</sup> recommended for IRS and are based on a Human Risk Assessment established by toxicologists from Bayer Crop Science considering that there was no unacceptable risk at these concentrations after accidental manipulation of treated plastic sheeting without any precaution by people in treated houses. Half of the pieces of material also received a binding resin at a dose of 12 ml/m<sup>2</sup>.

The washes were performed horizontally by hand using a sponge soaked in either water alone or water and "Savon de Marseille" soap (2 g/L). The pH of the soapy water was 9.7 and the water alone was 6.0. For each wash, the wet sponge was rubbed against all parts of the material three times over the course of about 10 seconds. For the washes using soapy water, another sponge with water alone was used to rinse the material. This sponge was passed over the entire piece of material once for three seconds. The material was dried horizontally on a table in the laboratory and left at ambient temperature for 24 hours. After drying, the treated materials were wrapped and kept in the refrigerator (4°C) until use in bioassays.

#### Bioassays

The efficacy of each treatment was evaluated using WHO cone tests [25]. This test consists of introducing unfed five-day-old mosquitoes into a Plexiglas cone attached to the insecticide-treated material. Fifteen mosquitoes were placed in each cone, and four cones were used for each type of material (n = 60). The contact time was 30 minutes. After exposure, the mosquitoes were placed in small cups, provided with sugar solution and maintained at 27 ± 2°C with a relative humidity of 80 ± 10% for 24 hours to assess delayed mortality. Actually, the real concentration of insecticide on treated material after each wash is not known.

#### Experimental hut evaluation

##### Study area and huts design

This study was performed in experimental huts according to WHO protocol [25], in southern Benin, in a village situated near Lake Nokoué, about 30 kilometres from Cotonou. Four experimental huts, similar to typical African houses, were used [25,26]. They were 2.5 m long and 1.75 m wide, and the ceiling was 2 m high (Figure 1) [27]. The huts were built using cement bricks, and the floors and walls were covered with thin layers of cement. A plastic tarpaulin ceiling was stretched beneath the roof to protect sleeping residents from the heat and to facilitate the capture of mosquitoes. Each hut was surrounded with a moat to prevent the entry of ants and spiders, which can eat or carry away mosquitoes. The only possible exit for mosquitoes that had entered the hut was a veranda trap, opposite the door. For the present study, the entrances of the huts were closed to prevent the entry of wild mosquitoes.

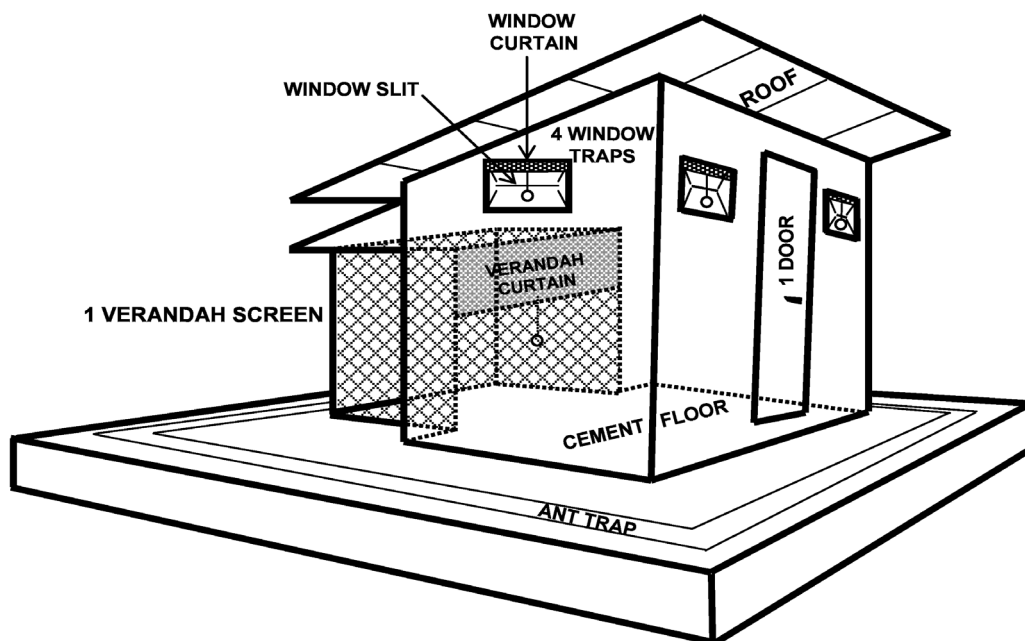
##### Insecticidal treatment in the huts

Previous studies have always demonstrated that carbamates (and organophosphates), even though used on bed net, conferred a very weak personal protection. Indeed, these non-irritant insecticides seem to facilitate mosquitoes to take a blood meal through the net, hence conferring less personal protection [28,29]. Then, considering that mosquitoes will be released in each hut per night, the low personal protection conferred by the carbamates (previously demonstrated), and for ethical reasons, no hut in this study was without net.

Each hut was randomly allocated one of four treatments:

- 1) a hut with an untreated mosquito net (control);
- 2) a hut with a mosquito net treated with deltamethrin at 25 mg/m<sup>2</sup> (WHO recommended dose);
- 3) a hut with the top third of the walls covered with the carbamate-treated material that gave the best wash resistance in combination with the mosquito net treated with deltamethrin at 25 mg/m<sup>2</sup>;
- 4) a hut with all of the walls covered with the carbamate-treated material that gave the best wash resistance in combination with the mosquito net treated with deltamethrin at 25 mg/m<sup>2</sup>.

Nets were made of 100-denier polyester with a mesh size of 156 threads per square inch. The nets were manually impregnated with deltamethrin. To simulate the conditions of bed net wear and tear that can be encountered in the field, 6 holes, 4 × 4 cm each, were cut on the sides and ends of each net.



**Figure 1**  
**Design of the experimental huts used in West Africa.**

#### Mosquito species

Two local populations of pyrethroid-resistant *An. gambiae* and *Cx. quinquefasciatus*, collected as larvae and raised to adulthood in the insectary were used. Both populations have strong resistance to pyrethroids due to the *kdr* mutation and likely metabolism mechanism [10].

#### Release-recapture

Four adult volunteers were recruited from the local population. After having announced throughout the district that this project required volunteers, four adults were selected with the approval of the traditional head of the district. Volunteers were informed of the objective of this study and signed informed consent (or authorized a witness if illiterate). Each night, 100 *An. gambiae* females or 150 *Cx. quinquefasciatus* females, aged 5 days and never having had a blood meal, were released in each hut at 20:00, fifteen minutes before the entry of the volunteers, to acclimate. The volunteers slept in the huts from 20:15 to 08:00 the following morning. At 08:00, all mosquitoes were removed from the huts and their locations (hut vs. veranda), and the physiological status (dead/living and fed/unfed) were recorded. The surviving mosquitoes were placed in small cups and provided with honey solution for 24 hours to assess delayed mortality. Three replicates were performed for each experimental hut and each species (with a total of 300 *An. gambiae* and 450 *Cx. quinquefasciatus* per treatment).

Even though the mosquitoes released in the huts were raised in the insectary (without infection), the volunteers were provided with free and rapid treatment, as recommended by the WHO, in the case of any symptoms of malaria. Ethical authorization for this research was obtained from the Ministry of Health for the participation of humans (volunteers and collectors) in the experimental hut studies.

#### Data analysis

The results from the bioassays were analysed by taking into account the different materials, the presence or absence of a binding resin, and the type and number of washes using a logistic regression model with GLIM 4 software [30]. The effectiveness of the materials was expressed in terms of the probability of survival of the mosquitoes after exposure to the different treated materials. Analysis of variance (ANOVA) of the probability of survival of the mosquitoes as a function of the different variables (material, dose, resin, and type of wash) was performed using the same software.

Concerning the experimental hut evaluation, the effect of each treatment was expressed relative to the control in terms of the proportions of blood feeding and mortality. The proportion of blood feeding was defined as the proportion of blood-fed mosquitoes at the time of collection. Mortality was reported as the proportion of mosquitoes



found dead the morning of the collection (immediate mortality) and after 24 hours (delayed mortality).

Proportional data (blood feeding and mortality) obtained from the experimental hut trials were analysed using logistic regression (STATA 6 software, Stata Corporation, College Station, TX, USA).

## Results

### **Efficacy and wash resistance of the materials treated with bendiocarb**

In total, 350 bioassays were performed using approximately 21,000 *An. gambiae* "Kisumu" females.

Regardless of the dose of bendiocarb used (100 mg/m<sup>2</sup> or 200 mg/m<sup>2</sup>), the presence or absence of the binding resin, or the washing method, PPW induced 0% survival (100% mortality) with up to 10 washes (Figure 2). This material, therefore, provided the best results in terms of wash resistance.

The probability of survival after exposure to the other materials depended on the presence or absence of the binding resin and the type and number of washes (Figure 2).

ANOVA showed that all variables (i.e., dose, binding resin, type of wash, and type of material) had significant impacts ( $p < 0.01$ ) on the probability of survival of the mosquitoes. At a dose of 100 mg/m<sup>2</sup>, the probability of survival of mosquitoes exposed to treated materials was affected by the number of washes more so than at the dose of 200 mg/m<sup>2</sup> ( $p < 0.01$ ). Soap significantly reduced the wash resistance of treated materials ( $p < 0.01$ ), and the treatment of the materials with binding resin improved the wash resistance ( $p = 0.025$ ).

### **Experimental hut trials**

Taking into account the results from the bioassays, we only tested the PPW with fixing resin treated at 200 mg/m<sup>2</sup> in the experimental huts. The results are presented in Tables 1 and 2.

The mortality rate of *An. gambiae* recorded in the control hut was less than 3%, indicating a lack of insecticide contamination in these huts. With the deltamethrin-treated nets alone, the mortality was 40.5%, increasing to 80.3% and 100% in association with bendiocarb-treated wall coverings on the upper third and complete inside surface of the hut, respectively. The addition of the bendiocarb-treated plastic sheeting to the treated net provided a significant increase in mortality over the net alone ( $p < 0.001$ ). This increase in mortality was more significant with full coverage of the hut walls ( $p < 0.001$ ).

The blood feeding rate of *An. gambiae* was 42.2% in the control hut. These rates were considerably less ( $< 8\%$ ) in all other treatments ( $p < 0.001$ ). It is noteworthy that the addition of the bendiocarb-treated wall covering did not induce any blood feeding inhibition over the treated net alone.

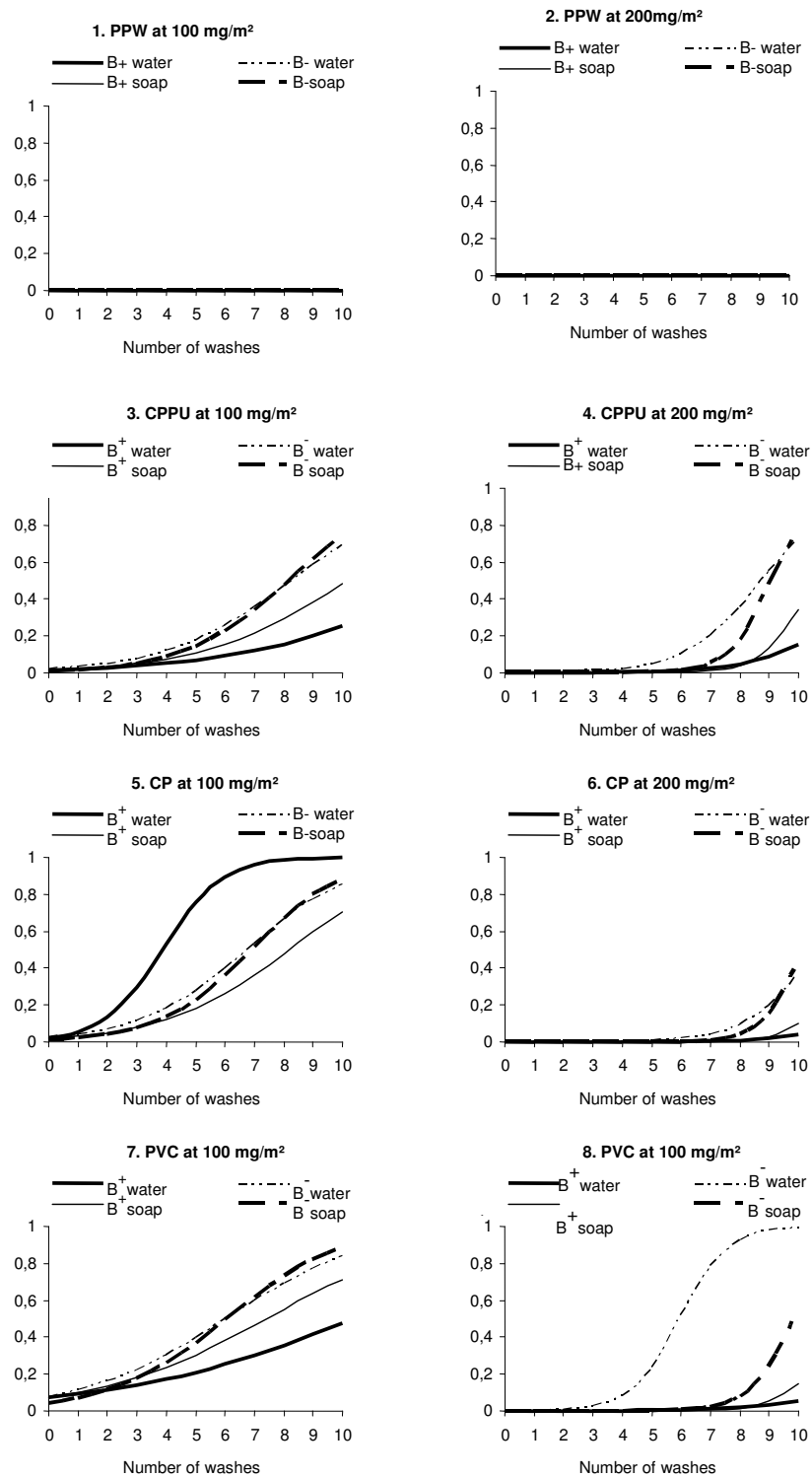
In the control hut, the mortality recorded for *Cx. quinquefasciatus* was only 0.6%. The mortality rates were significantly greater for the other treatments ( $p < 0.001$ ), with a mortality rate of 14.6% for the treated net alone, 26.9% for the net and upper third wall covering, and 47.1% for the net and full coverage with bendiocarb-treated plastic sheeting. The blood feeding rate in the control hut was 43.5%. This rate was significantly less ( $< 8\%$ ) for all other treatments ( $p < 0.001$ ).

## Discussion

The present study has evaluated a new vector control technique consisting of the combination of a pyrethroid-treated mosquito net and bendiocarb-treated plastic sheeting to improve the control of pyrethroid-resistant mosquitoes. Results in the laboratory show good wash resistance of woven polypropylene (PPW) compared to other materials, which may be explained by the structure of this material. Some of the insecticide may be retained between the fibres and potentially protected over time from the abrasive effect of the washes. It is also possible that there was an interaction between bendiocarb and polypropylene. The use of soap significantly reduced the wash resistance of treated materials because the half-life of bendiocarb decreases in alkaline solution, and the pH of the soapy water was 9.7. The use of binding resin improved the wash resistance of the treated materials. The resin may form a thin layer, protecting the insecticide against the effects of washing. This resin was similar to that used for bed net impregnation with K-O Tab® 1-2-3 (Bayer Environmental Science, Lyon, France) to improve the residual effect of insecticide on the nets.

For the experimental hut study, the results show a weak killing effect of deltamethrin-treated mosquito nets on pyrethroid-resistant *An. gambiae* and *Cx. quinquefasciatus* populations. These results confirmed those of Corbel *et al* [31], who, using experimental huts in Ladj (Benin), showed a low (50%) mortality rate for *An. gambiae* in huts with mosquito nets treated with permethrin at 1 g/m<sup>2</sup>. A more recent study in experimental huts on the same population of *An. gambiae* showed reduced efficacy of nets treated with lambda-cyhalothrin at 18 mg/m<sup>2</sup> (mortality  $< 30\%$ ), emphasizing the necessity of finding new vector control strategies for malaria control [19].

In this study, the combination of a deltamethrin-treated bed net and a bendiocarb-treated wall covering (with full



**Figure 2**  
**Probability of survival of *An. gambiae* "Kisumu" exposed to the materials impregnated with bendiocarb as a function of the dose (100 mg/m<sup>2</sup> vs. 200 mg/m<sup>2</sup>), the type of liquid used for washing (water vs. soap) and the number of washes (0 to 10). Note: B+ = impregnation with binding resin; B- = impregnation without binding resin; water = wash with water alone; soap = wash with soap; P = probability of survival.**

**Table 1: Mortality and blood feeding rates of *Anopheles gambiae* "Ladji" release-recapture in experimental huts (3 replicates)**

<i>An. gambiae</i>	Control	ITN	ITN + PPWI 1/3	ITN + PPWI total
Females caught	206	227	193	202
Females dead	6	92	155	202
Mortality (%)	2.9 <sup>a</sup> [0.6-5.2]	40.5 <sup>b</sup> [34.1-46.9]	80.3 <sup>c</sup> [74.7-85.9]	100 <sup>d</sup>
Corrected mortality (%)		38.9 <sup>a</sup>	79.7 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>
Females blood fed	87	6	15	0
Blood feeding rate (%)	42.2 <sup>a</sup> [35.5-49.0]	2.6 <sup>b</sup> [0.6-4.7]	7.8 <sup>c</sup> [4.0-11.6]	0 <sup>b</sup>
Blood feeding inhibition (%)	-	93.74	81.60	100

Note: ITN = insecticide-treated net (deltamethrin at 25 mg/m<sup>2</sup>); PPWI 1/3 = top third of the walls covered with woven polypropylene treated with bendiocarb at 200 mg/m<sup>2</sup>; PPWI total = walls completely covered with woven polypropylene treated with bendiocarb at 200 mg/m<sup>2</sup>. Values in the same row sharing the same superscript letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ ).

coverage) was most effective against resistant *An. gambiae*, inducing 100% mortality and 0% blood feeding. Just after releasing mosquitoes in the huts, we noticed that mosquitoes primarily rested on the treated walls, indicating little irritation, perhaps also an effect of the excito-repellent properties of deltamethrin. At this point, the quantity of bendiocarb absorbed through their tarsi may have been sufficient to result in their death or, at least, to change their host-seeking behaviour. The dose of bendiocarb picked up by mosquitoes may also act in synergy with deltamethrin when the mosquitoes leave the wall and come in contact with the net to attempt to feed. Synergism between pyrethroids and carbamates has been documented [32]. Toxicological and electrophysiological studies of synergy between carbamate and pyrethroid insecticides were carried out on two susceptible pest species. The authors proposed a cascade of molecular events to explain the occurrence of synergistic effects between these insecticides [32].

Against *Cx. quinquefasciatus*, this combination was less effective, probably due to the robustness of *Cx. quinquefasciatus* compared to *An. gambiae*. It is likely also due to the high level of insecticide resistance in this species. Experi-

mental hut trials with permethrin-treated nets (Olyset Nets®), carried out in an area where pyrethroid resistance is common in Cote d'Ivoire, have shown lower mortality of *Cx. quinquefasciatus* (17%) compared to *An. gambiae* (27.5%) [33]. Another study carried out in southern Benin has shown that carbamate resistance was present at a higher frequency in *Cx. quinquefasciatus* than in *An. gambiae* [10].

Permethrin-treated plastic sheeting was tested against pyrethroid-resistant *An. gambiae* in Burkina Faso [34], showing an efficacy proportional to the surface of the walls covered. However, the mortality rate induced by these treatments was relatively low (44.5% mortality when all four walls were covered), perhaps because of the high frequency of the *kdr* mutation in the local populations of *An. gambiae* [6] and the high irritability induced in mosquitoes by permethrin [34].

The use of carbamates or organophosphates to treat materials against pyrethroid-resistant *An. gambiae* has already been the subject of several studies [20,21,35-37]. These insecticides have been shown to be effective and constitute good alternatives for control of pyrethroid-resistant

**Table 2: Mortality and blood feeding rates of *Culex quinquefasciatus* "Ladji" after release-recapture in experimental huts (3 replicates)**

<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Control	ITN	ITN + PPWI 1/3	INT + PPWI total
Females caught	342	330	286	257
Females dead	2	48	77	121
Mortality (%)	0.6 <sup>a</sup> [0-1.4]	14.6 <sup>b</sup> [10.7-18.4]	26.9 <sup>c</sup> [21.8-32.1]	47.1 <sup>d</sup> [41.0-53.2]
Corrected mortality (%)		14.0 <sup>a</sup>	26.4 <sup>b</sup>	46.6 <sup>c</sup>
Females blood fed	149	24	18	0
Blood feeding rate (%)	43.6 <sup>a</sup> [38.3-48.8]	7.3 <sup>b</sup> [4.5-10.1]	6.29 <sup>b</sup> [3.5-9.1]	0 <sup>c</sup>
Blood feeding inhibition (%)	-	83.31	85.55	100

Note: ITN = insecticide-treated net (deltamethrin at 25 mg/m<sup>2</sup>); PPWI 1/3 = top third of the walls covered with woven polypropylene treated with bendiocarb at 200 mg/m<sup>2</sup>; PPWI total = walls completely covered with woven polypropylene treated with bendiocarb at 200 mg/m<sup>2</sup>. Values in the same row sharing the same superscript letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ ).

malarial vectors, even though they do not confer the same amount of personal protection, due to a weak irritant effect [20]. Their use as a complementary vector control tool in combination with treated nets seems promising.

In the previous studies, carbamates were used on mosquito nets. This may cause concern for human safety, especially that of children because the risk of long periods of contact is greater in this case. In the present study, the coverage of only the upper third of walls with carbamate-treated plastic sheeting, to avoid the risk of contact by children, was tested. The results obtained were satisfactory. The formulation of insecticide used acts by contact. It seems obvious that contact between the user of insecticide treated bed net is more important than contact in the case of insecticide treated plastic sheeting (ITPS) placed at the top of the walls. Although the amount of insecticide used in the case of the ITPS is higher, the direct contact of the user with insecticide appears more reduced. Moreover, it would be possible to develop long-lasting insecticide-treated plastic sheeting (LLIPS). The use of LLIPS as an alternative to IRS has the potential to be widely implemented at the community level, even with relatively limited technical or logistical infrastructure in place.

The present study indicates that the combination of carbamate-treated plastic sheeting and pyrethroid-treated nets is a potential alternative strategy for controlling pyrethroid-resistant vectors, particularly in rural Africa.

## Conclusion

At the moment, African countries and international donors (UNICEF, IMF, WHO, etc.) are investing in the massive distribution of pyrethroid-treated nets to protect populations from malaria. It is vital to study alternative possibilities that will allow the maintenance of the efficacy of this tool and manage insecticide resistance. The mixture of two insecticides with different modes of action has been shown to be a promising strategy for control of pyrethroid-resistant mosquitoes, as well. Pyrethroid resistance constitutes a threat to vector control, as shown by the reduction of efficacy of treated nets [19,31].

These preliminary results should be further studied, including evaluation of entomological, parasitological, and clinical parameters. Selective pressure on resistance mechanisms within the vector population, effects on other pest insects and the acceptability of any control strategy in the community also need to be evaluated.

It is also necessary to continue to look for other methods of vector control. In the short term, the use of new insecticides [38] or even other types of chemicals, alone or in combination, can be effective. One good example is the combination of repellents and insecticides, which has

been shown to be promising in areas where *Anopheles* mosquitoes are resistant to pyrethroids [39,40].

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

AD and FC conceived of the study. AD and FC have participated in the design of the study. AD, FC, and CP have participated in the analysis and interpretation of data. AD carried out bioassays in laboratory. AD and JC carried out data collection in experimental huts. The manuscript has been drafted by AD. AD, FC, TB, SI, J-M H, VC, and MA have been involved in manuscript revising. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We thank the Ministère des Affaires Etrangères, France, for project REFS N° 2006-22 and the Institut de Recherche pour le Développement, which financially and materially supported the work. We also Carlo Costantini of the Institut de Recherche pour le Développement for their technical assistance in data analysis.

We thank Dr G. Hesse from Bayer Environmental Science (Lyon, France) for providing Bendiocarb and fixing resin.

## References

1. WHO: **The world malaria report 2005**. 2005 [<http://rbm.who.int/wmr2005/>]. Geneva, World Health Organization
2. Lengeler C: **Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria**. *Cochrane Database Syst Rev* 2004:CD000363.
3. Zaim M, Aitio A, Nakashima N: **Safety of pyrethroid-treated mosquito nets**. *Med Vet Entomol* 2000, **14**(1):1-5.
4. 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**(3):230-234.
5. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Dabire KR, Simard F, Ouedraogo JB, Guillet P, Hougard JM: **First report of a *kdr* mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso, West Africa**. *J Am Mosq Control Assoc* 2004, **20**(2):195-196.
6. Dabire KR, Diabate A, Agostinho F, Alves F, Manga L, Faye O, Baldet T: **Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (*kdr*) in Guinea-Bissau, West Africa**. *Bull Soc Pathol Exot* 2008, **101**(2):119-123.
7. Yawson AE, McCall PJ, Wilson MD, Donnelly MJ: **Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso**. *Med Vet Entomol* 2004, **18**(4):372-377.
8. 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 Trop* 2005, **95**(3):204-209.
9. Tripet F, Wright J, Cornel A, Fofana A, McAbee R, Meneses C, Reimer L, Slotman M, Thiemann T, Dolo G, et al.: **Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (*kdr*) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**(1):81-87.
10. 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.
11. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple**

- pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, **9**:538.
12. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarrroll L, Ranson H: **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes.** *Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34(7)**:653-665.
  13. 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)**:179-184.
  14. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH: **Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids.** *Insect Mol Biol* 2000, **9(5)**:491-497.
  15. Hemingway J, Karunaratne SH: **Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism.** *Med Vet Entomol* 1998, **12(1)**:1-12.
  16. Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio JM, Koffi A, Konan LY, Carnevale P: **Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets.** *Med Trop (Mars)* 1998, **58(4)**:349-354.
  17. Darriet F, N'Guessan R, Koffi AA, Konan L, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P: **Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC.** *Bull Soc Pathol Exot* 2000, **93(2)**:131-134.
  18. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevale P: **Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73(5)**:859-864.
  19. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13(2)**:199-206.
  20. Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, Carnevale P: **Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*.** *Med Vet Entomol* 2001, **15(1)**:105-112.
  21. Corbel V, Darriet F, Chandre F, Hougard JM: **Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors.** *Parasite* 2002, **9(3)**:255-259.
  22. Hougard JM, Corbel V, N'Guessan R, Darriet F, Chandre F, Akogbeto M, Baldet T, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M: **Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire.** *Bull Entomol Res* 2003, **93(6)**:491-498.
  23. Corbett JR, Wright K, Baillie AC: **The biomedical mode of action of pesticides.** 2nd edition. London: Academic Press; 1984:1-382.
  24. WHO: **Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance.** Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2006/1 2006:115.
  25. WHO: **Guideline for laboratory and field testing of long lasting mosquito nets.** WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11 2005.
  26. Darriet F, N'Guessan R, Hougard JM, Traore-Lamizana M, Carnevale P: **[An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts].** *Bull Soc Pathol Exot* 2002, **95(4)**:299-303.
  27. Hougard JM, Martin T, Guillet PF, Coosemans M, Itoh T, Akogbeto M, Chandre F: **Preliminary field testing of a long-lasting insecticide-treated hammock against *Anopheles gambiae* and *Mansonia* spp. (Diptera: Culicidae) in West Africa.** *J Med Entomol* 2007, **44(4)**:651-655.
  28. Miller JE, Lindsay SW, Armstrong JR: **Experimental hut trials of bednets impregnated with synthetic pyrethroid or organophosphate insecticide for mosquito control in The Gambia.** *Med Vet Entomol* 1991, **5(4)**:465-476.
  29. Kolaczinski JH, Curtis CF: **Comparison of two alpha-cyano pyrethroids when impregnated into bednets against a pyrethroid resistant and susceptible strain of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) and their F1 progeny.** *Bull Entomol Res* 2000, **90(2)**:119-123.
  30. Payne C: **The GLIM system release 3.77 Manual.** Numerical Algorithms Group Ltd, Oxford 1987.
  31. Corbel V, Raymond M, Chandre F, Darriet F, Hougard JM: **Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates.** *Pest Manag Sci* 2004, **60(4)**:375-380.
  32. Corbel V, Chandre F, Darriet F, Lardeux F, Hougard JM: **Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae.** *Med Vet Entomol* 2003, **17(2)**:158-164.
  33. N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P: **Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Cote d'Ivoire.** *Med Vet Entomol* 2001, **15(1)**:97-104.
  34. Diabate A, Chandre F, Rowland M, N'Guessan R, Duchon S, Dabire KR, Hougard JM: **The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors.** *Trop Med Int Health* 2006, **11(5)**:597-603.
  35. Curtis CF, Myamba J, Wilkes TJ: **Comparison of different insecticides and fabrics for anti-mosquito bednets and curtains.** *Med Vet Entomol* 1996, **10(1)**:1-11.
  36. 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(1)**:25.
  37. Corbel V, Hougard JM, N'Guessan R, Chandre F: **Evidence for selection of insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase by carbamate-treated nets in *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire.** *J Med Entomol* 2003, **40(6)**:985-988.
  38. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Knols B, Akogbeto M, Rowland M: **Control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with chlorfenapyr in Benin.** *Trop Med Int Health* 2009, **14(4)**:389-395.
  39. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM: **Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72(6)**:739-744.
  40. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabire RK, Lapiet B, Chandre F, Hougard JM: **Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14(11)**:1707-1714.

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](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## Indoor Use of Plastic Sheeting Impregnated with Carbamate Combined with Long-Lasting Insecticidal Mosquito Nets for the Control of Pyrethroid-Resistant Malaria Vectors

Armel Djènontin,\* Fabrice Chandre, K. Roch Dabiré, Joseph Chabi,  
Raphael N'Guessan, Thierry Baldet, Martin Akogbéto, and Vincent Corbel

Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Unité de Recherche 016 Institut de Recherche pour le Développement,  
Cotonou, Bénin; Institut de Recherche en Science de la Santé, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso;  
Institut de Recherche pour le Développement, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Montpellier, France

**Abstract.** The combined efficacy of a long-lasting insecticidal net (LLIN) and a carbamate-treated plastic sheeting (CTPS) or indoor residual spraying (IRS) for control of insecticide-resistant mosquitoes was evaluated in experimental huts in Burkina Faso. *Anopheles gambiae* from the area is resistant to pyrethroids and to a lesser extent, carbamates. Relatively low mortality rates were observed with the LLIN (44%), IRS (42%), and CTPS (52%), whereas both combinations killed significantly more mosquitoes (~70% for LLIN + CTPS and LLIN + IRS). Blood feeding by *An. gambiae* was uninhibited by IRS and CTPS compared with LLIN (43%), LLIN + CTPS (58%), and LLIN + IRS (56%). No evidence for selection of the *kdr* and *ace-1<sup>R</sup>* alleles was observed with the combinations, whereas a survival advantage of mosquitoes bearing the *ace-1<sup>R</sup>* mutation was observed with IRS and CTPS. The results suggest that the combination of the two interventions constitutes a potential tool for vector-resistance management.

### INTRODUCTION

Malaria represents one of the most critical public-health challenges for Africa.<sup>1</sup> With the absence of effective vaccine, prompt access to diagnosis and treatment with artemisinin-based combination therapy (ACT) remains the mainstay of malaria control. In addition to that, the use of long-lasting insecticide-treated nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS) represents the main approach to malaria prevention.<sup>2</sup> A recent systematic review of different randomized controlled trials conducted in a range of transmission settings worldwide in children and adults showed that insecticide-treated nets (ITNs) reduced uncomplicated malaria episodes by 50% in stable areas and 62% in unstable areas.<sup>3</sup> Until now, IRS has always been recommended for areas of low-to-moderate transmission, although the World Health Organization (WHO) has changed the policy and is now promoting a wider application of IRS, even in highly endemic areas.<sup>1</sup> However, many authors have questioned the global efficacy of IRS in high malaria-transmission settings, because a great reduction in transmission level is needed to achieve a significant reduction in malaria prevalence.<sup>4</sup> To be sustainable in malaria-endemic countries, IRS with conventional insecticides must be re-applied frequently and continued indefinitely, requiring long-term predictable financing mechanisms that many African countries lack.<sup>4</sup> For this reason and because LLINs seem to be more cost effective than IRS,<sup>5</sup> scaling up of LLINs coverage in Africa has become the cornerstone of malaria prevention.

To date, pyrethroids are the only insecticides used for net impregnation because of their strong efficacy, their fast-acting effect at low dose, and their low toxicity for mammals.<sup>6</sup> Unfortunately, pyrethroid resistance in malaria vectors has spread across Africa and is now present in most of the countries where the National Malaria Control Programs (NMCP) implemented a large-scale distribution of LLINs to the population at risk (i.e., children under 5 years and pregnant

women).<sup>7</sup> Until now, there was no evidence to support the fact that pyrethroid resistance reduced the effectiveness of LLIN for controlling malaria at an operational level.<sup>8</sup> However, comparative experimental hut trials of lambda-cyhalothrin as ITN and IRS treatments in the coastal area of Benin, Ladji and Malanville in the north, indicated a major loss of efficacy associated with pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* Giles at Ladji, Benin.<sup>9</sup>

Carbamates (CARs) and organophosphates (OPs) are considered as promising alternatives to pyrethroids for vector control.<sup>10</sup> Their twin characteristics of non-excitorepellency and toxicity may combine to make them stronger than pyrethroids in reducing adult densities, survival rates, and hence, vectorial capacity.<sup>11</sup> Unfortunately, the use of such non-irritant insecticides would not inhibit blood feeding of mosquitoes and therefore, would provide much lower personal protection than pyrethroids.<sup>12</sup> In addition, they have a less favorable toxicological profile than pyrethroids that renders their use on mosquito bed nets unlikely.

To overcome these limitations, we have investigated and tested a new concept for malaria vector control consisting of the use of an LLIN plus a carbamate-treated plastic sheeting (CTPS) or an IRS using non-pyrethroids in the same dwelling to improve the personal protection and killing effect against pyrethroid-resistant mosquitoes. The rationale behind this concept is that neither ITNs nor IRS-like treatments will be sufficiently effective alone to achieve and maintain interruption of transmission in stable malaria areas of Africa. It is indeed essential to assess if combining the two interventions would maximize the impact of malaria vector control and offer opportunities for the management of insecticide resistance (i.e., insecticide resistance management [IRM] strategy).

A previous study conducted under laboratory- and field-simulated conditions showed a good efficacy and wash resistance of bendiocarb-treated polypropylene plastic sheeting mixed with a binding agent against susceptible and pyrethroid-resistant *An. gambiae* and *Culex quinquefasciatus* Say.<sup>13</sup> Here, the combined efficacy of an LLIN (PermaNet 2.0) plus a CTPS or an IRS using bendiocarb at 400 mg/m<sup>2</sup> was investigated in the Vallée du Kou (Burkina Faso) where *An. gambiae* shows resistance to pyrethroids and to a lesser extent,

\*Address correspondence to Armel Djènontin, Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 01 BP 4414 RP Cotonou, République du Bénin. E-mail: armeldj@yahoo.fr

carbamates<sup>14</sup> with mortalities of 24% and 86% for deltamethrin (0.05%) and bendiocarb (0.1%) (Dabiré R, unpublished data). Molecular genotyping of mosquitoes collected in each hut was also performed to assess the pressure of selection induced by each intervention on the *kdr* and *ace-1<sup>R</sup>* alleles.

## MATERIALS AND METHODS

**Study area.** The experimental hut trial was carried out at the Vallée du Kou (VK7), a huge rice field area located near Bobo-Dioulasso, Burkina Faso,<sup>15</sup> between October and December 2008. Both molecular M and S forms of *An. gambiae* coexist in sympatry, but the M form is mostly present during the dry season.<sup>14</sup> The *kdr* mutation occurred in M and S molecular forms but at different allelic frequencies.<sup>14</sup> The *ace-1<sup>R</sup>* mutation was found essentially in the S molecular form.<sup>14</sup>

**Experimental huts, volunteer participants, and mosquito collections.** The treatments and control were evaluated in six experimental huts according to the WHO procedures.<sup>16</sup> Local adult male volunteers were recruited to sleep in the huts. They provided informed consent before enrolment. They received malaria chemoprophylaxis and medical surveillance during and 3 weeks after the trial. The ethical committees of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the Ministry of Health of Burkina Faso formally approved the protocol. At 6:00 PM, before the start of the tests, the volunteers removed spiders and other mosquito predators. Then, they slept from 8:00 PM to 5:00 AM, at which time they closed the entry baffles, lowered the curtain separating the sleeping room from the veranda-trap, and collected all mosquitoes, dead and alive, from the room, bed net, and veranda. Female mosquitoes were scored by location as dead or alive and fed or unfed; species was identified according to morphologic characteristics. To minimize bias related to mosquito attractiveness of each volunteer and spatial variation in mosquito densities, the volunteers and bed nets were rotated between huts each day. Mosquito collection began 3 days after huts treatments. All six treatments were investigated on concurrent nights, and 57 replicates were performed for each experimental hut.

**Mosquito nets and treatments.** The following treatments were compared in six huts: (1) control, untreated polyester mosquito net; (2) LLIN, PermaNet 2.0 alone; (3) IRS, carbamate alone; (4) LLIN + IRS, PermaNet 2.0 plus carbamate; (5) CTPS, carbamate-treated plastic sheeting alone; and (6) LLIN + CTPS, PermaNet 2.0 plus carbamate-treated plastic sheeting.

PermaNet 2.0 (Vestergaard Frandsen SA, Lausanne, Switzerland) is an LLIN made of multifilament polyester (100 denier) fabric, factory treated with deltamethrin at 55 mg/m<sup>2</sup> (1.4 g/kg for a 100-deniers net). The untreated (control) net was a polyester fabric (SiamDutch Mosquito Netting Co., Bangkok, Thailand). Both untreated and PermaNet 2.0 were deliberately holed (six holes, 4 × 4 cm each) to simulate torn nets.<sup>15</sup>

The carbamate used for the treatment of the plastic sheeting (CTPS) and walls (IRS) was bendiocarb wettable powder (WP) concentrate 80W (Ficam) at a single dose of 400 mg active ingredients (ai)/m<sup>2</sup>. Ficam and the resin were provided by Bayer (Leverkusen, Germany). This dose has been recommended by the WHO for classical IRS.<sup>17</sup> For the IRS, bendiocarb was applied one time using a hand-operated compression sprayer (Berthoud N°2000 PRO model; Vermorel, Villefranche sur Saône, France) equipped with a flat fan nozzle with 80° swath and 0.76 L/minute flow rate.

The polypropylene plastic sheeting was obtained from Filtisac SA (Abijan, Côte d'Ivoire). Treatment procedure for the huts containing CTPS was done as per Djenontin and others.<sup>13</sup> This involved evenly applying bendiocarb to the polypropylene plastic sheeting, letting the treatment dry horizontally in the shade for 1 day, and covering just the upper one-third of the walls to minimize contact with sleepers. A binding resin (20% concentrated) prepared at 12 mL/m<sup>2</sup> was added to the bendiocarb-polypropylene plastic sheeting preparation to improve residual activity and wash resistance.<sup>13</sup>

**Residual activity of insecticide treatments.** To evaluate residual activity, WHO cone bioassays were undertaken 7, 10, 21, and 120 days post-treatment using a laboratory-susceptible *An. gambiae* s.s., Kisumu strain. Adult females, 3–5 days old, were introduced into cones fixed to LLIN for 3 minutes and to sprayed walls (IRS) or treated plastic sheeting (CTPS) for 30 minutes according to WHO guidelines.<sup>16</sup> Approximately 50 mosquitoes in 5 replicates of 10 mosquitoes were tested on each substrate.

**Molecular analysis.** After scoring field-collected Anopheles mosquitoes in each hut and identifying each specimen to species by polymerase chain reaction (PCR),<sup>18</sup> the presence and relative frequency of the molecular M and S forms of *An. gambiae* s.s. was determined according to the method of Favia and others.<sup>19</sup> The methods of Martinez Torrez and others<sup>20</sup> and Weill and others<sup>21</sup> were used for the molecular detection of the *kdr* and *ace-1<sup>R</sup>* alleles, respectively, in individual mosquitoes collected, alive or dead, from the control and treated huts.

**Statistical analysis.** Data from *in situ* bioassays were compared between each hut using a  $\chi^2$  test at a 95% confidence interval with the Minitab software version 12.2. The Kruskal–Wallis non-parametric test was used to assess deterrence by comparison of the number of mosquitoes entering each hut. Proportional data from the hut trial (exophily, blood feeding, and mortality) were analyzed using logistic regression (XLSTAT software, Paris, France).<sup>22</sup> For each treatment, differences in genotypes between live and dead mosquitoes were analyzed using the exact test of Fisher with the software GENEPOP (Montpellier, France).<sup>23</sup>

## RESULTS

**Residual activity of treatments.** Residual activity of LLIN and CTPS, as measured by cone bioassays on the Kisumu strain, showed no decline over 60 days. By contrast, mortality on walls (IRS) decreased significantly from 100% after 10 days to 29% after 60 days ( $P < 0.05$ ).

**Efficacy of treatments in huts.** The summary results for exophily are shown in Figure 1, whereas those for blood feeding and mortality are presented in Figures 2 and 3, respectively.

A total of 1,374 *An. gambiae* were collected within the six experimental huts. Fewer *An. gambiae* entered the huts with LLIN, alone or in combination with IRS and CTPS, than the untreated hut ( $P < 0.05$ ). Natural exophily in the control hut was 21% (Figure 1). All treatments induced significantly higher exophily than the control ( $P < 0.05$ ); however, the best effect was observed with the LLIN alone (79.7%;  $P < 0.01$ ) or combined with IRS (60.5%;  $P < 0.01$ ) and CTPS (50.2%;  $P < 0.01$ ). The IRS and CTPS treatments induced exophily  $< 40\%$ , and the difference between them was not significant ( $P = 0.10$ ). Blood-feeding rates of *An. gambiae* in the control, CTPS, and IRS huts were not significantly different (69–88%;  $P > 0.05$ ) (Figure 2), suggesting that IRS and CTPS do not

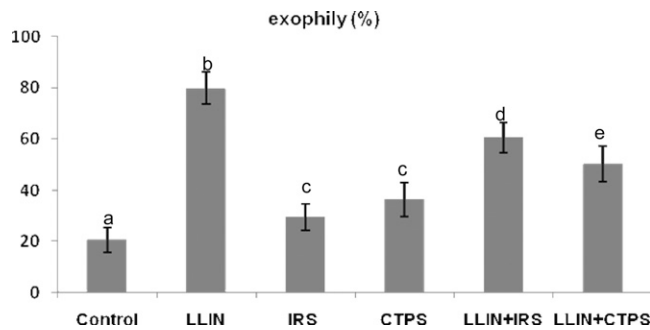


FIGURE 1. Exophily (95% confidence interval) of *An. gambiae* exposed to LLIN alone and in combination with IRS and CTPS in experimental huts (Vallée du Kou, Burkina Faso). Treatments carrying the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

constitute an effective barrier against mosquito bites. By contrast, significant blood-feeding inhibition was observed in huts with LLIN (43%), LLIN + IRS (56%), and LLIN + CTPS (58%) compared with the control hut ( $P < 0.01$ ). Differences between the monotreatment and the combinations were not significant ( $P > 0.05$ ).

Mortality rate in the control hut was less than 3%, indicating that no contamination occurred during the evaluation. Relatively low mortality rates were observed with the LLIN (44%), IRS (42%), and ITPS (53%), whereas both combinations killed significantly more pyrethroid-resistant mosquitoes ( $P < 0.01$ ); the LLIN + IRS killed 67%, and the LLIN + CTPS had 73% mortality (Figure 3).

#### Effect of treatments on insecticide-resistance genotypes.

A total of 325 *An. gambiae* females were genotyped for their sibling species and molecular forms as well as for the *kdr* and *ace-1<sup>R</sup>* alleles. About 98% of the specimens analyzed (321 of 325) belonged to the M molecular form. The frequency of the resistance alleles in the control hut with untreated net was 90% for the *kdr* and 11% for the *ace-1<sup>R</sup>* mutations.

The results of *kdr* and *ace-1<sup>R</sup>* genotyping performed on mosquitoes caught in the treated huts are shown in Table 1. There was no significant differences in the *kdr* allele frequency between mosquitoes that died or survived each treatments ( $\chi^2 < 0.00$ ; degree of freedom [df] = 2;  $P > 0.53$ ). By contrast, the frequency of the *ace-1<sup>R</sup>* allele was significantly higher among the live than the dead mosquitoes from both IRS and CTPS huts (IRS:  $\chi^2 = 7.05$ ; df = 2;

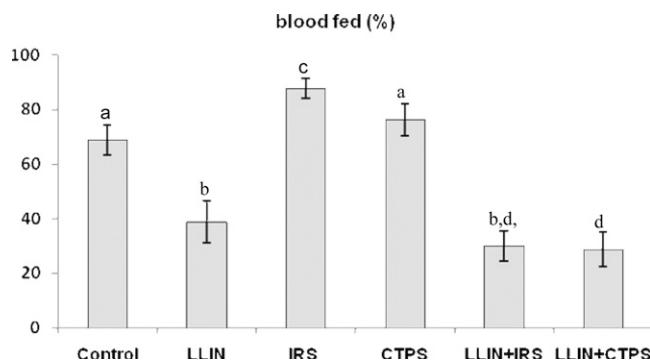


FIGURE 2. Blood-feeding rate (95% confidence interval) of *An. gambiae* exposed to LLIN alone and in combination with IRS and CTPS in experimental huts (Vallée du Kou, Burkina Faso). Treatments carrying the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

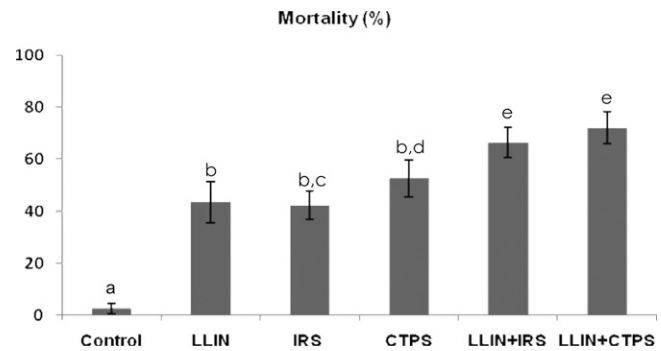


FIGURE 3. Mortality rate (95% confidence interval) of *An. gambiae* exposed to LLIN alone and in combination with IRS and CTPS in experimental huts (Vallée du Kou, Burkina Faso). Treatments carrying the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ ).

$P = 0.03$ ; CTPS:  $\chi^2 = 7.60$ ; df = 2;  $P = 0.02$ ). This finding suggests a survival advantage for *An. gambiae* bearing the *ace-1<sup>R</sup>* mutation in the presence of carbamate-treated substrate. Conversely, there was no evidence for a significantly higher *ace-1<sup>R</sup>* allelic frequency among the live mosquitoes from LLIN + IRS ( $\chi^2 = 2.62$ ; df = 2;  $P = 0.27$ ) and LLIN + CTPS huts ( $\chi^2 = 3.24$ ; df = 2;  $P = 0.20$ ), which suggests the benefits of using combined pyrethroid and carbamate treatments to prevent the selection of *ace-1<sup>R</sup>* allele. No significantly higher *ace-1<sup>R</sup>* allelic frequency was noted among live mosquitoes from LLIN treatment alone ( $\chi^2 = 3.63$ ; df = 2;  $P = 0.16$ ).

## DISCUSSION

In this study, we investigated the combined efficacy of LLIN (PermaNet 2.0) plus an IRS or a CTPS (400 mg/m<sup>2</sup> bendiocarb) against pyrethroid-resistant *An. gambiae*. The results showed a clear benefit for combining the two interventions in terms of blood-feeding inhibition and mortality, which confirms previous laboratory findings.<sup>13</sup> The use of carbamates or organophosphates on treated materials or walls against pyrethroid-resistant *An. gambiae* has been the subject of several studies.<sup>24,25</sup> These insecticides have proved to be good alternatives to pyrethroids against pyrethroid-resistant malaria vectors, but they do not confer the same level of personal protection because of lower irritancy.<sup>11</sup> However, the present study suggests that their use as a complementary method to LLIN within a community may achieve a mass-killing effect of malaria vectors; for example, the estimated overall killing effect (see WHO guidelines 2006 for details) was 23% for LLIN alone compared with 62% for LLIN + IRS and 53% for LLIN + CTPS.

This study also showed that coverage of the upper one-third of the walls of huts with a CTPS provided equal or better efficacy than a full coverage with IRS. This is particularly interesting for human safety and user perception, because the risk of chronic occupational exposure to the CTPS would be reduced. Conventionally, IRS with carbamates lasts 2–6 months,<sup>2</sup> although some studies showed lower persistence under field conditions.<sup>26,27</sup> As suggested by Djènontin and others,<sup>13</sup> binding bendiocarb onto the plastic sheeting strongly increased the residual life of the insecticide and prevented the insecticide from wearing off quickly after washing. The development of long-lasting technology for CTPS is, however, required to ensure cost-effectiveness of this IRM strategy for malaria control.



TABLE 1  
Comparative frequencies of two resistance genes (*kdr* and *ace1<sup>R</sup>*) in *An. gambiae* after exposure to different treatments\*

Treatment	Live <i>kdr</i> frequency (n)	Dead <i>kdr</i> frequency (n)	P	Live <i>ace1<sup>R</sup></i> frequency (n)	Dead <i>ace1<sup>R</sup></i> frequency (n)	P
LLIN	0.92 (30/87)	0.92 (30/67)	1.00	0.12 (30/87)	0.03 (30/67)	0.16
IRS	0.91 (40/174)	0.88 (20/128)	0.53	0.13 (40/174)	0.00 (20/128)	0.03
CTPS	0.92 (33/94)	0.92 (26/104)	1.00	0.15 (33/94)	0.02 (26/104)	0.02
IRS + LLIN	0.90 (30/86)	0.93 (29/170)	0.74	0.09 (29/86)	0.03 (30/170)	0.27
CTPS + LLIN	0.89 (26/56)	0.87 (34/145)	1.00	0.14 (25/56)	0.06 (34/145)	0.20

\**kdr* = knockdown resistance allele; *ace1<sup>R</sup>* = insensitive acetylcholinesterase; CTPS = carbamate-treated plastic sheeting; IRS = indoor residual spraying; LLIN = long-lasting insecticidal nets (Permanet 2.0).

This study also showed a strong decrease in pyrethroid-treated nets performance against pyrethroid-resistant malaria vectors, which confirms previous findings in Benin<sup>9</sup> and Cote d'Ivoire.<sup>28</sup> In our study site (Vallée du Kou, Burkina Faso), a rapid increase in *kdr* allelic frequency (from 0.4 to 0.9) was observed in the molecular M form of *An. gambiae* compared with previous resistance monitoring.<sup>14</sup> If the reason for this sudden increase is unknown, it seems to have a significant impact on LLIN, which is shown by another recent experimental hut trial.<sup>29</sup> In our study, no particular type of selection for the *kdr* resistance was observed. However, the susceptible genotypes were too rare to make conclusions about the effect of any treatment (alone or combined) on the *kdr* selection pressure (i.e., the allele reached a fixation level). Further experimental hut trials should be carried out in areas with lower *kdr* allelic frequency to confirm or deny this trend. Regarding carbamate resistance, we confirmed the presence of the *ace-1<sup>R</sup>* allele (11%) in the molecular M form of *An. gambiae* in the Vallée du Kou.<sup>14</sup> Genotyping of live and dead mosquitoes collected from the huts showed evidence for a significantly higher frequency of *ace-1<sup>R</sup>* allele in those that survived the IRS and CTPS treatments (i.e., *ace-1<sup>R</sup>* heterozygotes showed a survival advantage). This is particularly worrisome considering that large-scale IRS campaigns using bendiocarb are being scaled up in several African countries through the President Malaria Initiative (PMI).<sup>30</sup> Previous hut trials carried out in Cote d'Ivoire showed similar types of selection of the *ace-1<sup>R</sup>* allele by the use of carbamate-treated mosquito nets but not pyrethroid and carbamate "two-in-one" combination nets.<sup>31</sup> Here, the use of LLIN plus IRS or CTPS seemed to indifferently kill mosquitoes having the susceptible or resistant alleles, suggesting that combining the two interventions may be promising for managing carbamate resistance where the *ace-1<sup>R</sup>* is present mainly in its heterozygous form.

Since the advent of pyrethroids in the 1970s, no new major class of active ingredients (AI) has appeared in the pipeline of public-health products. Suppliers estimate that developing a new AI today takes at least 10 years and costs more than \$150 million; additionally, the cost of developing a new AI class might potentially reach \$300 million given the probable higher rates of attrition.<sup>32</sup> This suggests that one cannot expect new public-health chemical classes soon; the key question is how do we maintain and sustain the efficacy of pyrethroids for malaria vector control?

In the short term, the use of non-pyrethroids for IRS over pyrethroids (e.g., bendiocarb, indoxacarb, or chlorfenapyr) should be a priority.<sup>33,34</sup> For example, on the island of Bioko on the West African coast, an IRS campaign with lambda-cyhalothrin failed to curtail an increase in the population of *An. gambiae*, and it required switching to the carbamate bendiocarb before the mosquito population, and malaria, went into

decline.<sup>35</sup> The use of synergists (e.g., piperonyl butoxide [PBO]) to improve the efficacy of LLIN<sup>29,36</sup> should be further explored. Integrated approaches for malaria vector control, either by mixing two unrelated insecticides (including synergists) on the same substrates<sup>15,25</sup> or combining spatially different interventions within dwellings (LLIN + IRS-like treatments), also represent key options for the management of insecticide resistance in malaria-endemic areas. This later strategy is currently being investigated in south Benin through a randomized controlled trial to assess the impact of LLIN alone and in combination with CTPS on malaria incidence and transmission as well as the management of insecticide resistance of malaria vectors.

Received January 7, 2010. Accepted for publication February 25, 2010.

Acknowledgments: The authors thank the Ministère Français des Affaires Étrangères (MAE), Service de Coopération et d'Action Culturelle de Cotonou (SCAC) for funding this work (program REFS number 2006-22). A.D. was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Département Soutien and Formation (student fellowship). We also thank the *Anopheles Biology and Control Network* (ABC) for its technical assistance. The authors thank Dr. G. Hesse from Bayer Environmental Science (Lyon, France) for providing Bendiocarb and the binding agent and Vestergaard Frandsen for providing the PermaNet 2.0.

Authors' addresses: Armel Djènontin, Joseph Chabi, Thierry Baldet, and Vincent Corbel, Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, République du Bénin, E-mails: armeldj@yahoo.fr, joseph.chabi@ird.fr, thierry.baldet@ird.fr, and vincent.corbel@ird.fr. Fabrice Chandre, Institut de Recherche pour le Développement (IRD)/Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Centre Collaborateur, Montpellier Cedex 5, France, E-mail: fabrice.chandre@ird.fr. K. Roch Dabiré, Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)/Centre Muraz (CM), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, E-mail: dabire\_roch@hotmail.com. Raphael N'Guessan, London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM)/Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, République du Bénin, E-mail: Raphael.N'Guessan@lshtm.ac.uk. Martin Akogbéto, Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, République du Bénin, E-mail: akogbetom@yahoo.fr.

## REFERENCES

1. World Health Organization, 2008. *World Malaria Report 2008*. Geneva, Switzerland: WHO.
2. World Health Organization, 2006. *Pesticides and Their Application for the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance*. WHO.
3. Lengeler C, 2004. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* CD000363.
4. Kolaczinski K, Kolaczinski J, Kilian A, Meek S, 2007. Extension of indoor residual spraying for malaria control into high transmission settings in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 852–853.
5. Yukich JO, Lengeler C, Tediosi F, Brown N, Mulligan JA, Stevens DC, Justino J, Conteh L, Maharaj R, Erskine M, Mueller DH,

- Wiseman V, Ghebremeskel T, Zerom M, Goodman C, McGuire D, Urrutia JM, Sakho F, Hanson K, Sharp B, 2008. Costs and consequences of large-scale vector control for malaria. *Malar J* 7: 258.
6. Zaim M, Aitio A, Nakashima N, 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 14: 1–5.
  7. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, della Torre A, 2008. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J* 7: 74.
  8. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevale P, 2005. Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 73: 859–864.
  9. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M, 2007. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in a pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* 13: 199–206.
  10. Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, Carnevale P, 2001. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol* 15: 105–112.
  11. Curtis CF, Mnzava AE, 2000. Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bull World Health Organ* 78: 1389–1400.
  12. Miller JE, Lindsay SW, Armstrong JR, 1991. Experimental hut trials of bednets impregnated with synthetic pyrethroid or organophosphate insecticide for mosquito control in The Gambia. *Med Vet Entomol* 5: 465–476.
  13. Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pennetier C, Hougard J-M, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F, 2009. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J* 8: 233.
  14. Dabire KR, Diabate A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouedraogo JB, Hougard JM, Chandre F, Baldet T, 2008. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in south-western Burkina Faso. *Malar J* 7: 188.
  15. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabire RK, Lapiéd B, Chandre F, Hougard JM, 2008. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis* 14: 1707–1714.
  16. World Health Organization, 2005. *Guideline for Laboratory and Field Testing of Long Lasting Mosquito Nets*. Geneva, Switzerland: WHO.
  17. World Health Organization, 2006. *Guidelines for Testing Mosquito Adulticides Intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs)*. Geneva, Switzerland: WHO.
  18. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520–529.
  19. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C, 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 10: 19–23.
  20. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D, 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7: 179–184.
  21. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M, 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13: 1–7.
  22. Addinsoft, 2009. *XLSTAT, Data Analysis and Statistics with Microsoft Excel*. Paris, France: Addinsoft.
  23. Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248–249.
  24. Curtis CF, Myamba J, Wilkes TJ, 1996. Comparison of different insecticides and fabrics for anti-mosquito bednets and curtains. *Med Vet Entomol* 10: 1–11.
  25. Hougard JM, Corbel V, N'Guessan R, Darriet F, Chandre F, Akogbeto M, Baldet T, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, 2003. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res* 93: 491–498.
  26. Ansari MA, Razdan RK, 2004. Impact of residual spraying of bendiocarb against the malaria vector *Anopheles culicifacies* in selected villages of the Ghaziabad District, Uttar Pradesh, India. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 418–423.
  27. Mpfu SM, Kanyimo KH, Masendu H, 1991. Potential use of bendiocarb (FICAM VC) for malaria control in area of Zimbabwe. *J Am Mosq Control Assoc* 7: 536–542.
  28. N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P, 2001. Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire. *Med Vet Entomol* 15: 97–104.
  29. World Health Organization, 2009. *Report of the Twelfth WHOPES Working Group Meeting*. Geneva, Switzerland: WHO.
  30. President Malaria Initiative, 2009. *Third Annual Report*. Atlanta, GA: President Malaria Initiative.
  31. Corbel V, Hougard JM, N'Guessan R, Chandre F, 2003. Evidence for selection of insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase by carbamate-treated nets in *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire. *J Med Entomol* 40: 985–988.
  32. Bill and Melinda Gates Foundation, 2007. *Market Assessment for Public Health Pesticide Products, a Report by the Bill and Melinda Gates Foundation and the Boston Consulting Group*. Washington, DC: Bill and Melinda Gates Foundation.
  33. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Knols B, Akogbeto M, Rowland M, 2009. Control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with chlorfenapyr in Benin. *Trop Med Int Health* 14: 389–395.
  34. N'Guessan R, Corbel V, Bonnet J, Yates A, Asidi A, Boko P, Odjo A, Akogbeto M, Rowland M, 2007. Evaluation of indoxacarb, an oxadiazine insecticide for the control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 44: 270–276.
  35. Sharp BL, Ridl FC, Govender D, Kuklinski J, Kleinschmidt I, 2007. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malar J* 6: 52.
  36. Van Bortel W, Chinh VD, Berkvens D, Speybroeck N, Trung HD, Coomans M, 2009. Impact of insecticide treated nets on wild pyrethroid resistant *Anopheles epiroticus* population from southern Vietnam tested in experimental huts. *Malar J* 8: 248.

RESEARCH

Open Access

# *Culicidae* diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study

Armel Djènontin<sup>1,2\*</sup>, Sahabi Bio-Bangana<sup>1</sup>, Nicolas Moiroux<sup>2</sup>, Marie-Claire Henry<sup>2,4</sup>, Olayidé Bousari<sup>2</sup>, Joseph Chabi<sup>2</sup>, Razaki Ossè<sup>1</sup>, Sébastien Koudénoukpo<sup>1</sup>, Vincent Corbel<sup>2</sup>, Martin Akogbéto<sup>1</sup>, Fabrice Chandre<sup>3</sup>

## Abstract

**Background:** To implement an Insecticide Resistance Management (IRM) strategy through a randomized controlled trial (phase III), 28 villages were selected in southern Benin. No recent entomological data being available in these villages, entomological surveys were performed between October 2007 and May 2008, before vector control strategies implementation, to establish baseline data.

**Methods:** Mosquitoes were sampled by human landing collection (16 person-nights per village per survey per village) during 5 surveys. Mosquitoes were identified morphologically and by molecular methods. The *Plasmodium falciparum* circumsporozoite indexes were measured by ELISA, and the entomological inoculation rates (EIRs) were calculated. Molecular detection of pyrethroid knock down resistance (*Kdr*) and of insensitive acetylcholinesterase were performed.

**Results:** 44,693 mosquitoes belonging to 28 different species were caught from October 2007 to May 2008. Among mosquitoes caught, 318 were *An. gambiae s.s.*, 2 were *An. nili*, 568 were *An. funestus s.s.*, and one individual was *An. lesoni*. EIR was  $2.05 \pm 1.28$  infective bites per human per 100 nights on average, of which  $0.67 \pm 0.60$  were from *An. funestus* and  $1.38 \pm 0.94$  infective bites were from *An. gambiae*. Important variations were noted between villages considering mosquito density and malaria transmission indicating a spatial heterogeneity in the study area. The *kdr* allelic frequency was 28.86% in *An. gambiae s.s.* on average and significantly increases from October 2007 (10.26%) to May 2008 (33.87%) in M molecular form of *An. gambiae s.s.* *Ace 1* mutation was found in S molecular of *An. gambiae s.s.* at a low frequency (< 1%).

**Conclusion:** This study updates information on mosquito diversity and malaria risk in rural villages from south Benin. It showed a high spatial heterogeneity in mosquito distribution and malaria transmission and underlines the need of further investigations of biological, ecological, and behavioral traits of malaria vectors species and forms. This study is a necessary prerequisite to cartography malaria risk and to improve vector control operations in southern Benin.

## Background

Malaria remains a major cause of morbidity and mortality in sub-Saharan Africa and represents one of the most critical public health challenges for Africa. In 2008, 243 million cases of malaria was estimated worldwide leading to 863 000 deaths of which 89% were in the African

Region [1]. Treatment with Artemisinin Combination Therapy (ACT), the use of Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) represent the main approaches of malaria control [1]. Household ITNs ownership reached more than 50% in several high burden African countries [1]. Pyrethroids are the only insecticides used for net impregnation because of their strong efficacy, their fast acting effect at low doses and their low toxicity for mammals [2]. Unfortunately, pyrethroids resistance in malaria vectors has spread across Africa and

\* Correspondence: armeldj@yahoo.fr

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

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

is now present in most of countries where national malaria control programmes (NMCP) are implementing large scale distribution of Long Lasting Nets to populations at risk, i.e. children under five and pregnant women [3]. Up to now, there is no evidence that pyrethroids resistance reduce the effectiveness of ITNs for malaria control at operational scale [4]. However, a small scale field trial carried out in an area of resistance in southern Benin (Ladji) and Burkina Faso (Kou Valley) showed a reduction of personal protection and overall insecticidal effect of ITNs in experimental huts [5-7].

It is then urgent to find ways to manage this resistance in malaria vectors. In this context, malaria vectors control and insecticide resistance management tools based on the use (alone or in combination with pyrethroid-treated mosquito nets) of alternative classes of insecticides with different mode of action than pyrethroids were developed and have already been evaluated in experimental huts, with good results against wild populations of strongly resistant *An. gambiae* [6,7].

To validate these strategies, their impact on malaria transmission and insecticide resistance dynamic in malaria vectors must be assessed through randomized controlled trials under phase III. For that purpose, 28 villages were selected in Ouidah-Kpomasse-Tori (OKT) health district in southern Benin. No entomological data from OKT health district was available. Recent data relative to *Culicidae* fauna of Benin go back up to 1950s [8,9]. Thus, in order to collect baseline data relative to mosquito's diversity and abundance, malaria transmission and the prevalence of insecticide resistance alleles in malaria vectors, entomological surveys were performed between October 2007 and May 2008 in the study area before implementing the vector control strategies. This paper reports these baseline data.

## Methods

### Study area

The study was carried out in OKT health district. Twenty eight villages were selected considering a size between 250-500 inhabitants, a distance between two villages higher than two kilometers and the absence of a local health center. The OKT health district is one of 36 health districts in Benin. This district has essentially a sub-equatorial climate, with two dry seasons (August-September and December-March), and two rainy seasons (April-July and October-November). The average annual rainfall is around 1200 mm, of which 700-800 mm come in the first rainy season and 400-500 mm come in the second rainy season. The average monthly temperatures vary between 27 and 31°C. The northern part of the health district is made of a plateau that drops into the Couffo

valley and the Allada depression. The southern is watered by several ramification arms of Toho Lake (Fig 1). The study zone is totally cleared of the original equatorial forest. Currently, the vegetation is characterized by bushes and isolated trees, associated with areas with more or less densely populated areas with oil palm trees.

### Mosquito's collection and identification

Sampling of mosquitoes was done in 28 villages by human landing catches using tubes that were plugged with cotton. Mosquitoes collection was carried out during 5 surveys from October 2007 to May 2008 (2 in the beginning of rainy periods and 3 in dry periods) every 6 weeks both indoors and outdoors at 4 sites per village from 10 p.m. to 6 a.m. and for two consecutive nights per survey (i.e. 16 person-nights per village per survey). Teams of collectors were rotated among the collection points on different collection nights to minimize sampling bias. Ethical clearance was given for the study by the National Ethical Committee in Benin (Comité National Provisoire d'Ethique pour la Recherche en Santé) and IRD ethical committee (Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique). Collectors gave prior informed consent and they were vaccinated against yellow fever. Since study was done in area where malaria is endemic, adult collectors that already acquired immunity against malaria parasites, did not received chemoprophylaxis, but were medically supervised by local physicians in case of illness.

Mosquitoes were identified on the field to species level using morphological criteria according to the identification keys [10-12]. All mosquitoes belonging to the *An. gambiae* complex or *An. funestus* group were stored in individual tubes with silica gel and preserved at -20°C in the laboratory.

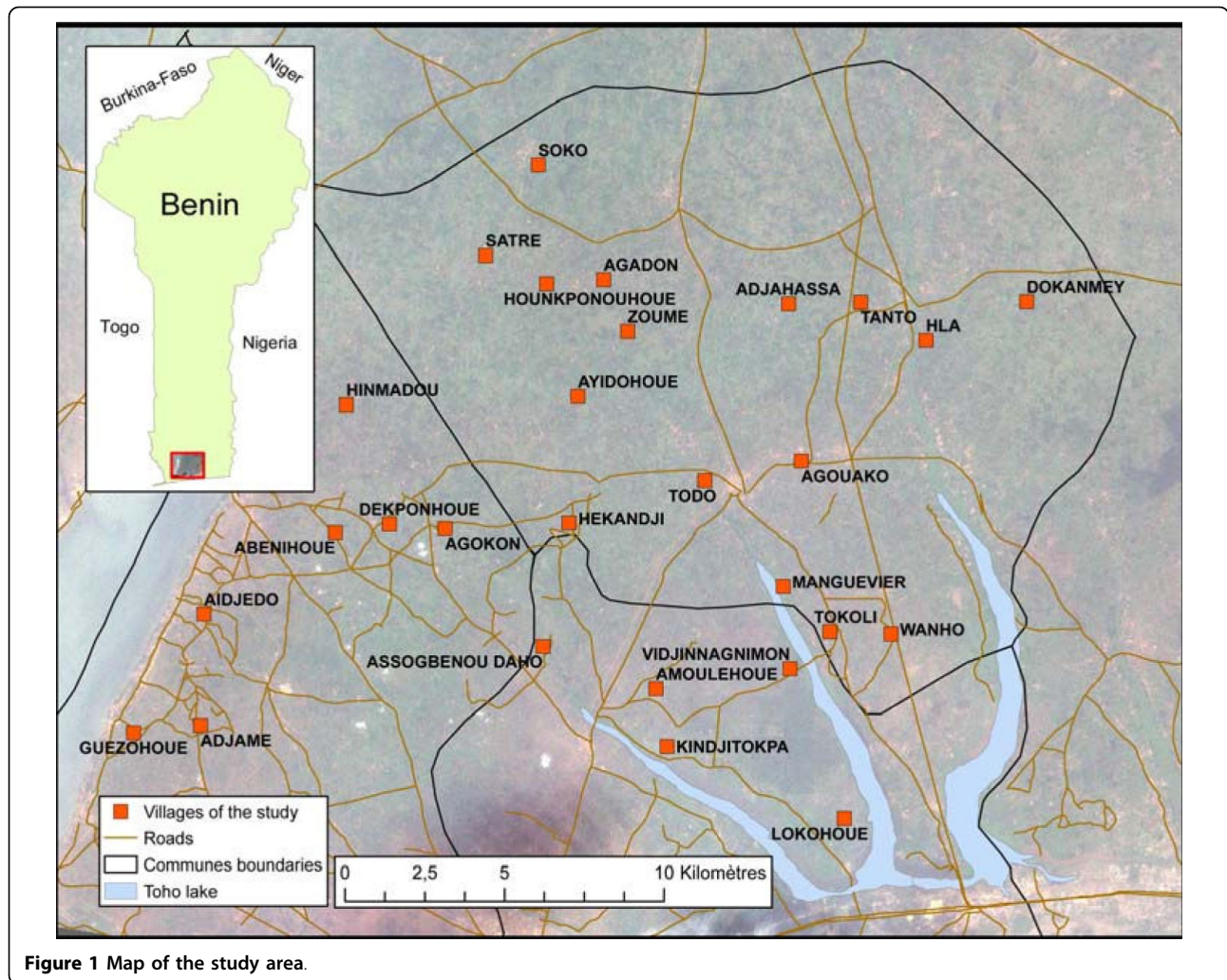
### Determination of EIRs

Heads and thoraces of anopheline females were tested by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of *P. falciparum* circumsporozoite protein (CSP), as previously described [13]. Samples having an optical density higher than 3 times the average of the optical density of negative control were considered as positive. Those having an optical density between 2 and 3 times this average were considered as doubtful and were retested.

The CSP index was calculated as the proportion of mosquitoes found to be positive for CSP. Entomological inoculation rates (EIRs) were estimated as the number of infective bites per human per 100 nights.

### Molecular analysis

All mosquitoes belonging to *An. gambiae* complex and *Anopheles funestus* group were identified by polymerase chain reaction (PCR) at the species levels [14,15].



**Figure 1** Map of the study area.

Molecular forms in *Anopheles gambiae s.s.* were also identified [16].

Molecular characterizations of the *Kdr* (west-African Leu-Phe mutation) and *Ace1* mutations were carried out on all mosquitoes belonging to *An. gambiae* complex as previously described [17,18]

### Statistical analysis

Chi-square tests were done to determine the odds of association of the CSP index with malaria vectors *An. gambiae* and *An. funestus*.

Data relative to mosquito's density and EIRs according to villages were analyzed using a Linear Mixed Effects (LME) model implemented in R software and written as follow:

$$\text{Log}(x) = \beta_0 + \beta_{1i} + a_i, \text{ where:}$$

$x$  = means of mosquitoes number (or EIRs) per village per survey

$\beta_0$  = estimated value of coefficient associated to the reference village

$\beta_{1i}$  = estimated value of coefficient associated to a village  $i$

$a_i$  = intra-village variance

$i$  = village index

Villages were grouped according to their homogeneity for the entomological indicator considered taking into account  $\beta_i$  and its P value. In each group, the average of the number of mosquitoes caught per village per survey (or the number of infective bites per human per 100 nights) was calculated with its 95% confidence interval.

The genotypic differentiation of *kdr* and *Ace1* loci was tested using the Fischer exact test implemented in GenePop software [19].

### Results

#### Species diversity and density

A total of 44,693 mosquitoes belonging to 28 species were caught (table 1). *Mansonia Africana* (44.84%), *Culex gr. decens* (29.91%), *Culex quinquefasciatus* (9.81%), and *Culex nebulosis* (6.22%) were the most

**Table 1 Mosquitoes species caught from October 2007 to May 2008 in the study area**

Species	Indoor	Outdoor	Total	%
<i>Aedes aegypti</i>	388	318	706	1.58
<i>Aedes gr. palpalis</i>	12	28	40	0.09
<i>Aedes gr. tarsalis</i>	4	4	8	0.02
<i>Aedes luteocephalus</i>	21	41	62	0.14
<i>Aedes sp</i>	13	37	50	0.11
<i>Aedes vittatus</i>	199	396	595	1.33
<i>Anopheles brohieri</i>	1	0	1	0.00
<i>Anopheles coustani</i>	3	5	8	0.02
<i>Anopheles funestus</i>	314	265	579	1.30
<i>Anopheles gambiae</i>	149	173	322	0.72
<i>Anopheles nili</i>	1	1	2	0.00
<i>Anopheles pharoensis</i>	60	135	195	0.44
<i>Anopheles ziemanni</i>	12	20	32	0.07
<i>Culex annulirois</i>	185	428	613	1.37
<i>Culex duttoni</i>	36	18	54	0.12
<i>Culex fatigans</i>	270	436	706	1.58
<i>Culex gr. decens</i>	4720	8649	13369	29.91
<i>Culex nebulosis</i>	1040	1738	2778	6.22
<i>Culex perfuscus</i>	2	0	2	0.00
<i>Culex poicilipes</i>	2	14	16	0.04
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1170	3213	4383	9.81
<i>Culex tigripes</i>	17	38	55	0.12
<i>Cx sp</i>	17	17	34	0.08
<i>Cx thalassius</i>	10	16	26	0.06
<i>Eretmapodites gr. quinquevittatus</i>	0	3	3	0.01
<i>Mansonia africana</i>	7652	12390	20042	44.84
<i>Mansonia uniformis</i>	7	4	11	0.02
<i>Uranotaenia gr bilineata</i>	1	0	1	0.00
Total	16306	28387	44693	

abundant species caught. The proportion of malaria vectors (*Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*) was very low (~2%).

All mosquitoes belonging to *Anopheles gambiae s.l.*, were *An. gambiae s.s.* (217 from S molecular form and 101 from M form). Concerning *Anopheles funestus* group all mosquitoes were identified by PCR as *Anopheles funestus s.s.* except one individual which was *An. leesoni*, caught in Tokoli-Vidjinangnimon village.

Large variations were observed between villages considering mosquito's density. An average of  $212 \pm 46$  *Culicidae* per village per survey and  $531 \pm 139$  *Culicidae* per village per survey were caught in two different homogenous villages groups (Table 2). Concerning *An. gambiae s.l.* on average  $0.4 \pm 0.2$ ;  $1.8 \pm 0.6$  and  $7.4 \pm 3.5$  individuals were caught per village per survey in three different homogenous villages groups (Table 3). In villages close to a arm of the Toho Lake,  $13.48 \pm 5.9$  *An. funestus s.l.* were caught on average per village per

**Table 2 Average of *Culicidae* number caught per survey per village from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals**

Villages groups	Average <i>Culicidae</i> number per survey per village with 95% confidence intervals
<b>Group 1:</b> Agouako; Assogbenoudaho; Guezohoue; Hla; Todo; Zoume; Adjahassa; Satre; Agadon; Aidjedo; Ayidohoue; Dokanme; Tokoli Vidjinangnimon; Hekandji; Hounkponouhou; Dekponhoue; Soko; Wanho; Tokoli; Tanto	$212 \pm 46$
<b>Group 2 :</b> Lokohoue; Tokoli Vidjinangnimon; Manguevier; Adjame-Allagbede; Amoulehoue; Kindjitokpa; Abenihoue; Hinmandou	$531 \pm 139$

survey, in contrast with  $0.29 \pm 0.1$  in the others villages (Table 4).

#### Vectors infection to CSP and malaria transmission risk

The CSP positivity rate was  $9.63 \pm 3.2\%$  in *An. gambiae s.s.* ( $5.94 \pm 0.4\%$  in M molecular form and  $11.52 \pm 0.2\%$  in S form) and  $2.64 \pm 1.3\%$  in *An. funestus s.l.*. *An. gambiae s.s.* was more infected than *An. funestus s.l.* (OR = 4.00 (95%IC 2.13-7.54),  $P < 0.001$ ). The average of EIR from October 2007 to May 2008 was  $2.05 \pm 1.28$  infective bites per human per 100 nights of which  $0.67 \pm 0.60$  infective bites of *An. funestus* per human per 100 nights and  $1.38 \pm 0.94$  infective bites of *An. gambiae* per human per 100 nights. EIR was very variable according to villages. Two homogenous villages groups with respectively  $0.7 \pm 0.4$  and  $6.1 \pm 3.4$  infective bites per human per 100 nights were observed (Table 5).

**Table 3 Average of *An. gambiae s.l.* number caught per survey per village from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals**

Villages groups	Average <i>An. gambiae s.l.</i> number per survey per village with 95% confidence intervals
<b>Group 1:</b> Adjame-Allagbede; Agouako; Assogbenoudaho; Kindjitokpa; Guezohoue; Hinmandou; Hla; Abenihoue; Todo; Zoume	$0.4 \pm 0.2$
<b>Group 2:</b> Adjahassa; Satre; Lokohoue; Agadon; Aidjedo; Ayidohoue; Dokanme; Tokoli Vidjinangnimon; Hekandji; Agokon; Hounkponouhou; Dekponhoue; Manguevier	$1.8 \pm 0.6$
<b>Group 3:</b> Amoulehoue; Soko; Tokoli; Tanto; Wanho	$7.4 \pm 3.5$

**Table 4 Average of *An. funestus s.l.* number caught per survey per village from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals**

Villages groups	Average <i>An. funestus s.l.</i> number per survey per village with 95% confidence intervals
<b>Group 1:</b> Adjame-Allagbede; Agouako; Assogbenoudaho; Guezohoue; Hinmandou; Hla; Abenihoue; Todo; Zoume; Adjahassa; Satre; Agadon; Agokon; Aidjedo; Ayidohoue; Dokanme; Hekandji; Hounkponouhou; Dekponhou; Soko	0.29 ± 0.1
<b>Group 2:</b> Amoulehoue; Tokoli; Tanto; Lokohoue; Manguevier; Kindjitokpa; Tokoli Vidjinangnimon; Wanho	13.48 ± 5.9

#### *Kdr* resistance gene status in *An. gambiae*.

The average of *kdr* allelic frequency from October 2007 to May 2008 was 28.86% in *An. gambiae s.s.* At the beginning of the study (From October to December 2007), *kdr* allelic frequency was significantly higher in S molecular form of *An. gambiae s.s.* (28.08%) compared to the M molecular form (10.26%) ( $P = 0.001$ ). This allelic frequency significantly increased in the M molecular form and has reached 33.87% ( $P < 0.001$ ) from January to May 2008 (Table 6).

#### Insensitive acetylcholinesterase gene status in *An. gambiae s.l.*

The allelic frequency of this gene was less than 1%. Only two heterozygous individuals was found in the S molecular form of *An. gambiae s.s.* at Tanto and Hekandji during October 2007.

#### Discussion

The present study provides entomological baseline data on OKT health district. Twenty eight different species

**Table 5 Number of infective bites per human per 100 nights from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals**

Villages groups	Number of infective bites per human per 100 nights with 95% confidence intervals
<b>Group 1 :</b> Adjame; Agouako; Aidjedo; Assogbenoudaho; Ayidohoue; Adjahassa; Dokanme; Kindjitokpa; Guezohoue; Hinmandou; Hla; Hounkponouhou; Abenihoue; Dekponhou; Manguevier; Satre; Todo; Tokoli; Wanho; Agadon; Zoume	0.7 ± 0.4
<b>Group 2 :</b> Amoulehoue; Tokoli Vidjinangnimon; Hekandji; Agokon; Soko; Lokohoue; Tanto	6.1 ± 3.4

**Table 6 *kdr* in M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* from October 2007 to May 2008 in the study area**

	October-December 2007		January-May 2008	
	M form	S form	M form	S form
RR	0	10	13	16
RS	8	62	16	20
SS	31	74	33	35
Total	39	146	62	71
Allelic frequency (%)	<b>10.26<sup>a</sup></b>	<b>28.08<sup>b</sup></b>	<b>33.87<sup>b</sup></b>	<b>36.62<sup>b</sup></b>

*Kdr* allelic frequency values carrying the same letter was not significantly different ( $P > 0.05$ )

were caught during surveys whereas Huttel (1950) and Hamon (1954) had collected respectively 13 species (adult's collection in the dwellings) and 45 species (adult and larval collection) in the south-east of Benin (Cotonou and Porto-Novo) [8,9]. If the *Culicidae* diversity is lower in our study, we have identified 3 *Anopheles* species that was not mentioned in Hamon study: *An. brohieri*, *An. coustani* and *An. nili*. These 3 species were present at very low densities, explaining why they were not reported previously. More unexpected is the predominance in our study of *Mansonia africana* and the presence of *Cx. quinquefasciatus* that were not reported by Hamon. The relative abundance of *Cx. quinquefasciatus* is particularly surprising for a species which is adapted to polluted larval breeding sites and usually more familiar with urban environment than traditional villages from this study. Results showed a high heterogeneity of the study area in terms of *Culicidae* and especially malaria vectors abundance. It could be due to the geographic pattern of this area that is characterized by a northern part made of a plateau and the southern watered by several ramification arms of Toho Lake. *An. funestus* density was higher in villages close to arms of Toho Lake (< 2 km), since some of its larval breeding sites are the bank of lake or river with vegetation. In most villages of the study area, the soil is made of a thick bed of a mixture of sand and clay allowing a rapid water infiltration after rain. This impedes the formation of *An. gambiae* larval breeding sites that could explain the low density of malaria vectors. However, on the 5 surveys conducted in each village, only two were conducted during a rainy period (in the beginning of the rainy periods). This could explain the very low number of anopheles vectors caught during the study. Further studies conducted on a long period and taking into account environmental factors are required to better understand mosquito's distribution determinants in this area.

*Anopheles gambiae s.s.* and *An. funestus s.s.* were shown to be the main vectors in the study area, confirming previous studies in West Africa [20-22]. The

relative abundance of *An. funestus* in the study area and its CSP positivity rate ( $2.64 \pm 1.3$ ) indicate that this mosquito is involved in malaria transmission in southern Benin. No data relative to resistance status and mechanisms of this vector being available in Benin, further studies about *An. funestus* populations and their resistance mechanisms are required. The EIR,  $2.05 \pm 1.28$  infective bites per human per 100 nights on average, indicates that in the study area, malaria is mesoendemic. These data agree with parasitological and clinical data collected in the same way in these villages indicating an annual prevalence rate of 21.8% (19.1-24.4) in young asymptomatic children and a clinical incidence of *Plasmodium falciparum* malaria of 1.5 (1.2-1.9) per child per year (Damien *et al.* 2010, unpublished data).

The *kdr-w* resistance allele was identified in *An. gambiae* populations examined in this study and have significantly increased from October 2007 to May 2008 in M molecular form in contrast with S form, indicating probably that M and S molecular forms of this vector undergo different selection pressures in the study area and underlines the need of further studies taking into account ecological and others factors. The presence of the *kdr-w* allele in *An. gambiae s.s.* and the increase of its frequency are worrying because this gene and metabolic resistance mechanisms in southern Benin appears to have a significant impact on LLIN efficacy as demonstrated by recent experimental hut trial [23]. Many other studies have showed a strong decrease of Pyrethroid-Treated Nets performance against pyrethroid-resistant malaria vectors in Benin [5,6], Burkina Faso [7], and Côte d'Ivoire [24].

Regarding carbamate resistance, we confirmed the low allelic frequency of the *ace-1<sup>R</sup>* allele (< 1%) in *An. gambiae s.s.* in West Africa [25], showing that there is no (or very low) selection pressure on this allele in the study area. However, a monitoring of this resistance gene is required considering the large scale implementation of Indoor Residual Spraying using bendiocarb by President's Malaria Initiative program in south Benin that will inevitably increase the selection pressure on vectors populations.

## Conclusion

This study updates information on mosquito's distribution and their role in malaria transmission in southern Benin. It showed a high spatial heterogeneity in mosquitoes distribution and malaria transmission and then underlines the need of further investigations of biological, ecological, and behavioral traits of malaria vectors species and forms. That will allow to cartography

malaria risk and then to improve vector control interventions in Benin.

## Acknowledgements

We thank the Ministère Français des Affaires Etrangères for project REFS N° 2006-22 and the Institut de Recherche pour le Développement, which financially and materially supported the work. We thank populations of the study area, OKT health district, for their collaboration. We also thank Seth Irish for his linguistic assistance while drafting this manuscript.

## Author details

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, Bénin. <sup>2</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD/UR016), 01 BP 4414 Cotonou, Bénin. <sup>3</sup>Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN/IRD), 911 Ave Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. <sup>4</sup>Service de Coopération française, Ambassade de France, Cotonou, Bénin.

## Authors' contributions

FC and M-CH conceived of the study. AD, JC and FC have participated in the design of the study. Entomologic data was collected by AD, JC, RO, SK, AD, SK and RO carried laboratory analysis. AD, FC, OB and VC have participated in the analysis and interpretation of data. Maps were provided by SBB and NM. The manuscript has been drafted by AD, AD, SBB, NM, M-CH, OB, JC, RO, SK, VC, MA and FC have been involved in manuscript revising. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 14 July 2010 Accepted: 6 September 2010

Published: 6 September 2010

## References

1. WHO: **World Malaria Report 2009**. World Health Organization, Geneva 2009.
2. Zaim M, Aitio A, Nakashima N: **Safety of pyrethroid-treated mosquito nets**. *Med Vet Entomol* 2000, **14**:1-5.
3. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, della Torre A: **Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa**. *Malar J* 2008, **7**:74.
4. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevale P: **Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire**. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:859-864.
5. 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.
6. Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Penetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F: **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets**. *Malar J* 2009, **8**:233.
7. Djènontin A, Chandre F, Dabiré KR, Chabi J, N'Guessan R, Baldet T, Akogbeto M, Corbel V: **The Indoor Use of Plastic Sheetting Impregnated with Carbamate in Combination with Long Lasting Insecticidal Mosquito Nets for the Control of Pyrethroid-resistant Malaria**. *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83**:266-270.
8. Huttel J: **Note sur la répartition des moustiques dans le Bas-Dahomey**. *Bull Soc Path Exot* 1950, **43**:563-566.
9. Hamon J: **Contribution à l'étude des Culicidés de la région de Porto-Novo (Bas-Dahomey)**. *Ann parasitologie* 1954, **29**:588-594.
10. Edwards F: **Mosquitoes of the Ethiopian Region III. Culicine adults and pupae**. *British Museum (Nat Hist), London* 1941.
11. Gillies MT, De Meillon BL: *The Anophelinae of Africa south of the Sahara* Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg 1968, 54.



12. Gillies MT, Coetzee M: *A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region)* Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg 1987, 55.
13. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot T, 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.
14. 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.
15. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M: **A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:804-811.
16. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C: **Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2001, **10**:19-23.
17. 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 (*knr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
18. 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.
19. Raymond M, Rousset F: **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** *J Heredity* 1995, **86**:248-249.
20. Akogbeto M: **Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake.** *Ann Soc Belg Med Trop* 1995, **75**:219-227.
21. Fontenille D, Simard F: **Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, **27**:357-375.
22. Louise A, Kelly-Hope L, Ellis McKenzie F: **The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa.** *Malar J* 2009, **8**:19.
23. WHO: **Report of the twelfth WHOPEP Working group meeting.** *WHO/HTM/NTD/WHOPEP* 2009, **1**.
24. N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P: **Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire.** *Med Vet Entomol* 2001, **15**:97-104.
25. Djogbénou L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM, Chandre F: **Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:298-302.

doi:10.1186/1756-3305-3-83

**Cite this article as:** Djènontin *et al.*: *Culicidae* diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasites & Vectors* 2010 **3**: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](http://www.biomedcentral.com/submit)



RESEARCH

Open Access

# Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin

Georgia B Damien<sup>1\*</sup>, Armel Djènontin<sup>1,2</sup>, Christophe Rogier<sup>3</sup>, Vincent Corbel<sup>1,2</sup>, Sahabi B Bangana<sup>1</sup>, Fabrice Chandre<sup>4</sup>, Martin Akogbéto<sup>1</sup>, Dorothee Kindé-Gazard<sup>5</sup>, Achille Massougboji<sup>5</sup>, Marie-Claire Henry<sup>1,6</sup>

## Abstract

**Background:** This study aimed to investigate baseline data on malaria before the evaluation of new vector control strategies in an area of pyrethroid-resistance of vectors. The burden of malaria was estimated in terms of infection (prevalence and parasite density) and of clinical episodes.

**Methods:** Between December 2007 and December 2008 in the health district of Ouidah - Kpomassè - Tori Bossito (southern Benin), a descriptive epidemiological survey of malaria was conducted. From 28 selected villages, seven were randomized from which a total of 440 children aged 0 to 5 years were randomly selected. Clinical and parasitological information was obtained by active case detection of malaria episodes carried out during eight periods of six consecutive days scheduled at six weekly intervals and by cross-sectional surveys of asymptomatic infection. Entomological information was also collected. The ownership, the use and the correct use of long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) were checked over weekly-survey by unannounced visits at home in the late evening.

**Results:** Mean parasite density in asymptomatic children was 586 *P. falciparum* asexual forms per  $\mu\text{L}$  of blood (95% CI 504-680). Pyrogenic parasite cut-off was estimated 2,000 *P. falciparum* asexual blood forms per  $\mu\text{L}$ . The clinical incidence of malaria was 1.5 episodes per child per year (95%CI 1.2-1.9). Parasitological and clinical variables did not vary with season. *Anopheles gambiae s.l.* was the principal vector closely followed by *Anopheles funestus*. Entomological inoculation rate was 5.3 (95%CI 1.1-25.9) infective bites per human per year. Frequency of the L1014F *kdr* (West) allele was around 50%. Annual prevalence rate of *Plasmodium falciparum* asymptomatic infection was 21.8% (95%CI 19.1-24.4) and increased according to age. Mean rates of ownership and use of LLINs were 92% and 70% respectively. The only correct use of LLINs (63%) conferred 26% individual protection against only infection (OR = 0.74 (95%CI 0.62-0.87),  $p = 0.005$ ).

**Conclusion:** The health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito is a mesoendemic area with a moderate level of pyrethroid-resistance of vectors. The used LLINs rate was high and only the correct use of LLINs was found to reduce malaria infection without influencing malaria morbidity.

## Background

Despite considerable worldwide efforts made in recent years to control malaria [1], the disease is still a major public health problem with nearly 250 million cases and about one million deaths each year. Eighty five percent of deaths occur among children under five [2] from which nearly all are in sub-Saharan Africa. In 2007, malaria was declared to be the most important disease

in this age group, in Benin, leading to 43% of all medical consultations and 29% of hospital admissions [3]. The National Malaria Control Programme (NMCP) has implemented WHO/GMP's (World Health Organization/Global Malaria Programme) recommended preventive and curative strategies [4]. These include i) Artemisinin combination therapy (ACT) which is dispensed at health centers and has recently been made available to communities for children under five years old; ii) Intermittent preventive treatment (IPT) during pregnancy; iii) Long-lasting insecticide-treated mosquito nets (LLINs) which have continued to be distributed

\* Correspondence: barikiss2000@yahoo.fr

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

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

following the nation-wide deployment among high-risk populations (i.e. children of under five and pregnant women) and iv) Indoor residual spraying (IRS) using carbamate insecticide applied in specific districts through the President's Malaria Initiative [5]. Many studies have demonstrated that the use of insecticide treated nets reduced uncomplicated malaria episodes by at least 50% [6]. Unfortunately, insecticide resistance in malaria vectors has dramatically increased in Africa [7], especially in Benin [8-10] and may seriously compromise the success of vector control management. Two studies conducted in experimental huts in South Benin, where *Anopheles gambiae* was resistant to pyrethroids, have reported that significant reduction in the efficacy of pyrethroids was applied either in treated nets or IRS [11,12]. In order to manage insecticide resistance, the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) in collaboration with the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the NMCP has evaluated successfully (WHOPES phases I and II) a new insecticide resistance management (IRM) strategy combining in the same household a LLIN and a carbamate treated plastic sheeting [13,14]. In the context of a future community-based evaluation of this promising IRM strategy (phase III trial), the malaria burden was evaluated in a health district of southern Benin where a nation-wide distribution of LLINs to children <5 had been implemented in 2007. This study constitutes an analysis of the baseline situation of malaria in terms of infection (prevalence and parasite density) and clinical episodes. Entomological information was also collected.

## Methods

### Site description

This epidemiological study was carried out in the Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito health district in southern

Benin (Figure 1), from December 2007 to November 2008. The population size in the study area was 178,314 inhabitants according to the results of the 3<sup>rd</sup> General Census of the Population and the Environment (RGPH3) of February 2002. The population is rural and lives on agriculture with scattered settlement. The main ethnic group is Aïzo. The climate is essentially sub-equatorial, with two dry seasons (a long dry season from December to March and a short dry season in August and September), and two rainy seasons (a long rainy season from April to July and a short rainy season from October to November). The average annual rainfall is around 1,200 mm, of which 700-800 mm and 400-500 mm rain down respectively in the first and in the second rainy season. The hottest months (31°C) are February to April and the coldest months (27°C) are July to September. Less than 30% of children are present at the health centre when sick. They are mostly treated by traditional medication [15]. A recent survey in Benin indicated that less than half of febrile children <5 were received anti-malarial drugs of which only 7% of cases were given ACT [16,17]. Malaria vectors show resistance to pyrethroids in south of Benin [18].

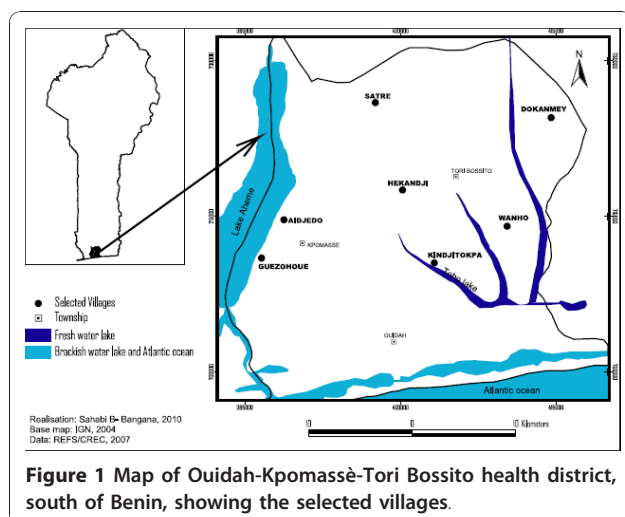
### Sampling

Twenty eight villages were chosen according to the following criteria: having between 250-500 inhabitants, distance between any villages greater than two kilometers and the absence of a local health centre. From these, seven villages were randomly selected. Geographical, demographical and environmental characteristics are described in Table 1. After census, about 60 children aged 0-71 months were randomly selected in each village. They were clinically monitored for a total of 48 days spread over one year. Children born during the study were not included. Ethical clearance was given for the study by the National Ethical Committee in Benin (Comité National Provisoire d'Ethique pour la Recherche en Santé, Reference number IRB00006860) and IRD ethical committee. Mosquito collectors gave their written informed consent and were treated free of charge for malaria presumed illness. They were also vaccinated against yellow fever. Each head of family or the guardian of the selected child gave their written informed consent. During the monitoring periods, all children of villages, whom participating in the study or not to, were treated free of charge by the medical staff.

### Data collection

#### *Parasitological and clinical measures*

Active case detection (ACD) for malaria episodes was carried out during eight periods of six consecutive days at six weeks intervals throughout the year. Each day a nurse assisted by a local village helper trained for the



**Table 1 Description of the study area**

Village	Spatial coordinates		Density of population (People/Km <sup>2</sup> )	Environnemental characteristics				
	Longitude (°C)	Latitude (°C)		Open water cisterns (N)	Swamps*	Distance from lake (fresh water) (Km)	Distance from lagoon (brackish water) (Km)	Distance from health center (Km)
Aïdjèdo	06° 24'	02° 20'	47	2	-	7.9	0.6	3
Dokanmè	06° 33'	02° 13'	61	5	-	0.5	22.6	4
Kindjitokpa	06° 25'	01° 58'	78	0	+	0.1	9.7	2
Guézohoué	06° 29'	02° 05'	91	0	-	11.1	0.5	2
Hékandji	06° 25'	02° 07'	67	4	-	4.0	10.0	5
Satré	06° 34'	02° 04'	45	17	-	13.8	8.5	4
Wanho	06° 27'	02° 11'	63	0	+	2.2	12.2	2

\* Presence of swamps (+) and absence of swamps (-).

study, visited the households in the sample. A physician supervised the field work. The presence or absence and state of health of each child were recorded daily on a specially prepared form (one form per household). The nurse examined and recorded data on every case of sickness detected at home. A thick blood film was taken from every sick child. Children were treated according to the clinical diagnosis made by the nurse. When malaria was suspected, the patient was treated with artemether-lumefantrine for three days according to the recommendations of WHO and NMCP [19,20]. Cross-sectional surveys (CSS) were carried out at each monitoring clinical period (n = 8) on every asymptomatic child (confirmed by axillary temperature < 37.5°C). A thick film sample was taken on the fourth day to be sure that asymptomatic children were free of illness in preceding days. Cross-check quality controls were conducted every six weeks during the collection of field data.

#### Entomological measurements

Data were collected two weeks before each clinical monitoring. Adult mosquitoes were caught using Human Landing Catches (HLC) technique [21]. In the study area, 896 human-nights of capture of human landing mosquitoes were organized every six weeks over a year period (128 nights per village; eight places per village and per night, half indoor and half outdoor). Treated nets were present in the mosquito collection sites. The mosquito species were identified using morphological characteristics according to the identification keys of Gillies & De Meillon [22] and Gillies & Coetzee [23]. All mosquitoes of *An. gambiae* complex and *Anopheles funestus* group were stored in individual tubes with silicagel and preserved at -20°C for *P. falciparum* circumsporozoite index estimation and molecular identification.

#### Control of LLINs

The ownership, the use and the correct use of LLINs (Permanet® 2.0) which were distributed in October 2007

were checked over weekly-survey. The visits of the nurse were unannounced and took place in the late evening around 9.00 PM when children were expected to be asleep [24]. The unannounced visits determined the ownership (whether the LLINs were seen during the control), the use (whether children were sleeping under it during the control) and the correct use (whether the LLINs were correctly hung and tucked and were not torn). The rates of LLINs ownership, use and correct use were calculated relative to the total number of observations.

#### Laboratory examination

Laboratory processing was done at the CREC, Cotonou. Parasitological infection was detected on Giemsa-stained thick smears. Asexual stages of each *Plasmodium* species were counted in the blood volume occupied by 200 leucocytes and parasite density was calculated by assuming 8,000 leucocytes/μL of blood. Thick smears from each village were read by the same experienced technician, under the supervision of a parasitologist. The readings of the two technicians were also compared on the same set of blood samples. Their estimations of parasite detection and parasite density did not differ significantly. Cross-check quality control was regularly done on a randomly selected sample representing 10% of all thick smears.

After scoring field-collected *Anopheles* mosquitoes and identifying the species of each specimen by Polymerase Chain Reaction (PCR) [25], the presence and relative frequency of the molecular M and S forms of *An. gambiae sensu stricto* (s.s) were determined according to the method of Favia [26]. Infection of mosquitoes was determined on the head and thorax of individual vector specimens by ELISA using monoclonal antibodies against *P. falciparum* circumsporozoite protein (CSP) [27]. The method of Martinez-Torrez was used for the molecular detection of the L1014F *kdr* allele [28].

### Data analysis

Demographic, parasitological, clinical and entomological data were double entered independently in the Access 2003 database. Parasitological and clinical data were analyzed using the `svy` command (STATA 11.0). For each person only one blood sample per monitoring period was considered for analysis. When a pathological condition was detected, the blood sample taken during the clinical episode was retained for analysis. Parasitological data were analyzed separately in terms of prevalence of *P. falciparum* asexual blood forms, density of *P. falciparum* asexual blood forms in parasite positive blood thick films and prevalence of *P. falciparum* gametocytes. A generalized estimating equation (GEE) approach, which can be used with normal distributions and discrete data was used for statistical analysis of repeated measures. To take into account the interdependence of observations made on the same person, an exchangeable correlation structure was used in which the correlation between these observations made on one person at different times was assumed to be the same. The prevalence of asymptomatic malaria infections was analyzed as a binomial response by using a logistic regression model. The parasite density was log transformed for a normally distributed response and analyzed with a link function by using a linear regression model.

The association between the parasite density and the occurrence of clinical episodes was tested using a Poisson regression model, taking clinical status (pathological episode *versus* asymptomatic state) as the dependent variable, and parasite density as the independent variable. In this type of model, a random intercept variable is allowed to vary with subjects, and this random subject-specific intercept allows the interdependence of the observations made on the same person to be taken into account. For each pathological period, the probability that it was caused by malaria was estimated by the Attributable Fraction (AF) calculated from the odds ratios associated with the estimated parasite density in the logistic model [29,30]. The pathological episodes were clinically defined by a high axillary temperature ( $\geq 37.5^\circ\text{C}$ ), sweats, shivers, headaches, nausea or vomiting [31] or by a history of fever during the 48 hours preceding the first day of ACD or, for infants under one year of age, anorexia or any pathological condition described by the mother [32,33]. For individuals, the number of malaria attacks over a given periods was estimated by the sum of probabilities that pathological episodes were due to malaria, depending on the parasite density. The malaria incidence rate was calculated dividing the ratio of pathological episodes attributable to malaria by the number of child-days.

The three dependent variables (i.e. prevalence rate of *P. falciparum* infection, mean parasite density in positive

children and clinical incidence rate) were analyzed according to demographic (age groups 0-23, 24-59, 60-71 months and sex), environmental (season and villages) and sanitary (LLIN's ownership, use and good use) variables. The  $\text{Chi}^2$  test was used to compare the rate of ownership, use and correct use of LLINs. An optimum pyrogenic parasite density cut-off was calculated using the estimated AFs with a logistic model. The sensitivity and the specificity were similarly determined [34]. The sensitivity was estimated by the ratio of malaria episodes with positive cut-off to a total of malaria episodes. The specificity was estimated by the ratio of no malaria febrile episodes with parasite density below the cut-off to the total of no malaria febrile episodes. The suitable positive Likelihood-ratio ( $>10$ ), negative Likelihood-ratio ( $<0.1$ ) results and Youden's J index were also determined from the model.

The human biting rate (HBR) was expressed as the number of anopheles bites per human per night. The sporozoite index was calculated as the proportion of mosquitoes found to be positive for CSP. The entomological inoculation rate (EIR) was calculated as the product of the HBR and the sporozoite index and expressed as the number of infected bites per human per year.

## Results

### Population description

A total of 440 children in seven villages were parasitologically and clinically monitored during 18,262 person-days from which 402 (2.2%) were missing for the following reasons: 366 not found and 36 refusals. Ten children died during the study. The mean age of the children at inclusion was 2.1 years. The female/male ratio was 1:1. Each child in the survey was visited on an average of 42 days out of the 48. A total of 3,074 thick blood films were taken, comprising 2,838 in asymptomatic children and 236 in sick children, with an average of seven per child.

### Parasitological indexes of asymptomatic children observed by CCS

*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* were present alone or mixed (Table 2). The annual prevalence rate of *P. falciparum* infection was 21.8% (95%CI 19.1-24.4). In the multivariate random-effects logistic regression model, age of children, season, village and correct use of LLINs, but not the ownership and the use of LLINs were significantly associated with the prevalence of infection (Table 3). The correct use of LLINs conferred a 26% individual protective effect against infection prevalence (OR = 0.74 (95% CI 0.62-0.87),  $p = 0.005$ ). The prevalence of infection increased with age. Children aged 1 to 2 years and 3 to 5

**Table 2 Distribution of Plasmodium species according to clinical status**

<i>Plasmodium</i> species	Asymptomatic children	Sick children	Total
<i>Pf</i>	593	102	695
<i>Pf+Pm</i>	9	0	9
<i>Pf+Po</i>	15	3	18
<i>Pf+Pm+Po</i>	1	0	1
<i>Pm</i>	21	3	24
<i>Pm+Po</i>	1	0	1
<i>Po</i>	14	2	16
Total	654	110	764

*Pf*: *Plasmodium falciparum*; *Po*: *Plasmodium ovale*; *Pm*: *Plasmodium malariae*.  
 The plamodial formula on the 764 of the *Plasmodium*-positive thick blood film is *Pf* = 0.95; *Pm* = 0.05; *Po* = 0.05.

years were three to five times more frequently infected than children aged less than one year (22.0% (CI95% 17.0-27.0) and 33.0% (CI95% 28.4-37.6) versus 7.8% (CI95% 5.2-10.5)). The prevalence of infection was higher during the dry season (24.7% (CI95% 21.6-27.8) than during the rainy season (18.6% (CI95% 15.7-21.5)). The prevalence of infection was higher in Satré, Wanho, Kindjitopka and Hèkandji than in Dokanmè, Aidjèdo and Guézohoué.

The mean parasite density in positive asymptomatic children was 586 *P. falciparum* asexual forms per  $\mu\text{L}$  of blood (95%CI 504-680). According to multivariate random-effects linear regression model, increased parasite density was

**Table 3 Multivariate analysis of the prevalence rates of Plasmodium falciparum asymptomatic infection determined by cross-sectional surveys**

Variable	Prevalence rate of <i>P. falciparum</i> asymptomatic infection				
	N positive/N total (%)	95%CI	OR	95%CI	p-values
<b>Age (years)</b>					
<1	67/857(7.8)	5.1-10.6	1		
1-2	205/932(22.0)	16.7-27.3	3.62	2.52-5.19	<0.001
3-5	346/1049(33.0)	27.9-38.0	5.15	3.67-7.23	<0.001
<b>Village</b>					
Aidjèdo	59/427(13.8)	8.8-18.8	1		
Dokanmè	77/414(18.6)	12.8-24.4	1.55	0.89-2.72	0.103
Kindjitokpa	99/405(24.4)	20.8-28.1	2.12	1.34-3.36	0.007
Guézohoué	27/410(6.6)	4.2-8.9	0.48	0.28-0.84	0.019
Hékandji	82/392(20.9)	15.8-26.0	1.68	1.00-2.81	0.049
Satré	129/364(35.4)	30.7-40.2	3.42	2.16-5.43	0.001
Wanho	145/426(34.0)	21.1-39.0	3.33	2.09-5.31	0.001
<b>Season</b>					
Dry	366/1481(24.7)	20.1-29.4	1		
Rainy	252/1357(18.6)	14.6-22.5	0.74	0.62-0.87	0.004
<b>Correct use of LLIN's</b>					
No	349/1305(26.7)	21.9-31.6	1		
Yes	269/1533(17.5)	13.8-21.3	0.74	0.62-0.87	0.005

associated with some villages (Dokanmè and Satré) but not with age of children, season, ownership and use of LLINs (Table 4). *Plasmodium falciparum* gametocyte annual prevalence rate was 3.0% (95%CI 2.2-5.6) and differed significantly between the dry (3.8% (95% CI 2.9-4.8)) and the rainy season (2.2% (95%CI 1.4-3.0)),  $p = 0.008$ .

#### Clinical malaria observed by ACD

During the study 236 pathological episodes were detected. A total of 110 pathological episodes were parasite positive: 102 children with *P. falciparum* alone, three individuals with *P. malariae* alone, two individuals with *P. ovale* alone and three individuals with mixed infection. The *P. malariae* single infections showed densities of 480, 2,360 and 200 parasites/ $\mu\text{L}$  and *P. ovale* single infections showed densities of 4,800 and 9,800 parasites/ $\mu\text{L}$ . Three mixed infections with *P. falciparum* and *P. ovale* showed combined densities of 3,760 *Pf* + 720 *Po*, 960 *Pf* + 400 *Po* and 280 *Pf* + 120 *Po* (Table 2). In all age groups, the mean parasite density was lower in healthy children than sick children (Figure 2). Four parasite positive cases with *P. falciparum* referred to the health centre were diagnosed as severe malaria with anaemia. Among the 236 pathological episodes, there were 74 episodes attributable to *P. falciparum* malaria (Table 5). The optimal pyrogenic parasite cut-off of 2,000 *P. falciparum* asexual blood forms per  $\mu\text{L}$  was determined as corresponding to levels of sensitivity and specificity of 94.0% and 94.5% respectively (Table 6). The mean annual clinical incidence rate was 1.5 per child per year (95%CI 1.2-1.9). Age and sex of children, season, village, the ownership, use and correct use of LLINs were not associated with the clinical malaria attacks in the Poisson regression model (Figure 3B, Table 7).

#### Entomological indexes

Overall 13,602 mosquitoes including 115 *An. gambiae sensu lato* (s.l.) (65 and 50 indoor and outdoor, respectively) and 67 *An. funestus* (40 and 27 indoor and outdoor, respectively) were caught in the seven villages. The number of CSP positive *An. gambiae s.l.* and *An. funestus* were nine and four respectively. The aggressiveness of culicidae and malaria vectors (*An. gambiae s.l.* and *An. funestus*) were 5,541 (95%CI 2,008-15,288) and 74 (95%CI 17-318) bites per human per year. The annual EIR was 5.3 (95%CI 1.1-25.9) infected bites per human per year. The 1014F *kdr* allele was present in both molecular M and S forms. The frequency of this mutation was respectively 0.47 (95%CI 0.37-0.57) and 0.61 (95%CI 0.43-0.80) in the M and S forms.

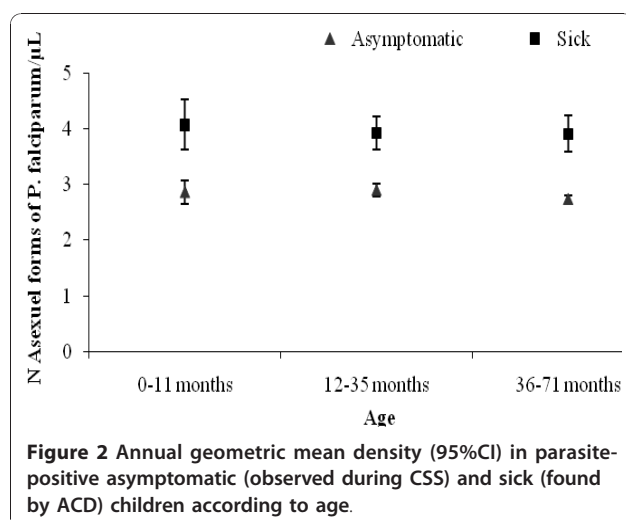
#### Ownership and use of LLINs

The LLINs ownership rate reached 91.8% (2,769/3017; 95%IC 90.8-92.8) and remained high through the year.

**Table 4 Multivariate analysis of parasite density among positive asymptomatic children observed by cross-sectional surveys**

Variable	Number	Parasite density		
		Geometric average (95%CI)	Adjusted multiplicative factor (95%CI)	p-values
<b>Age (year)</b>				
<1	67	686(424-1109)	1	
1-2	205	734(541-994)	1.02(0.68-1.55)	0.900
3-5	346	497(422-587)	0.78(0.52-1.16)	0.175
<b>Sex</b>				
F	297	508(419-617)	1	
M	252	668(535-835)	1.29(1.01-1.63)	0.041
<b>Village</b>				
Aïdjèdo	59	398(272-581)	1	
Dokanmè	77	807(544-1197)	1.80 (1.10-2.95)	0.026
Kindjitokpa	99	509(388-668)	1.20(0.81-1.77)	0.302
Guézohoué	27	758(298-1928)	1.52(0.75-3.06)	0.195
Hékandji	82	489(344-695)	1.13(0.72-1.79)	0.528
Satré	129	732(538-995)	1.77(1.19-2.63)	0.013
Wanho	145	552(375-813)	1.37(0.88-2.14)	0.129
<b>Season</b>				
Dry	366	551(464-656)	1	
Rainy	252	640(510-803)	1.04(0.85-1.28)	0.657
<b>Correct use of LLIN's</b>				
No	256	684(552-848)	1	
Yes	362	525(435-633)	1.22(0.99-1.51)	0.057

Use was significantly higher during the rainy season than the dry season 73% (1,062/1,451; 95%CI 70-75) and 67% (1,047/1,566; 95%CI 64-69) respectively,  $p = 0.0001$ . It significantly decreased to 31% (118/385; 95%CI 26-31) in the middle of dry season. Correct use was also the highest during the rainy season (68% (990/1,566; 95%CI 65-70)) compared to the dry season (42% (665/1,171; 95%CI 40-45)),  $p < 0.0001$ , (Figure 3C).



## Discussion

This prospective longitudinal study allowed the epidemiology of malaria in the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito after the nation-wide distribution of LLINs to children in October 2007 to be characterized. Previous studies have described the epidemiology of malaria in Benin, by focusing mainly on malaria transmission [35] and on clinical and parasitological aspects as well in rural areas [36-38] as in the city of Cotonou [39]. Other authors [40] described the process indicators, results and impact of malaria control which were useful for the implementation of the monitoring and assessment system of "Roll Back Malaria" in Benin. The large scale and selective distribution of LLINs in Africa in the last decade were also the subject of several studies which concerned mainly the acceptability and/or the population perception without investigating their parasitological and clinical effects [41-47]. Pyrethroid resistance in malaria vectors has been observed in many African countries [7]. Nevertheless, no loss of effectiveness of LLINs has been reported at an operational level [48].

## Epidemiological description

The entomological findings showed that the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito is a mesoendemic area with a mean annual EIR of 5.3 infected bites (95%CI 1.1-25.9). This EIR was found in conjunction with the

**Table 5 Attributable fraction estimates of pathological episodes to falciparum malaria**

Trophozoites/ $\mu$ L	N asymptomatic children	N sick children	Logistic model	
			N clinical malaria cases	N other clinical cases (No malaria)
0	2220	131	0.0	131.0
1-99	112	5	0.3	4.7
100-249	84	7	0.9	6.1
250-499	87	5	0.9	4.1
500-999	94	5	1.4	3.6
1000-1499	62	1	0.3	0.7
1500-1999	28	4	1.7	2.3
2000-2999	44	3	1.5	1.5
3000-3499	12	3	1.7	1.3
3500-3999	8	3	1.8	1.2
4000-4999	18	2	1.3	0.7
5000-7499	23	5	3.5	1.5
7500-9999	16	3	2.4	0.6
10000-14999	13	5	4.3	0.7
$\geq 15000$	17	54	52.5	1.5
Total	2838	236	74.4	161.6

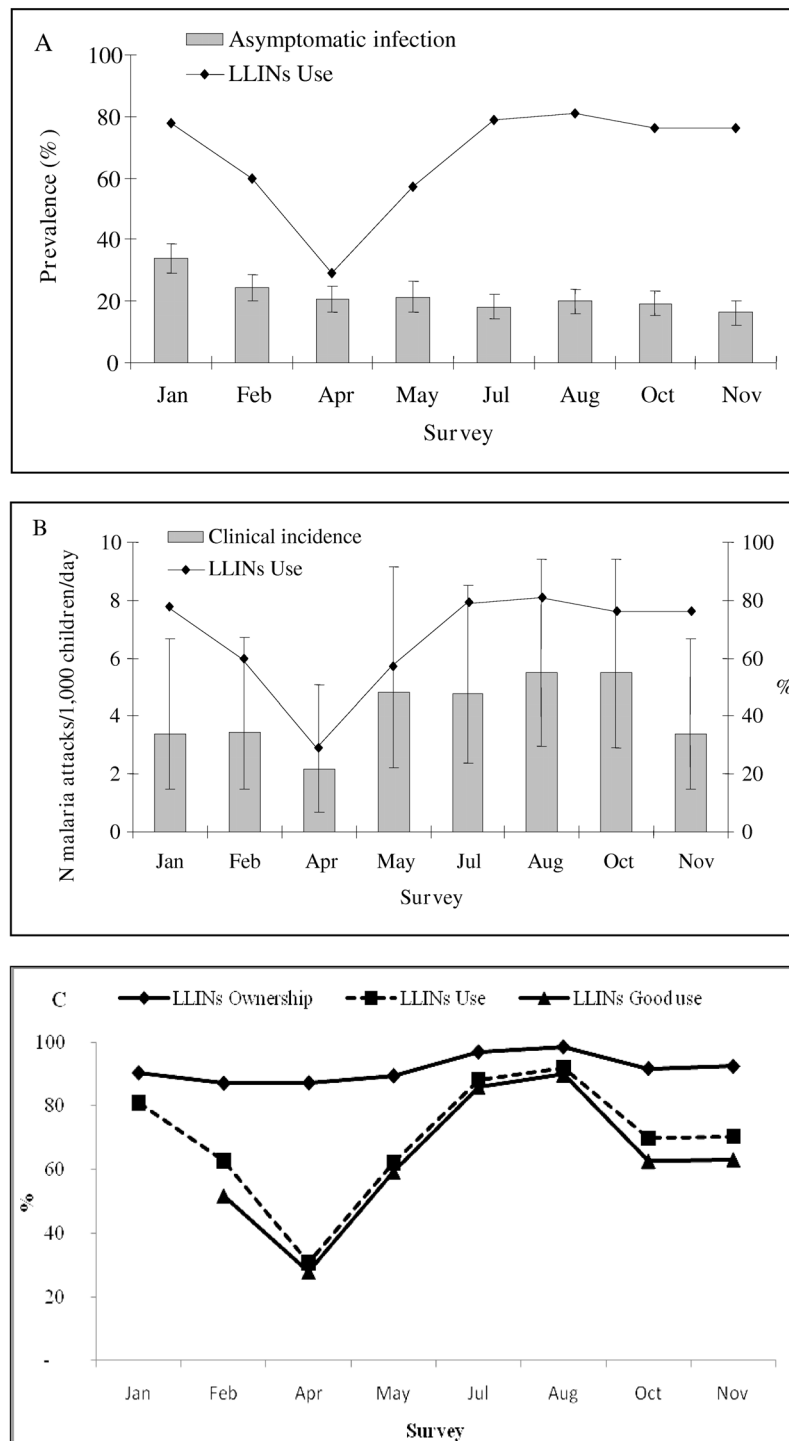
annual prevalence rate of 21.8% (95%CI 19.1-24.4) observed in young asymptomatic children [29,49,50]. It confirms Velema's parasitological observations in the same area twenty years ago [36]. As regards the resistance of *An. gambiae* to pyrethroids, the L1014F *kdr* allele reached 50%, in accordance with previous studies carried out in southern Benin [8,18]. The annual infection rate increased with age in accordance with what is usually observed in mesoendemic area [50]. The high infection rate in the dry season could be influenced by the peak observed at the end of the rainy season (33%) just one month after the national distribution of LLINs (Figure 3A, Table 3). The parasite density of positive

children did not vary with age group or season (Figure 2). These results may be attributed to the protection conferred by LLINs. In mesoendemic areas, the acquisition of immunity against malaria would develop gradually and bring about a decrease in parasitaemia with increasing age [51]. Here, where the level of parasite exposure was reduced by treated nets, immunity may be acquired more slowly [52,53]. The different rates of infection found in the villages can be explained by variety in their natural characteristics. The prevalence rate was the highest in Satré, Wanho, Kindjitopka and Hèkandji close to fresh water (Toho Lake), open water cisterns or swamps where breeding sites of anopheles are mostly found (Tables 1 and 3).

**Table 6 Pyrogenic cut-off, sensitivity and specificity estimates by using attributable fraction (sensitivity = number of malaria episodes  $\geq$  cut-off/total of malaria episodes; specificity = number of no malaria episodes  $<$  cut-off/total of no malaria episodes)**

Cut-off (trophozoites of <i>P. falciparum</i> / $\mu$ L)	N malaria episodes $\geq$ pyrogenic cut-off	N no malaria episodes $<$ pyrogenic cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
1	74.4	131.0	100.0	81.1
100	74.2	135.7	99.6	84.0
250	73.3	141.8	98.5	87.8
500	72.4	145.9	97.2	90.3
1000	71.0	149.6	95.4	92.6
1500	70.7	150.2	94.9	93.0
<b>2000</b>	<b>68.9</b>	<b>152.5</b>	<b>92.6</b>	<b>94.4</b>
3000	67.5	154.0	90.6	95.3
3500	65.8	155.3	88.4	96.2
4000	64.0	156.5	86.0	96.9
5000	62.7	157.2	84.2	97.3
7500	59.2	158.8	79.5	98.3
10000	56.8	159.4	76.3	98.6
$\geq 15000$	52.5	160.1	70.5	99.1





**Figure 3** Longitudinal study of malaria in seven villages of the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito after the national distribution of LLINs in children aged 0-5 years. **(A)** Asymptomatic infection: parasite prevalence rate with 95% confidence intervals and use of LLINs according to surveys. **(B)** Malaria disease: incidence rate of malaria attacks with 95% confidence intervals and use of treated nets according to surveys. **(C)** Ownership, Use and Correct use of LLINs according to surveys.

**Table 7 Multivariate regression analysis of malaria incidence taken into account the cumulative number of monitoring days**

Variable	Person-day	N evocative malaria cases	Malaria episodes			Adjusted Relative Risk (95%CI)	p-values
			N malaria cases*	Incidence per child per year (95%CI)			
<b>Age (year)</b>							
<1	5542	77	18	1.19(0.77-1.83)	1	-	
1-2	6034	84	30	1.81(1.28-2.58)	1.53(0.88-2.85)	0.104	
3-5	6686	75	30	1.64(1.21-2.23)	1.38(0.94-2.45)	0.075	
<b>Sex</b>							
F	9094	116	34	1.36(1.00-1.86)	1	-	
M	9168	120	44	1.75(1.33-2.30)	1.27(0.86-1.88)	0.182	
<b>Village</b>							
Aïdjèdo	2746	36	10	1.33(0.80-2.22)	1		
Dokanmè	2745	48	20	2.66(1.80-3.94)	1.89(0.98-3.65)	0.055	
Kindjitokpa	2522	21	10	1.45(1.04-2.02)	1.04(0.56-1.94)	0.876	
Guézohoué	2595	24	6	0.84(0.50-1.43)	0.60(0.29-1.25)	0.140	
Hékandji	2536	38	7	1.01(0.55-1.84)	0.70(0.32-1.56)	0.320	
Satré	2368	34	11	1.70(1.23-2.33)	1.21(0.66-2.23)	0.472	
Wanho	2750	35	14	1.86(1.31-2.64)	1.34(0.70-2.57)	0.308	
<b>Season</b>							
Dry	9355	92	36	1.40(1.00-1.97)	1	-	
Rainy	8907	144	42	1.72(1.35-2.19)	1.22(0.78-1.91)	0.372	
<b>Correct use of LLIN's</b>							
No	8280	92	28	1.23(0.87-1.75)	1	-	
Yes	9982	144	50	1.83(1.44-2.32)	1.36(0.83-2.25)	0.181	

\*Parasite density  $\geq$  2000 asexual forms of *Plasmodium falciparum* per  $\mu$ L.

The calculated AF of pathological episodes to malaria helped to determine the optimum parasite pyrogenic cut-off at 2,000 *P. falciparum* asexual blood forms per  $\mu$ L. The use of AF to define the pyrogenic parasite cut-off allows the best trade-off between sensitivity and specificity level [54]. In stable malaria areas, *P. falciparum* parasitaemia is dependent on the season and age, which affects the malaria-AF of pathological episodes and thus the malaria case definition according to pyrogenic parasite density cut-off [33,55]. In the present study, the parasite density did not vary with season or age. Therefore, the AF could be considered the same whatever the season and the age group. The cut-off of 2,000 *falciparum* asexual blood forms per  $\mu$ L was close to the value of 1,000 found in mesoendemic area on children under 3 years [36] and to the 3,000 to 6,000 found in hyperendemic area among children aged 0 to 12 years in south of Benin respectively [37].

In the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito, one pathological episode out of three was attributed to malaria. To avoid a maximum of missed cases the malaria case definition took into account signs evoking malaria or history of fever during the 48 hours preceding the first day of ACD as advised Mcguinness [33]. Mean annual incidence rate of *falciparum* clinical malaria was 1.5 per child per year. In *P. falciparum* high-endemic area, the pyrogenic

cut-off of parasitaemia in persons of a given age is similar for all *Plasmodium* species [56]. Given the high parasite density, *P. malariae* could have been responsible for one malaria clinical case with 2,360 parasites/ $\mu$ L and *P. ovale* for two cases with a parasitaemia of (4,800 and 9,800 parasites/ $\mu$ L) respectively.

#### Use of LLINs

In 2001 before the national distribution of LLINs, in south of Benin, 4.3% of household owned a treated net (ITN) and 2.4% of children under five years old slept under ITNs [40]. In 2006, ITNs possession was estimated to 25.6% and its utilization by the children less than 5 years was 21% in Ouidah [15]. After the national distribution of LLINs, ownership rose to over of 90% and was continuous over of the year (Figure 3C). Throughout the 12 months of the study, two children out of three were found sleeping under LLINs during unannounced and nocturnal inspections. Some studies have already concluded that free distribution of nets via a national campaign is effective in rapidly increasing their possession and use [42,57,58]. This high percentage of use may have been the result of adapted sensitization to the beliefs and behaviours of the communities and to the presence of medical staff assisted by a local village helper. Indeed, the success of sensitization

depended strongly on the partnership between the study team and the local leaders as described by Paré Toé [47]. The 31% reduction of LLINs use during the dry season in Benin is comparable to that observed in most of the West African countries (Figure 3C) [24,41,43]. When populations were not bothered by the mosquitoes, they did not use the treated nets [47,59]. In the present longitudinal study, neither asymptomatic infection nor malaria attack was affected by the use of LLINs. The impact of LLINs was lower than expected since the correct use gave a 26% of individual protective effect only against infection without influencing malaria morbidity. Moreover, both curves of use and correct use of LLINs varied in the same way through the surveys (Figure 3C).

## Conclusion

In conclusion, the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito is a mesoendemic area characterized by a moderate level of pyrethroid resistance of vectors and a high heterogeneity of malaria infection between villages. Malaria infection and disease did not vary through the year. The used LLINs rate was high and only the correct use of LLINs was found to reduce malaria infection without influencing malaria morbidity.

## Acknowledgements

This research was realized in the context of the Project FSP/REFS N° 2006-22 supported by the Ministère Français des Affaires Étrangères et Européennes. A financial contribution was also given by the President Malaria Initiative of the US Government. We thank the nurses, the microscopists and the entomological technicians who collected the data. We thank also the administration of the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito for their strong collaboration. We are grateful for all the inhabitants of the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito who took part in the surveys and participated actively in the data collection. We thank Pr Robin Bailey from London School of Hygiene & Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Diseases (London, England) for his linguistic correction.

## Author details

<sup>1</sup>Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, Bénin. <sup>2</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD/UR016), 01 BP 4414 Cotonou, Bénin. <sup>3</sup>Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaires, Equipe « Maladies émergentes et moustiques »/Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE-UMR6236, Institut de recherche biomédicale des armées, Allée du médecin colonel Jamot, Parc du Pharo, BP60109 Marseille cedex 07, France. <sup>4</sup>Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN/IRD), 911 Ave Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5 France. <sup>5</sup>Faculté des Sciences de la Santé/Université d'Abomey-Calavi (FSS/UAC), 01 BP 188 Cotonou, Bénin. <sup>6</sup>Service de Coopération, Ambassade de France, Cotonou, Bénin.

## Authors' contributions

The design of the study was conceived by FC and M-CH. Data were collected in the communities by GBD, AD and A-SBB. M-CH, AD and VC carried out laboratory analysis. CR, M-CH, GBD, AD and VC participated in the data analysis. The results were discussed by GBD, M-CH, AD, VC, CR, FC, MA, DK-G and AM. GBD and M-CH draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 July 2010 Accepted: 31 December 2010  
Published: 31 December 2010

## References

1. Feachem R, Philipps AA: **Malaria: 2 years in the fast lane.** *Lancet* 2009, **373**:1409-1411.
2. WHO: **World Malaria Report.** Geneva; 2008.
3. Ministère de la Santé de la République du Bénin: *Annuaire des statistiques sanitaires* 2007, 248, SNIGS/DPP/MS.
4. WHO: **The world malaria report.** Geneva; 2005 [http://rbm.who.int/wmr2005/].
5. USAID: **The President's Malaria Initiative. Progress through partnerships; saving lives in Africa.** [http://www.fightingmalaria.gov/resources/reports/pmi\_annual\_report08.pdf].
6. Lengeler C: **Insecticide-treated nets for malaria control: real gains.** *Bull World Health Organ* 2004, **82**:84.
7. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, Torre AD: **Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa.** *Malar J* 2008, **7**:74.
8. 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.
9. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, **9**:538.
10. Djogbenou L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM, Chandre F: **Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:298-302.
11. Corbel V, Duchon S, Zaim M, Hougard JM: **Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes.** *J Med Entomol* 2004, **41**:712-717.
12. 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.
13. Djenontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Penetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F: **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets.** *Malar J* 2009, **8**:233.
14. Djenontin A, Chandre F, Dabiré KR, Chabi J, N'Guessan R, Baldet T, Akogbeto M, Corbel V: **The Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate in combination with long lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid-resistant malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83**:266-270.
15. Aplogan A, Ahanhanzo C: **Population behaviour and expectations concerning malaria control in Ouidah, Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2006, **100**:216-217.
16. Whitty CJ, Chandler C, Ansa EL, Staedke SG: **Deployment of ACT antimalarials for treatment of malaria: challenges and opportunities.** *Malar J* 2008, **7**(Suppl 1), S7.
17. ACTwatch: **Evidence for malaria medicines policy.** *Rapport de l'enquête Ménage de Base, République du Bénin 04/09-05/09* 137.
18. Akogbeto M, Yakoubou S: **Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrethroïdes utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest.** *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **92**:123-130.
19. Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin: **Politique nationale de lutte contre le paludisme et cadre stratégique de mise en œuvre.** *MSP Cotonou Bénin* 2005, 50.
20. WHO: **The role of laboratory diagnosis to support malaria disease management.** Report of a WHO consultation; 2004.
21. WHO: **Manual on practical entomology in malaria. Part II.** Geneva; 1975, 45, WHO/CDS/CPC/MAL/9812.
22. Gillies M, DeMeillon B: **The Anophelinae of Africa south of the Sahara.** *Pub. South Afr. Inst. Med. Res.* 1968, **54**:343.
23. Gillies M, Coetzee M: **A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region).** *Pub. South Afr. Inst. Med. Res* 1987, **55**:143.

24. Frey C, Traoré C, De Allegri M, Kouyaté B, Müller O: **Compliance of young children with ITN protection in rural Burkina Faso.** *Malar J* 2006, **5**:70.
25. 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.
26. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C: **Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2001, **10**:19-23.
27. 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.
28. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Paunon D: **Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*knr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
29. Smith T, Genton B, Baea K, Gibson N, Taimé J, Narara A, Al-Yaman F, Beck HP, Hii J, Alpers M: **Relationships between *Plasmodium falciparum* infection and morbidity in a highly endemic area.** *Parasitology* 1994, **109**:539-549.
30. Schellenberg JR, Smith T, Alonso PL, Hayes RJ: **What is clinical malaria? Finding case definitions for field research in highly endemic areas.** *Parasitol Today* 1994, **10**:439-442.
31. Rogier C, Henry MC, Spiegel A: **Diagnostic des accès palustres en zone d'endémie: bases théoriques et implications pratiques.** *Med Trop* 2001, **61**:27-46.
32. Smith T, Hurt N, Teuscher T, Tanner M: **Is fever a good sign for clinical malaria in surveys of endemic communities?** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**:306-310.
33. McGuinness D, Koram K, Bennett S, Wagner G, Nkrumah F, Riley E: **Clinical case definitions for malaria: clinical malaria associated with very low parasite densities in African infants.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998, **92**(5):527-531.
34. Smith T, Schellenberg JA, Hayes R: **Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas.** *Stat Med* 1994, **13**:2345-2358.
35. Akogbeto M, Chippaux JP, Coluzzi M: **Coastal urban malaria in Cotonou (Republic of Benin). Entomological study.** *Rev Epidemiol Sante Publique* 1992, **40**:233-239.
36. Velema JP, Alihonou EM, Chippaux JP, van Boxel Y, Gbedji E, Adegbinri R: **Malaria morbidity and mortality in children under three years of age on the coast of Benin, West Africa.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991, **85**:430-435.
37. Chippaux JP, Akogbeto M, Massougbdji A, Adjagba J: **Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission permanente.** In *Le paludisme en Afrique de l'ouest, études entomologiques et épidémiologiques en zone rizicole et en milieu urbain*. Edited by: Robert V, Chippaux J-P, Diomandé L. ORSTOM édition, Paris; 1991:55-65.
38. Rashed S, Johnson H, Dongier P, Moreau R, Lee C, Lambert J, Schaefer C: **Economic impact of febrile morbidity and use of permethrin-impregnated bed-nets in a malarious area I. Study of demographics, morbidity, and household expenditures associated with febrile morbidity in the Republic of Benin.** *Am J Trop Med Hyg* 2000, **62**:173-180.
39. Wang SJ, Lengeler C, Smith TA, Vouunatsou P, Akogbeto M, Tanner M: **Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: epidemiology of urban malaria in Cotonou (Benin).** *Malar J* 2006, **5**:45.
40. Kindé-Gazard D, Gbénou D, Tohon C, Da Silva C, Nahum A, Massougbdji A: **Indicateurs de suivi et d'évaluation en 2001 de l'initiative « Faire reculer le paludisme » au Bénin.** *Bull Soc Path Exot* 2004, **97**:349-352.
41. Korenromp EL, Miller J, Cibulskis RE, Kabir Cham M, Alnwick D, Dye C: **Monitoring mosquito net coverage for malaria control in Africa: possession vs. use by children under 5 years.** *Trop Med Int Health* 2003, **8**:693-703.
42. Thwing J, Hochberg N, Vanden Eng J, Issifi S, Eliades M, Minkoulou E, Wolkon A, Gado H, Ibrahim O, Newman RD, Lama M: **Insecticide-treated net ownership and usage in Niger after a nationwide integrated campaign.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**:827-834.
43. Oresanya OB, Hoshen M, Sofola OT: **Utilization of insecticide-treated nets by under-five children in Nigeria: assessing progress towards the Abuja targets.** *Malar J* 2008, **7**:145.
44. Baume CA, Marin MC: **Gains in awareness, ownership and use of insecticide-treated nets in Nigeria, Senegal, Uganda and Zambia.** *Malar J* 2008, **7**:153.
45. Afolabi BM, Sofola OT, Fatunmbi BS, Komakech W, Okoh F, Saliu O, Otsemobor P, Oresanya OB, Amajoh CN, Fasiku D, Jalingo I: **Household possession, use and non-use of treated or untreated mosquito nets in two ecologically diverse regions of Nigeria-Niger Delta and Sahel Savannah.** *Malar J* 2009, **8**:30.
46. Hanson K, Marchant T, Nathan R, Mponda H, Jones C, Bruce J, Mshinda H, Schellenberg JA: **Household ownership and use of insecticide treated nets among target groups after implementation of a national voucher programme in the United Republic of Tanzania: plausibility study using three annual cross sectional household surveys.** *BMJ* 2009, **338**:b2434.
47. Paré Toé L, Skovmand O, Dabiré KR, Diabaté A, Diallo Y, Guiguemdé TRJM, Doannio C, Akogbeto M, Baldet T, Gruénais ME: **Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso.** *Malar J* 2009, **8**:175.
48. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevale P: **Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:859-864.
49. Beier J, Perkins P, Wirtz R, Koros J, Diggs D, Gargan T, Koech DK: **Bloodmeal identification by direct enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya.** *J Med Ent* 1986, **25**:9-16.
50. Smith DL, McKenzie FE, Snow RW, Hay SI: **Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control.** *PLoS Biol* 2007, **5**:e42.
51. Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape JF, Mercereau-Puijalon O: **A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, **93**:375-380.
52. Lusingu JP, Vestergaard LS, Mmbando BP, Drakeley CJ, Jones C, Akida J, Savaeli ZX, Kitua AY, Lemnge MM, Theander TG: **Malaria morbidity and immunity among residents of villages with different *Plasmodium falciparum* transmission intensity in North-Eastern Tanzania.** *Malar J* 2004, **3**:26.
53. Mmbando BP, Lusingu JP, Vestergaard LS, Lemnge MM, Theander TG, Scheike TH: **Parasite threshold associated with clinical malaria in areas of different transmission intensities in north eastern Tanzania.** *BMC Med Res Methodol* 2009, **9**:75.
54. Rogier C, Henry MC, Trape JF: **Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie.** *Med Trop* 2009, **69**:123-142.
55. Dicko A, Mantel C, Kouriba B, Sagara I, Thera MA, Doumbia S, Diallo M, Poudiougou B, Diakite M, Doumbo OK: **Season, fever prevalence and pyrogenic threshold for malaria disease definition in an endemic area of Mali.** *Trop Med Int Health* 2005, **10**:550-556.
56. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganki H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, Brahimi K, Faye O, Druilhe P, Pereira Da Silva L: **The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal.** *Am J Trop Med Hyg* 1994, **51**:123-137.
57. Skarbinski J, Massaga JJ, Rowe AK, Kachur SP: **Distribution of free untreated bednets bundled with insecticide via an integrated child health campaign in Lindi Region, Tanzania: lessons for future campaigns.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**:1100-1106.
58. Matovu F, Goodman C, Wiseman V, Mwengee W: **How equitable is bed net ownership and utilisation in Tanzania? A practical application of the principles of horizontal and vertical equity.** *Malar J* 2009, **8**:109.
59. Ahorlu CK, Dunyo SK, Afari EA, Koram KA, Nkrumah FK: **Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control.** *Trop Med Int Health* 1997, **2**:488-499.

doi:10.1186/1475-2875-9-380

**Cite this article as:** Damien et al.: Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malaria Journal* 2010 **9**:380.

## **Article Summary Line**

Better understanding of factors influencing malaria incidence and net use during the dry-hot season is essential to help National Malaria Control Programmes to implement more effective and sustainable malaria control strategies in Africa.

## **Running Title**

Dry season's determinants of malaria disease

## **Keywords**

Falciparum Malaria; Season; Anopheles; Insecticide-Treated Bednets; Epidemiology; Temperatures; Statistical Models; Remote Sensing Technology; Africa; Benin;

## **Title**

Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin, West Africa

## **Authors**

Nicolas Moiroux, Olayidé Bousari, Armel Djènontin, Georgia Damien, Gilles Cottrell, Marie-Claire Henry, Hélène Guis, Vincent Corbel

## **Author affiliations**

Institut de Recherche pour le Développement, Cotonou, Benin. (N. Moiroux, A. Djènontin, G. Damien, G. Cottrell, V. Corbel); Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, Cotonou, Benin. (N. Moiroux, A. Djènontin, M-C. Henry, V. Corbel); Institut des Sciences Biomédicales Appliquées, Cotonou, Benin. (G. Cottrell); Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France, Cotonou, Benin. (M-C. Henry); Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France. (H. Guis)

## Abstract

To achieve malaria eradication, vector control efforts will have to be sustained even when the incidence of malaria cases becomes low. In this work, malaria incidence was evaluated in children of under 5 years of age in 28 villages in Benin during the dry season. Using mixed-effect models, malaria incidence was assessed according to the level of transmission by different vector species, and LLIN use and ownership. Then, a logistic mixed-effect model was developed to assess whether night-time temperature, biting nuisance and LLIN ownership are good predictors of “effective” LLIN use. Results showed that *Anopheles funestus* rather than *An. gambiae s.s.* is responsible for malaria transmission. A rate of LLIN use <60% was associated with a higher risk of malaria, and nocturnal temperature and biting nuisance were predictors of effective LLIN use. This study emphasized the need for a better understanding of the epidemiology of malaria during the dry season.

## Background

Increased international funding of malaria control has resulted in a global decrease of the number of cases and deaths since 2000 (1). In particular, the scaling up of Long-Lasting Insecticide-treated mosquito Nets (LLIN) and Indoor Residual Spraying (IRS) programmes has contributed to the idea that malaria eradication may be feasible (2). Unfortunately, recent increases in malaria cases were recorded in some African countries indicating the tenuousness of malaria control in this part of the world (1, 3).

Moreover, seasonal climatic change is known to be an important determinant of malaria incidence (4) since climate conditions both mosquito vector dynamics and parasite development rates (5). Malaria incidence is usually low during the dry-hot season when vector populations are reduced and spatially confined. In consequence, most studies focus on the peak transmission season (i.e., the rainy season) and the epidemiological picture during

the dry-hot season is often neglected. However, if malaria is to be eradicated, it will be essential to sustain vector control efforts through the dry-hot season when vector density is low. Moreover, the dry-hot season is important because the vector profile may change and influence the pattern of transmission. In Benin, comparison of entomological data from two studies (6, 7) carried out in the mesoendemic Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito (OKT) region suggests that *An. funestus* partially replaces the main malaria vector *An. gambiae s.s.* during the dry-hot season. The switch from *An. gambiae s.s.* to other anopheline species such as *An. funestus*, *An. moucheti* and *An. melas* has been previously documented in Africa (8, 9) and this is particularly worrying because our understanding of the behaviour, ecology and insecticide resistance of these species is limited (3, 10).

Furthermore, some studies have shown that mosquito nets are less likely to be used during the dry-hot season (6, 11, 12) because of the discomfort of having to sleep under a net on a hot night (12, 13) and when the mosquito biting nuisance is low (12, 14, 15). In Southern Benin, a longitudinal survey conducted in 7 villages of the OKT district reported an average decrease of 31% in net use during the dry season even though most families (over 80%) had nets available throughout the study (6). Major disparities were observed in both the density and diversity of culicidae (7) and this could have influenced LLIN use and the risk of malaria attacks in people from different villages .

In this context, we investigated the factors that determine the likelihood of malaria attacks in children of under 5 years of age in the OKT district during the dry season. A Linear Mixed-Effect (LME) model was used to assess relationships between malaria incidence and transmission by different vector species, LLIN use and net ownership. A logistic mixed-effect model was then developed to assess whether night-time temperature (derived from MODIS remote sensing data), biting nuisance and LLIN ownership predict effective LLIN use. Better understanding of the factors that determine malaria incidence and net use during the dry-hot

season would help National Malaria Control Programs (NMCPs) to implement more effective and sustainable malaria control strategies in Africa.

## **Method**

### **Study area**

This study was carried out in the OKT health administrative region in southern Benin (on the Atlantic coast) following the nationwide distribution of LLINs to children of under 5 years of age by the NMCP (6, 7). The local climate is coastal-guinean with four seasons including a long dry season (between November and March) which is the hottest of the year (with average monthly temperatures close to 28°C). Average annual rainfall was 1,100 mm in 2007-2008 with less than 10% falling during the long dry season. Investigations were conducted in 28 villages selected on the basis of a population size between 250 and 500 inhabitants, a distance between two villages of less than 2 km and the absence of any local health care center (6, 7).

### **Entomological data**

Mosquitoes were collected for three surveys conducted every six weeks between November 2007 and March 2008. Mosquitoes were collected from 10 p.m. to 6 a.m. both indoors and outdoors at four sites in each village on two successive nights for each survey (i.e., 16 person-nights per village per survey). Malaria vectors belonging to the *Anopheles gambiae* complex and the *Anopheles funestus* group were speciated by PCR and processed for circumsporozoite protein (CSP) ELISA detection of *Plasmodium falciparum* sporozoites (7). Human Biting Rates (HBR) and Entomological Inoculation Rates (EIR) were calculated for each vector species and HBR was also calculated for all culicidae to estimate the overall mosquito-biting nuisance in this area.



### **Clinical malaria, LLIN use and LLIN ownership data**

In each of the 28 villages, a sample of 60 children of between zero and five years of age was randomly selected. Active Case Detection (ACD) for malaria attacks was carried out over three six-day periods six weeks apart, 14 days after mosquito collection.

A malaria attack was defined by a high axillary temperature ( $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ ), fever in the 48 hours preceding the first day of ACD, or any sign suggestive of malaria associated with a parasitaemia of over 1,999 asexual forms of *P. falciparum* per microlitre of blood (6).

The incidence of clinical malaria was calculated by dividing the number of pathological episodes attributed to malaria by the number of child-days surveyed. The ownership and use of LLINs (Permanet® 2.0) which had been distributed in October 2007 by the NMCP, were evaluated among the children of the cohort at the same time as ACD. Rates of LLIN ownership and use were both calculated with respect to the total number of observations. Details on the methods used for sampling, data collection and clinical measurements have been published (6).

### **Temperature data**

We used the Land-Surface Temperature (LST) at a spatial resolution of one kilometer measured by the Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) sensors on the Terra satellite (<https://lpdaac.usgs.gov/>). The average 8-day nocturnal temperature at the coordinates of each village (georeferenced using the Global Positioning System) was extracted using ArcGis ArcInfo 9.3 software (ESRI, Redlands, CA). The data were then converted into Celsius. Nocturnal LST data are known to provide good estimates of minimum temperatures in Africa in all ecosystems (16).

### **Incidence of clinical malaria**

The dependent variable was mean clinical malaria incidence and the explanatory variables were the EIR of each vector species (categorized in two classes: null and positive), LLIN use

and LLIN ownership (both categorized in two classes using respective thresholds of 60% and 80%). The threshold of 80% for LLIN ownership was adopted because it is considered by the World Health Organization (WHO) as the minimum objective for effective community protection against malaria (1). For LLIN use, the threshold of 60% was selected because this level was approved in the Abuja declaration as a feasible objective to prevent malaria infection and suffering (17). Relationships between the dependent variable and the explanatory variables were assessed using a univariate Linear Mixed Effect (LME) model with a random intercept (taking into account possible correlations associated with repeated measurements in each villages). We then investigated the combined effects of the explanatory variables on the occurrence of malaria attacks using a multivariate LME.

#### **LLIN use**

Relationships between the dependant variable, LLIN use rate, biting nuisance and nocturnal temperature (both categorized in four quartiles), and LLIN ownership were assessed by univariate analysis using a LME model. A logistic mixed-effect (LGME) model with a random intercept was then developed to assess the combined effects of the three covariates on the probability of a rate of LLIN use of over 60%.

Statistical analyses were conducted using R-software (18) with additional functions from the ‘nlme’ (19) and ‘lme4’ (20) packages.

#### **Ethical considerations**

The IRD Ethics Committee and the National Research Ethics Committee of Benin approved the study (CNPERS, reference number IRB00006860).

## Results

### Incidence of clinical malaria and transmission

A total of 79 malaria attacks were recorded in the three surveys. This represents an average of 8.8 (95% CI 6.7-10.9) malaria cases per 100 child-months. Figure 1 shows the distribution of clinical malaria in the 28 villages. Great disparities were observed between different villages with no cases at all detected in Agouako, Guezohoue or Dekponhoue compared with 23 cases in Tokoli alone. About 14,000 culicidae mosquitoes were caught during 1,344 human-nights corresponding to an average HBR of 1,028 (95% CI 736-1320) bites per human per 100 nights. Two malaria vector species were found coexisting, namely *Anopheles gambiae s.s.* (n=94) and *Anopheles funestus* (n=381). The average HBR was 7.0 (95% CI 3.4-10.6) per human per 100 nights for *An. gambiae s.s.*, and 28.4 (95% CI 10.6-42.6) for *An. funestus*. Only ten *An. funestus* individuals and five *An. gambiae s.s.* were found to be positive for CSP, corresponding to an average EIR of 1.12 (95% CI 0.29-1.95) infected bites per human per 100 nights. Mean percentages of LLIN ownership and use were 77.7% (95% CI 75.2-80.2) and 51.9% (95% CI 46.9-55.9) respectively. The average nocturnal temperature was 20.6°C (95% CI 20.2-21).

### Factors influencing the incidence of clinical malaria during the dry season

Malaria incidence (MI) correlated closely ( $p=0.0004$ , according to LME) with positive EIR for *An. funestus* but not *An. gambiae s.s.* (Figure 2b). Moreover, univariate analysis showed that MI was not significantly reduced for >80% LLIN ownership ( $p=0.91$ ; figure 3a) whereas it was significantly lower for >60% LLIN use ( $p=0.017$ ; Figure 3b). The small number of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum* sporozoites (75/84 EIR were equal to 0) generated numerical instability in the multivariate LME with EIR as the covariate. EIR was therefore not included in the multivariate model as an explanatory variable. However, a high correlation between EIR and malaria vector HBR ( $r = 0.95$ ) has been previously observed in the same district (Kouwaye et al., unpub. data) indicating that HBR may be a good indicator

of malaria transmission in this area. For these reasons, HBR was therefore included in the multivariate LME.

Multivariate LME analysis first confirmed that the component of transmission due to *An. funestus* significantly correlated with malaria incidence (Table 1) and that a rate of LLIN use of over 60% provided significant protection against malaria attacks in children of under 5 years of age.

### **Factors influencing LLIN use**

At high levels of nuisance (quartile 4; HBR >1,456 bites per human per 100 nights), mean LLIN use was significantly higher ( $67.0 \pm 8.6\%$ ,  $p < 0.05$ ) than in the lower quartiles (Figure 4a). No correlation was found between the density of malaria vectors and either LLIN use (Spearman's  $p = 0.25$ ; average HBR of vectors per village vs. average LLIN use) or HBR for all culicidae ( $p = 0.21$ ). This indicates that there is no direct relationship between the level of nuisance and the risk of malaria transmission.

Average LLIN use was negatively associated with nocturnal temperature (LME  $p < 0.05$ ) showing that, as the temperature increases, LLIN use decreases (Figure 4b). The model showed that LLIN use decreased to 37.1% [95% CI 27.9-46.3] for temperatures above 22°C (the fourth quartile). Analysing LLIN use according to LLIN ownership indicated a positive correlation only when LLIN ownership was <70% (LME  $p = 0.035$ ; figure 5). Beyond this threshold, ownership did not influence LLIN use.

A multivariate LGME model was then developed to assess the combined effects of the explanatory variables on the probability of a LLIN use rate of over 60%. For the sake of consistency, only the cases for which LLIN ownership was >60% ( $n = 79$  over 84) were input (a non-null probability of LLIN use >60% was then always possible). The LGME showed that the higher the level of biting nuisance (>1,456 bites per human per 100 nights), the higher the probability of “effective” LLIN use, i.e. >60% (Table 2). On the other hand, for the highest

nocturnal temperatures ( $>22^{\circ}\text{C}$ ), this probability decreased significantly. No relationship emerged between LLIN ownership and the probability of effective LLIN use (LGME  $p=0.26$ ).

## Discussion

### **Malaria in Southern Benin during the dry season**

The first part of this work aimed at investigating determinants of malaria disease in children of under 5 years of age during the dry season, after the nationwide distribution of LLINs in Benin. Malaria incidence varied between different villages in the OKT district from 0 to 23 malaria cases per 100 child-months: marked differences were even observed between neighbouring villages under three kilometres apart. This finding corroborates those of Djènontin et al. (7) who described marked spatial heterogeneity in the distribution and density of malaria vectors in this area.

These results show that the EIR and HBR of *An. funestus* correlate with the number of malaria attacks. This confirms previous work in Africa suggesting that *An. funestus* may play an important role in malaria transmission during the dry-hot season (21-24). In the OKT district, the highest malaria incidences were found in villages close to the types of permanent freshwater deposit (lakes and marshes in southeast and east) with vegetation, that provide ideal breeding sites for this species. In contrast, the component of transmission due to *An. gambiae* s.s. did not correlate with malaria incidence whatever the analysis method used (univariate or multivariate). It is important to note that the density of this species was low and its persistence through the dry season was dependent on occasional rain showers and the existence of permanent, domestic breeding sites (6, 25).

As mentioned above, EIR was not input into the multivariate analysis because of instability of the LME model. However, we assumed that the HBR could be considered as a good marker for transmission at very low vector densities and infection rates (corresponding to an EIR  $<1$

infected bite per human per day). This is consistent with other studies conducted in Benin (Kouwaye et al., unpub. data) and Kenya (26).

### **LLIN ownership and use**

According to the WHO, a LLIN ownership rate of at least 80% is the minimum for good community protection against malaria (1). In this study, we were not able to show any influence of high LLIN ownership on malaria incidence even when other thresholds were applied (N. Moiroux, unpublished data). This could be explained by the fact that LLIN ownership is not a good predictor of LLIN use. Conversely, our model showed that substantial LLIN use (>60%) had a significant impact on malaria incidence in the targeted population hence confirming previous observations (27). Therefore, these results indicate that LLIN use should be preferred to ownership as indicator of malaria risk. Despite the hundreds of millions nets distributed in Africa since 2000, the estimated proportion of children of under 5 years of age sleeping under an effective net in sub-Saharan Africa is still low (35%) (1). It will be a priority to improve this rate if the Millennium Development Goals for malaria control are to be achieved by 2015 (28). Consciousness-raising campaigns should be maintained during the dry-hot season to promote LLIN use which remains the main means of community-based prevention in Africa.

This study also showed that mosquito-biting nuisance positively correlated with widespread LLIN use (>60%). This in agreement with Thomson et al.(29) who showed a strong association between net use and mosquito nuisance in Gambia where, as well as in other African countries (30, 31), anopheline species accounted for a large part of overall mosquito-biting nuisance and net use increased with the risk of being bitten by a malaria vector. In Southern Benin, malaria vectors are not the main biters and this explains why vector density does not correlate with either LLIN use or nuisance. For this reason, putting the nets away during the dry-hot season may increase the risk of contracting malaria.

Furthermore, the highest nocturnal temperatures were found to be associated with low rates of LLIN use. This finding confirms results from interviews with populations in Burkina-Faso and Ghana (12, 13) who said they had trouble sleeping under a net on hot nights.

This study gives the first indications of the associations between the intensity of nuisance, nocturnal temperature and LLIN use, and confirms certain assumptions about seasonal variations in net use in Africa (6, 11-15).

### **Implications for vector control and malaria modelling**

In the OKT district (Southern Benin), *An. funestus* becomes the primary vector of malaria during the dry-hot season replacing *An. gambiae s.s.* Unfortunately, little is known about this species' biting behaviour, ecology and insecticide resistance status (10). Some recent surveys in West Africa suggested that *An. funestus* may be resistant to pyrethroids, DDT and carbamates in Ghana (32, 33) but fully susceptible to pyrethroids in Burkina-Faso (34) and Benin (Corbel, unpub. data). Clearly more work is needed to characterize insecticide resistance mechanisms in *An. funestus* in West African countries.

According to the literature, when it is present, *An. funestus* can account for a significant component of malaria transmission (21, 22, 24, 35) and incidence in Africa. For efficient malaria control, it is therefore important to identify areas where this vector is present and abundant. Questions on its nocturnal biting habits should also be addressed, e.g. a study in Ghana (36) reported that its aggressiveness peaks in the last hours of mosquito collection (between 4 and 6 a.m.) which is consistent with our data (N. Moiroux, unpub. data). It is therefore likely that *An. funestus* continues to bite at dawn when people are no longer sleeping under mosquito nets. This could be an issue since current vector control strategies, relying on the use of residual insecticides (LLIN, IRS) target nocturnal, endophilic malaria vectors (12). More knowledge on biting preferences, abundance, spatial distribution and resistance is needed so that *An. funestus* can be included in future models of malaria transmission. These

models will have to integrate LLIN use but perhaps this could be replaced with proxy markers such as minimum temperature (which is easily ascertained) and nuisance. However, temperature should be used with care in transmission or disease models because of this parameter has disparate, poorly understood—and sometimes antagonistic—effects on LLIN use, vectors densities and transmission (37-39).

As recommended by the Malaria Eradication (MalERA) Consultative Group on Modelling, there is a need to understand better the effects of seasonality on malaria morbidity (40). This study highlights the need to take into account the special epidemiology of malaria during the dry-hot season and get a better understanding of the factors that influence malaria incidence and net use. This will be important when it comes to developing more effective malaria modelling and mapping programmes. These findings should help National Malaria Control Programmes to implement more effective and sustainable malaria control strategies in Africa.

## **Disclaimers**

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.

## **Acknowledgments**

We are grateful to the French Ministry of Foreign Affairs and to the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) who supported the FSP project REFS N°2006-22. We thank populations of the OKT district for their kind support and collaboration. We also thank all the field and laboratory staff for their strong commitment to this project.



## **Bibliographical Sketch**

Mr Moiroux is pursuing a PhD at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) in Cotonou. His research interests include spatial ecology and epidemiology of malaria in a context of vector control.

## **References**

- 1. World Health Organization. World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.**
- 2. Roberts L, Enserink M. Malaria. Did they really say ... eradication? Science. 2007 Dec 7;318(5856):1544-5.**
- 3. The malERA Consultative Group on Vector Control. A Research Agenda for Malaria Eradication: Vector Control. PLoS Med. 2011;8(1):e1000401.**
- 4. Hay SI, Snow RW, Rogers DJ. From predicting mosquito habitat to malaria seasons using remotely sensed data: practice, problems and perspectives. Parasitol Today. 1998 Aug;14(8):306-13.**
- 5. Najera JA, Kouznetzov RL, Delacollette C. Malaria Epidemics: Detection And Control, Forecasting And Prevention. Geneva: World Health Organization; 1998. Report No.: WHO/MAL/98.1084.**
- 6. Damien G, Djenontin A, Rogier C, Corbel V, Bangana S, Chandre F, et al. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. Malaria J. 2011;9(1):380.**
- 7. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, Chabi J, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria**

vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors*. 2010 Sep 6;3(1):83.

8. Awolola TS, Okwa, Hunt RH, Ogunrinade AF, Coetzee M. Dynamics of the malaria-vector populations in coastal Lagos, south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002 Jan;96(1):75-82.

9. Adja AM, N'Goran E K, Koudou BG, Dia I, Kengne P, Fontenille D, et al. Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011 Jan;105(1):13-24.

10. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol*. 2011 Feb;27(2):91-8.

11. Korenromp EL, Miller J, Cibulskis RE, Kabir Cham M, Alnwick D, Dye C. Monitoring mosquito net coverage for malaria control in Africa: possession vs. use by children under 5 years. *Trop Med Int Health*. 2003;8(8):693-703.

12. Frey C, Traore C, De Allegri M, Kouyate B, Muller O. Compliance of young children with ITN protection in rural Burkina Faso. *Malaria J*. 2006;5(1):70.

13. Binka FN, Adongo P. Acceptability and use of insecticide impregnated bednets in northern Ghana. *Trop Med Int Health*. 1997;2(5):499-507.

14. Ahorlu CK, Dunyo SK, Afari EA, Koram KA, Nkrumah FK. Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control. *Trop Med Int Health*. 1997 May;2(5):488-99.

15. **Toe LP, Skovmand O, Dabire KR, Diabate A, Diallo Y, Guiguemde TR, et al. Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. Malar J. 2009;8:175.**
16. **Vancutsem C, Ceccato P, Dinku T, Connor SJ. Evaluation of MODIS land surface temperature data to estimate air temperature in different ecosystems over Africa. Remote Sensing of Environment. 2010;114(2):449-65.**
17. **WHO, RBM. The Abuja Declaration and the Plan of Action. The African Summit on Roll Back Malaria; 2000; Abuja: World Health Organization / Roll Back Malaria; WHO/CDS/RBM/2003.46; 2000.**
18. **R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2.12 ed. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2010.**
19. **Jose Pinheiro, Douglas Bates, Saikat DebRoy, Deepayan Sarkar, R Core team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-96 ed; 2009.**
20. **Bates D., Maechler M. lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-32 ed; 2009.**
21. **Fontenille D, Lochouarn L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, et al. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. Am J Trop Med Hyg. 1997 Mar;56(3):247-53.**
22. **Fontenille D, Lochouarn L, Diatta M, Sokhna C, Dia I, Diagne N, et al. Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the**

**biomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 Nov-Dec;91(6):647-52.**

**23. Gillies M, De Meillon B. *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*. 1968(54).**

**24. Kelly-Hope LA, McKenzie FE. *The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa*. *Malar J.* 2009;8:19.**

**25. Bangana ASB, Chandre F, Corbel V, Djenontin A, Chabi J, Osse R, et al. *Characterization of mosquito fauna in Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito Sanitary Zone in Benin (West Africa)* [MIM16671490]. *5th MIM Pan-African Malaria Conference*. Nairobi, Kenya; 2009.**

**26. Kristan M, Abeku TA, Beard J, Okia M, Rapuoda B, Sang J, et al. *Variations in entomological indices in relation to weather patterns and malaria incidence in East African highlands: implications for epidemic prevention and control*. *Malar J.* 2008;7:231.**

**27. Lengeler C. *Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria*. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004(2):CD000363.**

**28. United Nations. *The Millennium Development Goals Report 2010*. New York, USA: United Nations 2010.**

**29. Thomson MC, D'Alessandro U, Bennett S, Connor SJ, Langerock P, Jawara M, et al. *Malaria prevalence is inversely related to vector density in The Gambia, West Africa*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 Nov-Dec;88(6):638-43.**

30. Doannio J, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibe M, Chauvancy G, Rivière F. Comparaison de la composition spécifique et de la dynamique des populations de moustiques dans deux villages du centre de la Côte-d'Ivoire, avec et sans périmètre de riziculture irriguée. *Bull Soc Pathol Exot.* 2006;99(3):204-6.
31. Kweka E, Nkya W, Mahande A, Assenga C, Mosha F, Lyatuu E, et al. Mosquito abundance, bed net coverage and other factors associated with variations in sporozoite infectivity rates in four villages of rural Tanzania. *Malaria J.* 2008;7(1):59.
32. Coetzee M, van Wyk P, Booman M, Koekemoer LL, Hunt RH. Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes in a gold mining town in Ghana and implications for malaria control. *Bull Soc Pathol Exot.* 2006 Dec;99(5):400-3.
33. Okoye PN, Brooke BD, Koekemoer LL, Hunt RH, Coetzee M. Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Jun;102(6):591-8.
34. Dabire KR, Baldet T, Diabate A, Dia I, Costantini C, Cohuet A, et al. *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol.* 2007 Nov;44(6):990-7.
35. Cohuet A, Simard F, Wondji CS, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Fontenille D. High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of savannah-forest transition area in Cameroon. *J Med Entomol.* 2004 Sep;41(5):901-5.

36. Appawu M, Owusu-Agyei S, Dadzie S, Asoala V, Anto F, Koram K, et al. Malaria transmission dynamics at a site in northern Ghana proposed for testing malaria vaccines. *Trop Med Int Health*. 2004;9(1):164-70.
37. Kelly-Hope LA, Hemingway J, McKenzie FE. Environmental factors associated with the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in Kenya. *Malar J*. 2009;8:268.
38. Patz JA, Strzepek K, Lele S, Hedden M, Greene S, Noden B, et al. Predicting key malaria transmission factors, biting and entomological inoculation rates, using modelled soil moisture in Kenya. *Trop Med Int Health*. 1998 Oct;3(10):818-27.
39. Depinay JM, Mbogo CM, Killeen G, Knols B, Beier J, Carlson J, et al. A simulation model of African *Anopheles* ecology and population dynamics for the analysis of malaria transmission. *Malar J*. 2004 Jul 30;3:29.
40. The malERA Consultative Group on Modeling. A Research Agenda for Malaria Eradication: Modeling. *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000403.

## Address for Correspondence

Dr Vincent Corbel, IRD/CREC, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Benin; email:

vincent.corbel@ird.fr

## Tables

**Table 1 - Estimates of the fixed parameters of a multivariate Linear Mixed-Effects model to study malaria incidence in children of under 5 years of age (N = 84; number of groups = 28), according to vector biting rates and LLIN use rate**

Effect	Estimate	Std. error	95% Confidence interval		p-value
(Intercept)	7.879	1.474	4,990	10,768	<0.0001
Ln(HBR of <i>An. gambiae</i> s.s. +1)‡	0.623	0.715	-0,778	2,024	0.3875
Ln(HBR of <i>An. funestus</i> +1)‡	<b>2.065</b>	0.525	1,035	3,094	<b>0.0002</b>
>60% LLIN use §	<b>-4.510</b>	1.852	-8,228	-0,969	<b>0.0162</b>

‡ Human Biting Rates (HBR) of each vector species were add to 1 and logarithm transformed.

§ LLIN: Long Lasting Impregnated of insecticide Net

**Table 2 - Estimates of the fixed parameters of a logistic mixed-effect model to study the probability of achieving a LLIN use rate of over 60% in children of under 5 years of age, according to biting nuisance, nocturnal temperature and LLIN ownership (N = 79; number of groups = 27)**

Effects	Estimate	Std. error	Odds-ratio	95% Confidence interval		P-value
Biting nuisance (relative to ≤ 56 bites of mosquitoes per human per 100 nights) ‡						
57 - 447	-0.266	0.782	0.766	0.158	3.543	0.7331
448 - 1,456	0.368	0.750	1.445	0.331	6.509	0.6239
1,457 - 6,419	1.549	0.782	<b>4.704</b>	1.067	23.793	<b>0.0477</b>
Nocturnal temperature (relative to ≤ 19.5°C)						
19.6 - 20.5	0.504	0.763	1.656	0.373	7.728	0.5088
20.6 - 22	-1.035	0.795	0.355	0.069	1.627	0.1928
22.1 - 23.7	-1.912	0.825	<b>0.148</b>	0.026	0.683	<b>0.0205</b>
LLIN Ownership (relative to > 60% and ≤80%) §						
> 80%	0.712	0.634	2.037	0.603	7.571	0.2621

‡ Biting nuisance is the human biting rate of all culicidae.

§ LLIN: Long Lasting Impregnated Net.

## Figures

**Figure 1 - Map showing malaria incidence in children of under 5 years of age in 28 villages in Southern Benin during the dry season**

**Figure 2 - Mean village-survey malaria incidence in children of under 5 years of age for zero and positive EIRs of (a) *An. funestus* and (b) *An. gambiae s.s.***

Error bars represent standard error. EIR: Entomological Inoculation Rate.

**Figure 3 - Mean village-survey malaria incidence in children of under 5 years of age for (a) >80% LLIN ownership and (b) > 60% LLIN use**

Error bars represent standard error. LLIN: Long Lasting Impregnated Net.

**Figure 4 - Mean village-survey LLIN use rates in children of under 5 years of age according to the quartiles of (a) biting nuisance and (b) nocturnal temperature**

Quartiles of biting nuisance are 1: ]6;56], 2: ]56;447], 3: ]447;1456], 4: ]1456;6419] in bites of mosquitoes per human per 100 nights. Quartiles of temperature are 1: ]14.1;19.5], 2: ]19.5;20.5], 3: ]20.5;22], 4: ]22;23.7] in Celsius degrees. Error bars represent standard error. Quartiles carrying the same letter are not significantly different according to a linear mixed-effect model taking into account repeated measurement (p-value<0.05). LLIN: Long Lasting Impregnated Net.

**Figure 5 - Village-survey LLIN use rate in children aged 0-5 years versus LLIN ownership rate and the loess trend curve**

LLIN: Long Lasting Impregnated Net.



## Annexe 3 : Protocoles

## Extraction d'ADN au CTAB, sur moustique entier

Myriam et Cécile, avril 2003

D'après : une technique que faisait Myriam dans son ancien labo ; pas de publication à ce jour.

- 1- Broyer chaque moustique dans 200 µl de CTAB 2%
- 2- Mettre au Bain-Marie 65° pendant 5 minutes
- 3- Ajouter 200 µl de chloroforme - Mélanger par inversion.
- 4- Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm, à TA
- 5- Prélever la phase supérieure et la mettre dans un autre tube
- 6- Ajouter 200 µl d'Isopropanol sur ce surnageant - Bien mélanger par inversion
- 7- Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm et TA
- 8- Vider l'Isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 µl d'Ethanol 70%
- 9- Centrifuger 5 minutes, 12 000, TA
- 10- Vider l'Ethanol
- 11- Sécher le culot 5 minutes maximum au speed-vac
- 12- Reprendre dans 20 µl d'H<sub>2</sub>O - Ne pas vortexer - Laisser suspendre sur la paillasse toute la nuit (ou une 1/2 journée)

### CTAB 2%

Réactifs	Volume	Conc. finale
1 M Tris HCl pH 8.0	100 ml	100 mM
0.5 M EDTA	20 ml	10 mM
NaCl	81.8 g	1.4 M
CTAB*	20 g	2 %
ddH <sub>2</sub> O	QSP 1 L	

\* Cetyl trimethyl ammonium bromide

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à TA.

## PCR diagnostique *An. gambiae* s.l.

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Elle distingue en Afrique de l'Ouest: *An. gambiae*, *An. arabiensis* et *An. melas*

Réf: Scott JA, Brogdon W & Collins FH. Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993, 49(4):520-9.

### Amorces

UN GTGTGCCGCTTCCTCGATGT  
AG CTGGTTTGGTCGGCACGTTT  
AA AAGTGTCTTCTCCATCCTA  
AM GTGACCAACCCACTCCCTTGA

### Conditions PCR

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

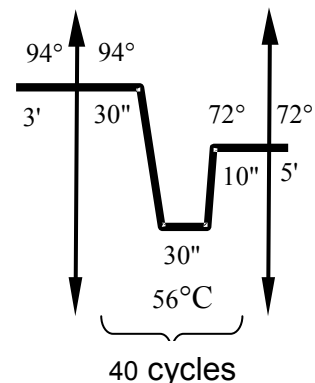
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer UN (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AG (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AA (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Primer AM (10 µM)	5 pmoles	0.5 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25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

### Amplification :

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

### Taille attendue

*An. gambiae* : 390 bp  
*An. arabiensis* : 315 bp  
*An. melas* : 464 bp



## Formes moléculaires M et S d'*An. gambiae*

ISA, janv 2003

Polymorphisme d'un segment de l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

Réf : Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I & Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 2001, 10(1):19-23.

### Amorces

R3 : GCAATCCGAGCTGATAGCGC

R5 : CGAATTCTAGGGAGCTCCAG

Mop int : GCCCCTTCCTCGATGGCAT

B/S int : ACCAAGATGGTTCGTTGC

### Conditions PCR

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

Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O		14.45 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

### Amplification :

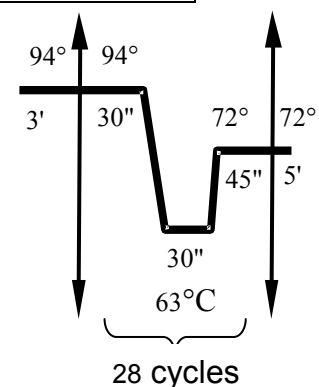
3' [30", 30", 45"]<sub>28c</sub> 5' @ 63°C

### Taille attendue

R3/R5 : ~1300 bp

M : 727 bp

S : ~475 bp



## Mutation Kdr

ISA, janv 2003

Polymorphisme dans un gène codant pour un canal à Na, associé à la résistance au DDT et aux pyréthrinoides.

Kdr : phénotype « Knockdown resistance »

Réf : Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N & Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998, 7(2):179-84.

### Amorces

D1 ATAGATTCCCCGACCATG  
D2 AGACAAGGATGATGAACC  
D3 AATTTGCATTACTTACGACA  
D4 CTGTAGTGATAGGAAATTTA

### Conditions PCR

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

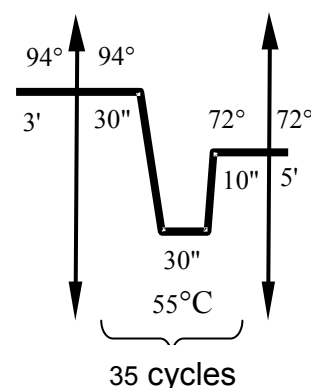
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de Taq 10 X contenant 15 mM MgCl <sub>2</sub>	1 X 1.5 mM	2.5 µl
5 mM dNTP	0.2 mM each	1.0 µl
Primer D1 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D2 (10 µM)	6 pmoles	0.6 µl
Primer D3 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Primer D4 (10 µM)	20 pmoles	2.0 µl
Taq DNA Polym (5 U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ddH <sub>2</sub> O		14.75 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

### Amplification :

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

### Taille attendue

D1/D2 : 293 bp  
D1/D3 : 195 bp **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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O		17.95 µl
DNA template (1 à 5 ng/µl)		1.5 µl

### Amplification :

3' [30", 30", 30"]<sub>35c</sub> 5' @ 62°C

### Taille attendue

Ex3AG : 541 bp

Vérifier 5µl de produit de PCR sur gel d'agarose 1.5%

### Digestion enzymatique

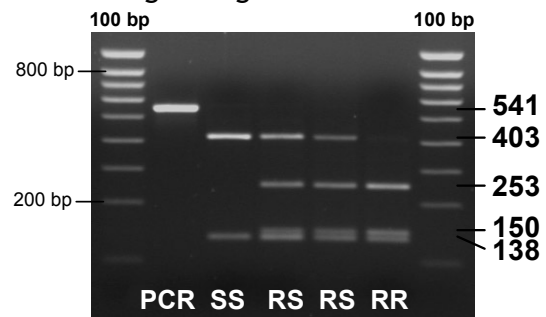
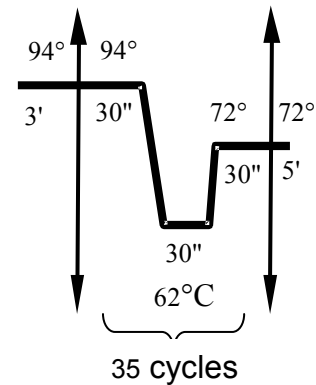
Réactifs	Conc. finale	pour 1 rxs à 25 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	1 X	2.5 µl
Alu I (5 U/µl)	2.5 U	0.5 µl
ddH <sub>2</sub> O		14.0 µl
Produit PCR		8.0 µl

Incuber à 37°C pendant 3 heures, voire toute la nuit.

Vérifier la réaction en faisant migrer 10µl de la digestion sur un gel d'agarose 2%.

### Tailles attendues

Génotype	SS	RR
taille	403 bp 138 bp	253 bp 150 bp 138 bp



## PCR diagnostique d'espèces du groupe *An. funestus*

ANNA, fév 2003

Selon: Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M, 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* 66: 804-11.

Et modifié par Anna Cohuet : ajout de l'amorce spécifique d'*An. rivulorum*-like

### Séquences et Tm des amorces spécifique des espèces du groupe *An. funestus*.

Primers	Sequences (5' to 3')	Tm (°c)	Espèce identifiée	Taille du produit PCR
UV	TGT GAA CTG CAG GAC ACA T	55.34	-	-
FUN	GCA TCG ATG GGT TAA TCA TG	52.4	<i>An. funestus</i>	505
VAN	TGT CGA CTT GGT AGC CGA AC	58	<i>An. vaneedeni</i>	587
RIV	CAA GCC GTT CGA CCC TGA TT	58.8	<i>An. rivulorum</i>	411
PAR	TGC GGT CCC AAG CTA GGT TC	60.5	<i>An. parensis</i>	252
LEES	TAC ACG GGC GCC ATG TAG TT	60.2	<i>An. leesoni</i>	146
RIVLIKE	CCG CCT CCC GTG GAG TGG GGG	60.7	<i>An. rivulorum-like</i>	313

### Conditions de la PCR : Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207)

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale ou quantité	Volume (µl)
Tampon 10X qiagen	10X(dont 15mM MgCl <sub>2</sub> )	1X	2.5
MgCl	25 mM	2.5 mM	1
DNTP	5mM each	0.2mM each	1
Amorce UV	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Amorce VAN	10 pmol/µl	10 pmol	1
Amorce FUN	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Amorce RIV	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Amorce RIVLIKE	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Amorce PAR	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Amorce LEE	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Taq polymerase Qiagen	5U/µl	0.5 U	0.1
ADN	-	environ 10 ng	3µl <sup>1</sup>
H <sub>2</sub> O	-	-	QSP 25
Volume final	-	-	25

1 : dilution 1/10 d'ADN extrait à partir des pattes et élué dans 100µl

### Amplification :

Dénaturation initiale	94°C	2 min	36 cycles
dénaturation	94°C	45 sec	
annealing	45°C	30 sec	
élongation	72°C	40 sec	
Elongation finale	72°C	10 min	

Déposer 10 µl du produit PCR sur gel d'agarose à 2% coloré au BET, migration 1H à 120V et 250 mA.

**PCR microsatellites *Anopheles funestus***

ANNA, fév 2003

**Amorces :**

locus	séquences	Marquage de l'amorce F	Taille (pb)	Articles références
AF2	F : ATAAACCCGTCCATTCCTT R : CCTATGATTGCTCCTGACA	TET	140	Sinkins et al. (2000) <sup>1</sup>
AF3	F : ACGACTGTAACCACAACACC R : TAGTAGCGAAGGCGAAAAGAT	HEX	180	
AF5	F : CCTCTCGTTGTGTTGCCTAC R : GTTCATACGTTGCCGATTT	FAM	170	
AF7	F : TGCATCATTCGACTGGAAG R : AACGGCACTACCGTTCCTG	TET	80	
AF19	F : CAGAACCACTTCGATTCAAC R : CCTGCACTCAGAAACACAC	FAM	180	
AF20	F : AGAACCACTTAGGGAACAG R : TTTACAACCAGCAGCACAC	HEX	130	
FunG	F : GAGCAAGCAGCTTACTGCAC R : ACGTTCAGTGCACATCAATG	TET	150	Cohuet et al. (2002) <sup>2</sup>
FunF	F : GCCTTCAGTTTCGATTGGCG R : AATAAGATGCGACCGTGGC	FAM	110	
FunD	F : GCTAACTACTCCGAAGCGCT R : GATCGCAAACTTCCGGTT	HEX	160	
FunL	F : AACAGTGGAAAGCAAATTGC R : GCACGGTTACCACTGCTCA	TET	150	
FunO	F : GCACACATTTTCAGGCAGC R : GCCACATTTCTGCACCTT	FAM	120	

1. Sinkins SP, Hackett BJ, Costantini C, Vulule J, Ling YY, Collins FH, Besansky NJ, 2000. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the malaria vector *Anopheles funestus*. *Mol Ecol* 9: 490-2.
2. Cohuet A, Simard F, Berthomieu A, Raymond M, Fontenille D, Weill M, 2002. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology Notes* 9, 498-500.

**Conditions PCR : Avec la Taq Quiagen (Cat. N 201207)**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale ou quantité	Volume (µl)
Tampon 10X qiagen	10X	1X	2.5
dNTP	5 mM each	0.2 mM each	1.0
Amorce F	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Amorce R	10 pmol/µl	5 pmol	0.5
Taq polymerase Qiagen	5U/µl	0.5 à 1 U <sup>1</sup>	0.1 à 0.2 <sup>1</sup>
ADN	-	environ 10 ng	3µl <sup>2</sup>
H2O	-	-	QSP 25
Volume final	-	-	25

1 : 0.5 Unité pour les loci AF2, 5, 19, Fun D, F, G, L, O

1 Unité pour les loci AF 3, 7 et 20

2 : dilution 1/10 d'ADN extrait à partir des pattes et élué dans 100µl



**Amplification :**

Dénaturation initiale	94°C	3 min	36 cycles
dénaturation	94°C	30 sec	
annealing	54°C <sup>3</sup>	30 sec	
élongation	72°C	30 sec	
Elongation finale	72°C	10 min	

3 : sauf pour AF2 et AF3 : 52 °C

**Mélanges :**

Après les PCR et après migration d'une portion du produit PCR pour qq individus sur gel d'agarose, faire les mélanges de produits PCR en fonction de l'amplification (volume identique à 4 fois supérieur) :

Mélanger les produits d'amplification : - de AF 2, 3, 5 et 7 , l'amplification est souvent faible avec AF7, voire pas visible sur agarose, donc mettre un volume plus important que pour les autres loci. Par exemple 20µl pour AF 7, 10µl pour AF 3 et 5 µl pour AF 2 et AF5.

- de AF 19, 20, FunG et FunF. L'amplification d'AF20 est souvent plus faible que les autres , donc augmenter le volume de son produit PCR lors des mélanges.

- de Fun D, L et O. L'amplification est bonne pour ces 3 loci, si le signal est fort, faire un mélange à volume égal des 3 produits PCR est les diluer à ½.

Envoyer les mélanges à Genome Express (Sara Briggs, 11 chemin des prés, 38944 Meylan, France, tel : 33 4 56 38 11 02, fax : 04 56 38 11 00)

Accompagner chaque plaque d'une feuille de route en version électronique (fichier ci-joint)

Les résultats sont reçus sur un CD et lisibles à l'aide du logiciel Genescan.

**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**

## Réactifs et quantités pour ELISA - CSP

DF, janvier 2003

### \* PBS

Reconstituer le PBS en poudre Sigma :  
9,7 g dans 1 L d'eau distillée (ex réf. Sigma D 5773)

\* **NP 40/BB** = Nonidet P40 (Sigma n° 3516, 50 ml) pour une plaque 2 ml = 25 µl NP 40 + 2 ml BB, agiter (préparer pour 5 plaques 10 ml + 125 µl NP 40)

\* **BB** = Dans un litre PBS, ajouter :

- 1) 5 g de Casein (Sigma C 5890)
- 2) 0,1 g de Thiomérosal (Sigma T 5125)
- 3) 0,04 g de Phenol red (Sigma P 4758)
- 4) 10 g de BSA (Sigma A 7906)

AGITER 2H

(pour les calculs une plaque, moustiques à broyer compris : 100 ml de BB)

\* **PBS/TWEEN 20** - 500 µl de Tween 20 dans 1l de PBS, agiter (Sigma P 1379)

### Substrat de Peroxydase = Pour 3 plaques :

- \* 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- \* 30 ml de Tampon citrate
- \* 12 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10% (ou 4 µl à 30%, ou 6 µl à 20%).

### Tampon Citrate pH4

- préparer le Tampon Citrate pH4 : Pour 1 litre :

Acide citrique, 1 H <sub>2</sub> O	11,77 g
Hydroxyde de Sodium	4,48 g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution. Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N. Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

### RECONSTITUTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX LYOPHILISES (ACm)

\* milieu reconstitution = 1/2 volume H<sub>2</sub>O + 1/2 volume Glycérol (Sigma G.9012)

- 1,0 mg ACm + 2 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)
- 0,5 mg ACm + 1 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)
- 0,25 mg ACm + 0,5 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

## QUANTITE D'ACM NECESSAIRE :

### - Sensibilisation : ACm capture dans du **PBS**

DILUTIONS RECOMMANDEES PAR WIRTZ :

*P. falciparum* capture = 0.10µg / 50µl PBS (soit 10 µg par plaque : soit 20 µl par plaque dans 5 ml PBS )

*P. vivax-210* capture = 0.025µg / 50µl PBS (soit 2,5 µg par plaque : soit 5 µl par plaque dans 5 ml PBS)

*P. vivax-247* capture = 0.05µg / 50µl PBS (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml PBS)

#### CAPTURE Pour 1 plaque

*p. falciparum* : 15 µl/5 ml PBS  
*p. vivax 210* : 5 µl/5 ml PBS  
*p. vivax 247* : 10 µl/5 ml PBS  
*p. malariae* 60 µl/5 ml PBS  
*p. ovale* 15 µl/5 ml PBS

#### Pour 3 plaques

f : 45 µl/15 ml PBS  
v 210: 15 µl/15 ml PBS  
v 247 : 30 µl/15 ml PBS  
m : 180 µl/15 ml PBS  
o : 45 µl/15 ml PBS

### - Révélation : ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**

DILUTIONS RECOMMANDEES PAR WIRTZ :

*P. falciparum* peroxidase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB )

*P. vivax -210* peroxidase = 0.05µg / 50µl BB (soit 5 µg par plaque : soit 10 µl par plaque dans 5 ml BB )

*P. vivax -247* peroxidase = 0.01µg / 50µl BB (soit 1 µg par plaque : soit 2 µl par plaque dans 5 ml BB )

#### CONJUGUES Pour 1 plaque

*p. falciparum* : 7,5 µl/5 ml BB  
*p. vivax 210*: 10 µl/5 ml BB  
*p. vivax 247* : 2 µl/5 ml BB  
*p. malariae* 15 µl/5 ml BB  
*p. ovale* 15 µl/5 ml BB

#### 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 BB  
o : 45 µl/15 ml BB

Les ACM sont fournis par le Dr WIRTZ, CDC Atlanta

## TEMOINS

### Dilutions pour les témoins positifs CSP antigen de *P. f.*, *P. v 210* et *P. v 247*

Attention reconstitution du lyophilisa dans eau distillée, puis dilution dans BB

Ces témoins sont fournis par le CDC

Espèce plasmodiale	Numéro de la Solution	Volume de l'antigène controle positif	Volume de Blocking Buffer (BB)	Concentration en antigène dans 50 µl
<i>P. falciparum</i>	Stock	Pf lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist.	----
	I	5µl de stock	500µl BB	500ng
	II	10µl de I	1000µl BB	5000pg
	* III Témoin pos	20µl de II	1000µl BB	100pg
<i>P. vivax 210</i>	Stock	Pv210 lyophilisé (25 µg)	25 µl d'eau dist	----
	A	5µl de stock	500µl BB	500ng
	B	10µl de A	1000µl BB	5000pg
	C	20µl de B	500µl BB	200pg
	* D Témoin pos	200µl de C	800µl BB	40pg
<i>P. vivax 247</i>	Stock	Pv247 lyophilisé (25 µg)	25µl d'eau dist	----
	1	5µl de stock	500µl BB	500ng
	2	40µl de 1	1000µl BB	20ng
	3 Témoin pos	100µl de 2	700µl BB	2.5ng

PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué



## CONTROLE DE QUALITE DES INTERVENTIONS – QUESTIONNAIRE

NUMERO D'IDENTIFICATION UNIQUE QUESTIONNAIRE : ..... /...../...../.....

NOM ENQUETEUR :.....

CODE ENQUETEUR : .....

DATE DE L'ENQUETE :.....

NUMERO DE L'ENQUETE :.....

### 1- ZONE D'ENQUETE

HAMEAU :.....

NUMERO MAISON :.....

RESPONSABLE MAISON OU PERSONNE INTERROGEE :.....

TYPE D'INTERVENTION: PNLP  MIILD  MIILD + BACHES  IRS

### 2- MOUSTIQUAIRES

NOMBRE DE MOUSTIQUAIRE REFS2 DISTRIBUEE :..... Non retrouvée/Perdue.....

NOMBRE DE MOUSTIQUAIRE REFS2 EN PLACE (VU PLACE DANS L'HABITATION):.....

NOMBRE DE MOUSTIQUAIRE REFS2 NON UTILISEE (Demander qui a dormi sous MIILD la veille) :.....

Si non utilisée, POURQUOI ?

Ancienne encore en place

Ne veut pas l'utiliser/Dans la malle

Mise en place juste avant le contrôle

Autre raison :.....

NOMBRE TOTAL DE PERSONNE DANS LA MAISON :.....

NOMBRE DE PERSONNE DORMANT SOUS MOUSTIQUAIRE REFS2 :.....

Nombre d'enfants (0-5 ans) :.....

Nombre de jeunes (6-24 ans) :.....

Nombre d'hommes :.....

Nombre total de femmes :..... dont femmes enceintes :.....

NOMBRE DE PERSONNE DORMANT HORS MOUSTIQUAIRE OU SOUS MOUSTIQUAIRE AUTRE QUE REFS2 (PNLP, personnelle, ...) :.....

Nombre d'enfants (0-5 ans) :.....

Nombre de jeunes (6-24 ans) :.....

Nombre d'hommes :.....

Nombre total de femmes :..... dont femmes enceintes :.....

ETAT DES MOUSTIQUAIRES

Bon état  Déchirée/Trouée  Brûlée  Autre :.....