



REPUBLIQUE DU BENIN

-----000-----

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-----000-----

UNIVERSITE D'ABOMEY- CALAVI

-----000-----

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

-----000-----

**LABORATOIRE EVOLUTION, BIODIVERSITE DES ARTHROPODES ET
ASSAINISSEMENTS**

THESE

N° 305

Présentée par :

Albert Sourou SALAKO

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi

Spécialité: Entomologie Médicale et Vétérinaire

THEME :

**Impact entomologique de la pulvérisation intradomiciliaire
dans deux départements (Alibori et Donga) au Nord du
Bénin, Afrique de l'Ouest**

Soutenue publiquement devant le jury composé de:

Président : Clément AGBANGLA, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Rapporteurs: Luc DJOGBENOU, Maître de conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Seth IRISH, PMI Entomology, Team Lead CDC, Atlanta, USA

Examineur : Ousmane FAYE, Professeur Titulaire, Université Cheick Anta Diop, Sénégal

Directeur : Martin C. AKOGBETO, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Année Académique : 2019-2020

Date de soutenance : 26 Novembre 2020.



U.S. President's Malaria Initiative

Résumé:

Avec l'appui du PMI (President's Malaria Initiative), la Pulvérisation Intradomiciliaire d'Insecticide (PID) a été introduite au Bénin depuis 2008 en raison de l'émergence et de l'expansion de la résistance des anophèles vecteurs aux insecticides pyréthréinoïdes qui constituent la seule famille d'insecticide homologuée par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires. Après six années de campagne PID dans l'Atacora au nord du Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a décidé du retrait partiel de l'intervention de certaines communes et, de son extension dans deux autres départements (Alibori et Donga). Cette décision entre non seulement dans le cadre de la mise en œuvre du plan national de gestion de la résistance aux insecticides mais, elle offre également la possibilité à deux départements de forte prévalence palustre n'ayant jamais bénéficié de cette intervention d'être couverts. L'objectif principal du présent travail était de mesurer l'impact de la PID sur la transmission du *Plasmodium falciparum* dans ces deux départements. En amont au déploiement de cette intervention, le présent travail de thèse a d'abord permis 1) de disposer des données entomologiques de base sur la dynamique des principaux moustiques et, la transmission du paludisme ; 2) d'étudier le statut et les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides dans la zone d'étude, une approche de solutions à la problématique selon laquelle les interventions de lutte antivectorielle sont mises en œuvres sans consulter des données suffisantes pour guider l'élaboration des politiques de lutte, lesquelles données serviront également à la mesure de l'impact de cette intervention de lutte. Le suivi post-intervention a permis d'estimer à environ 4 à 5 mois la durée d'efficacité résiduelle de Actellic 300 CS (pirimiphos methyl), seul insecticide dont, toutes les populations de vecteurs ont montré une parfaite sensibilité, et qui a été choisi pour les deux campagnes de PID réalisées en 2017 & 2018 dans la zone. Pendant cette période, le taux d'infectivité (IS) de *An. gambiae* s.l. au *P. falciparum* était de 0,71% après la première année de la PID dans la zone traitée contre 3,7% dans la zone témoin et, de 0,6% après la deuxième année de la PID contre 3% dans la zone témoin ($p < 0,0001$). Similairement, chaque personne recevait dans la zone traitée 1,6 piqûres infectantes/mois et 1,5 piqûres infectantes/mois contre 12,11 piqûres infectantes/mois et 9,75 piqûres infectantes/mois dans la zone témoin respectivement après la première et deuxième année de la PID, soit une réduction significative du taux d'inoculation entomologique (TIE) de 86,78% en 2017 et 84,61% en 2018. Une comparaison respective de ces indicateurs avant la PID et après le premier tour de la PID a révélé une réduction de l'IS de 85,75% et du TIE de 87,27%. Par ailleurs, la densité moyenne de *An. gambiae* s.l. se reposant par chambre traitée était comprise entre 0,38 et 0,48 contre 1,53 et 1,76 par chambre non traitée respectivement après la première et la deuxième année de PID. Ces résultats montrent que la PID est une stratégie complémentaire efficace pour réduire l'intensité de la transmission et pour une gestion efficace de la résistance au nord du Bénin.

Mots clés : paludisme, lutte antivectorielle, PID, évaluation, nord Benin.

Abstract:

With the support of PMI (President's Malaria Initiative), Indoor Residual Spraying (IRS) has been introduced in Benin since 2008 due to the emergence and expansion of resistance of *Anopheles* vectors to pyrethroid insecticides, which is the only family of insecticides registered by WHO for impregnation of mosquito nets. After six years of IRS campaign in Atacora in northern Benin, the National Malaria Control Programme (NMCP) has decided to partially withdraw the intervention from some districts of the region and to extend it to two other regions (Alibori and Donga). This decision not only falls within the framework of the implementation of the national insecticide resistance management plan, but it also offers the possibility to two high malaria prevalence regions that have never benefited from this intervention to be covered. The main objective of this work was to measure the impact of IRS on *Plasmodium falciparum* transmission in these two departments. Prior to the deployment of this intervention, the current thesis first provided 1) basic entomological data on the dynamics of the main mosquitoes and malaria transmission; 2) the status and mechanisms of vector resistance to insecticides in the study area, a solution approach to the problem that vector control interventions are implemented without consulting sufficient data to guide the development of control policies, which data will also be used to monitor the impact of the intervention. Post-intervention monitoring estimated the residual efficacy period of Actellic 300 CS (pirimiphos methyl), the only insecticide for which all vector populations showed perfect susceptibility, to be approximately 4 to 5 months; this insecticide was chosen for the two IRS campaigns conducted in 2017 & 2018 in this area. During this period, the infectivity rate (IS) of *An. gambiae* s.l. to *P. falciparum* was 0.71% after the first year of IRS in the treated zone compared to 3.7% in the control zone and, 0.6% after the second year of IRS compared to 3% in the control zone ($p < 0.0001$). Similarly, each person received 1.6 infective bites/month and 1.5 infective bites/month in the treated area compared to 12.11 infective bites/month and 9.75 infective bites/month in the control area after the first and second year of IRS respectively, representing a significant reduction in the entomological inoculation rate (EIR) of 86.78% in 2017 and 84.61% in 2018. A respective comparison of these indicators before and after the first round of IRS revealed a reduction of 85.75% for the SI and, 87.27% for the EIR. Furthermore, the mean density of *An. gambiae* s.l. resting per treated chamber was between 0.38 and 0.48 compared to 1.53 and 1.76 per untreated room after the first and second year of IRS respectively. These results show that IRS is an effective complementary strategy for reducing the intensity of malaria transmission and for effective resistance management in northern Benin.

Keywords: malaria, vector control, IRS, evaluation, north Benin.

Dédicace

***A mon Feu Père
Tito SALAKO
qui aurait été heureux d'assister à la présentation de ce travail.***

Remerciements

Nous y sommes, la dernière page à écrire pour parler d'autres choses que de la recherche. Ici, prend fin une aventure, mais avant de la clôturer, il convient de rendre grâce au Seigneur mon Dieu pour ces bienfaits quotidiens dans ma vie et pour la merveille que je suis pour lui.

Tout au long de mes travaux de recherche et de la rédaction, beaucoup de personnes m'ont encouragé et soutenu à différents niveaux. Aujourd'hui, j'aimerais pouvoir les remercier :

En premier lieu, je tiens à remercier mon Directeur de thèse Pr Martin Akogbéto, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et rendu possible cette thèse. C'est grâce à votre volonté et votre détermination que ce travail a vu le jour. Je suis arrivé pour mon Master d'Entomologie Appliquée au Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) où vous m'avez offert l'opportunité de faire un stage et je ne le regrette pas. Vous m'avez formé, soutenu et inculqué les notions qui m'ont permis d'évoluer et d'avancer. Je vous suis très reconnaissant pour votre encadrement exemplaire. Merci de m'avoir fait aimer l'entomologie de terrain, apprécier la beauté de l'anophèle, progresser sur le chemin de l'autonomie, vous êtes un exemple pour moi. Votre simplicité, votre jovialité, votre amour du travail bien fait, votre excellente qualité dans la gestion des ressources humaines et matérielles, votre rigueur scientifique et l'endurance dont vous faites preuve ont toujours forcé notre admiration. C'est ici, le lieu de vous témoigner l'amour inconditionnel que j'ai pour vous. Contribuer au bonheur d'autrui est une tâche que seules les grandes âmes comme vous comprennent car vous nous donnez beaucoup de votre temps, de votre amour et de votre confiance. Daignez trouver ici le témoignage de notre gratitude;

Dr Germain Gil Padonou, enseignant chercheur au Département de Zoologie de l'Université d'Abomey-Calavi et actuel Directeur du CREC, de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de me donner tout ce dont j'ai besoin pour mener à bien mes travaux de recherche. Vous avez toujours répondu présent pour m'aider dans toutes mes difficultés de doctorant. Merci pour l'accueil, la sympathie et la disponibilité tout au long de cette thèse.

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

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse.

J'exprime un profond respect et une estime particulière à l'endroit du Professeur Clément Agbangla, pour avoir accepté avec promptitude d'être rapporteur de cette thèse. Malgré vos

nombreuses occupations, vous avez accepté avec convivialité de présider cette évaluation. Veuillez recevoir mes sincères remerciements;

Je dis infiniment merci aux Docteurs (MC) Luc Djogbénou et Seth Irish pour le fait que, en dépit de leurs occupations et responsabilités plurielles, ils aient accepté d'être pré-rapporteurs de cette thèse et de participer au jury de soutenance.

Je suis également reconnaissant au Professeur Ousmane Faye pour avoir accepté siéger dans ce jury international de haut niveau en qualité d'examineur.

Professeurs Clément Agbangla et Baba-Moussa Saïd Lamine, vous avez été les dirigeants de mon Ecole Doctorale Sciences de la Vie (EDSV) de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST). Sincère merci pour avoir accepté mon inscription et répondu toujours à nos sollicitations administratives.

J'exprime ma profonde gratitude aux Docteurs (MC) Luc Djogbénou et Armel T. Djèntonin qui n'ont ménagé aucun effort pour l'évaluation des travaux de cette thèse. Je vous dis infiniment merci pour vos remarques, vos orientations, vos commentaires pertinents, vos incitations au travail bien fait, vos contributions scientifiques au cours des différentes étapes de rédaction du manuscrit de thèse.

Mes profondes gratitudes vont spécialement à :

Mesdames et Messieurs, Raymond Beach, Michael Humes, Irish Seth, Monica Patton, Daniel Impoinvil, Peter Thomas, Patrick Condo, Fortuné Dagnon, Ahmed Saadani Hassani, Aurore Ogouyèmi-Hounto et Filémon Tokponnon. Vous avez été d'une importance capitale dans la rédaction de cette thèse. Les nombreuses idées que vous avez apportées lors des différentes réunions des projets visant le suivi et évaluation entomologique de la Pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide à effet rémanent ont été pour moi de précieuses contributions. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude pour notre fructueuse et franche collaboration.

Mes sincères remerciements vont également à l'endroit du Dr Arthur Sovi et Dr Rodrigue Agossa qui n'ont ménagé aucun effort pour leurs contributions scientifiques, leurs remarques, leurs orientations, leurs commentaires pertinents au cours des différentes étapes de rédaction des articles et du manuscrit de thèse.

Toute ma gratitude à l'endroit de Dr Rock Aïkpon, je voudrais vous dire grand merci pour votre noble soutien, votre sincère collaboration et pour les moments forts vécus ensemble au nord du Bénin dans le cadre des activités de surveillance entomologique financées par PMI/USAID et comptant pour cette thèse.

J'adresse mille mercis aux Drs Razaki Ossè, Renaud Govoétchan et Roseric Azondékon. Chers aînés, j'ai bénéficié de précieux conseils de votre part et nos échanges m'ont été très utiles pour la réalisation de ce travail. Recevez à travers ce document, mes sincères remerciements.

Une attention particulière à tous les chercheurs du CREC, je voudrais nommer Messieurs et mesdames Alain Nahum, Corine Ngufor, Rodrigue Anagonou, Virgile Gnanguenon, Bio-Bangana Sahabi, Roseline Atolou, Ramziath Agbanrin, Kèfilath Badirou, Armand Akpo, Marius Allossogbe. Merci pour vos précieux conseils durant cette période.

Je dis infiniment merci aux messieurs Aboubacar Sidick, Bruno Akinro, Olivier Oussou, Wilfrid Sewadé, Juvénal Ahouandjinou, Bruno Adjottin et madame Linda Towakinou pour votre entière disponibilité pour la réalisation des travaux de terrain, de biologie moléculaire et de l'analyse statistique.

A ma deuxième famille, le Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), je tiens à remercier tous les étudiants, techniciens et personnels administratifs du CREC pour leur sympathie et leur aide quotidienne. Je veux remercier particulièrement: Médard Yamadjako, Safiou Idrissou, Clémence Durand, Balbine Kindji, Steve Hougbe, Marcelle Gandonou, Axelle Hounsou, Ikililou Congo, Soumanou Kifayath, Sébastien Koudenoukpo, Herbert Noukpo, Saïd Tchitou, Roland alia, Moustapha Idrissou, Jacques Zola-Sahossi, Boris N'dombidje, Judicaël Nounagnon, Damien Todjinou, Herbert Noukpo, Arouna Sale, Lazare Houkanrin, Saka Alabi, Issiaka Adelodjou, Abibatou Odjo, Estelle Vigninou, Josias Fagbohoun, Augustin Fongnikin, Richard Houssou, Faizil Kifouly, Guy Agbangla.

Mes chers amis Dr Rodrigue Anagonou, Dr Prudencienne Agboho, Dr Armand Akpo, Serge Akpodji, Laurette Kiki, Abibatou Odjo, Roland Alia, Estelle Akogou, Martial Gbegbo de la quatrième promotion de Master d'Entomologie Appliquée de la FAST, je voudrais vous dire un chaleureux merci pour rappeler l'ambiance conviviale de nos relations qui sont demeurées très solidaires.

Monsieur Idelphonse Ahogni mon collègue de promotion, je voudrais te dire grand merci pour ton noble soutien, ta sincère collaboration et pour les moments forts vécus ensemble au cours de la présente thèse au CREC.

Messieurs Casimir Kpanou, André Sominahouin, Arsène Fassinou, Come Zinsou Koukpo, Hermann Sagbohan, Boulais Yovogan, Esdras Odjo, Constantin Adoha tous doctorants, 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.

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

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

Ma mère Elisabeth Koudjo et mon feu père Tito Salako, les mots me manquent pour, vous exprimer ma profonde reconnaissance pour toutes les peines que vous vous êtes données pour mon

éducation. Puisse Dieu vous récompenser. Veuillez trouver dans la présente thèse le fruit de tous les sacrifices que vous avez consentis;

Mes frères et sœurs, Fifadji, Jeanne, Célestin, Hyacinthe, Pierre, François, Marcelin, Madeleine, Vihoutou, Joseph et Emile je ne pourrai jamais exprimer avec exactitude tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes précieux pour moi et je vous souhaite réussite et bon courage dans la vie. Je voudrais que le présent travail soit un bon exemple pour vous, en ce qui concerne la ténacité, le courage et la persévérance dans la poursuite de vos objectifs dans la vie;

Sévérine ma chère épouse, Frenel et Axel mes adorables fils, votre présence à mes côtés a été un grand soutien. En dépit de mes nombreuses absences, conséquence de mes études, vous avez été compréhensifs. Merci pour votre confiance et votre amour;

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

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

Remerciements plus personnels à mon Dieu, mon créateur pour m'avoir soutenu et porté tout au long de ces années. Ta fidélité est grande, Seigneur Jésus !!!

Table des matières

Abstract:	iii
-----------------	-----

Dédicace	iv
Remerciements	v
Liste des figures	xiv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Objectifs et hypothèses de l'étude.....	5
Objectif général	5
Objectifs spécifiques	5
Les objectifs spécifiques se déclinent en quatre parties:.....	5
Hypothèses	6
Quatre hypothèses justifient ce travail :	6
Approche rédactionnelle	6
1. GENERALITES.....	8
1.1. Situation actuelle du paludisme dans le monde	8
1. 2. Les vecteurs responsables du paludisme	10
1.2.1. Systématique des anophèles vecteurs.....	10
1.2.2. Cycle de développement des anophèles	10
1.2.3. Les vecteurs du paludisme en Afrique	13
1.2.3.1. Les anophèles et leur rôle dans la transmission	13
1.2.3.1.2. Distribution et comportement trophique de <i>An. gambiae</i> , <i>An. coluzzii</i> et <i>An. arabiensis</i> ..	15
1.2.3.1.3. Le groupe <i>An. funestus</i>	16
1.2.3.1.4. Le complexe <i>An. nili</i>	17
1.3. Espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme	17
1.3.1. Cycle de développement du <i>Plasmodium</i>	18
1.3.2. Faciès épidémiologique du paludisme	20
1.4. Mesure de la transmission	22
1.4.1. Capacité vectorielle et autres indices entomologiques.....	23
1.4.1.1. Capacité vectorielle et compétence vectorielle	23
1.4.1.2. Autres indices entomologiques utilisés pour la mesure de la transmission	24

1.5.1. Lutte anti-parasitaire	25
1.5.2. Lutte anti-vectorielle	28
1.5.2.1. La lutte anti-larvaire	29
1.5.2.2. Lutte adulticide.....	30
1.5.2.2.1. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides	30
1.5.2.2.2. La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent	32
1.5.2.2.3. Lutte contre la transmission du <i>Plasmodium</i> : nouvelles approches.....	33
1.6. Les insecticides utilisés en santé publique et modes d'action.....	34
1.6.1. Les organochlorés	35
1.6.2. Les pyréthriinoïdes	35
1.6.3. Les organophosphorés.....	35
1.6.4. Les carbamates	36
1.6.5. Les régulateurs de croissance	36
1.6.6. Les toxines bactériennes.....	37
1.6.7. Les pyrroles	37
1.6.8. Les néonicotinoïdes.....	37
1.7. Résistance aux insecticides	37
1.7.1. Les mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques	38
1.7.1.1. Modifications de la cible	39
1.7.1.2. La résistance métabolique	40
1.7.1.3. La résistance comportementale	41
1.7.1.4. La résistance cuticulaire	41
1.8. Impact de la résistance sur les programmes de luttés contre <i>An. gambiae</i> s.l.....	42
1.9. Les stratégies de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides	43
2. MATERIEL ET METHODES	44
2.1. Description de la zone d'étude	45
2.2. Méthodologie	48

2.2.1. Dynamique des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i> et de la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga	48
2.2.1.1. Collecte des moustiques	48
2.2.1.2. Identification morphologique des espèces et traitement des moustiques.....	49
2.2.1.3. Paramètres estimés	50
2.2.1.4. Analyse des données	50
2.2.2. Dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides chez <i>Anopheles gambiae</i> s.l. dans l'Alibori et la Donga, nord du Bénin, Afrique de l'Ouest.....	51
2.2.2.1. Prospection des gîtes larvaires et élevage	51
2.2.2.2. Tests de sensibilité OMS.....	51
2.2.2.3. Identification des espèces au sein du complexe <i>An. gambiae</i> et caractérisation moléculaire de la résistance <i>Kdr</i> et <i>Ace-1</i>	52
2.2.2.4. Caractérisation biochimique de la résistance	53
2.2.2.5. Analyses des données.....	53
2.2.3. Impact entomologique de la pulvérisation intradomiciliaire.....	53
2.2.3.1. Mise en place des pulvérisations intradomiciliaires.....	53
2.2.3.2. Résultats des opérations de pulvérisation de 2017 et 2018	56
2.2.3.3. Contrôle de la qualité du traitement et évaluation de l'activité résiduelle de Actellic 300 CS	56
2.2.3.3.1. Tests en cône OMS sur des murs traités	57
2.2.3.4. Mesure de l'impact de la PID sur les indicateurs entomologiques du paludisme.....	58
2.2.3.5. Analyse des données	58
2.2.3.6. Synthèse des activités de terrain.....	58
3. RESULTATS	60
Première partie : Données de base	61
Chapitre 1. Dynamique des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l et de <i>Culex quinquefasciatus</i> , de la transmission du paludisme et contribution des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> dans la transmission en prélude à la pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori et la Donga	62
1.1. Présentation de l'étude	63

1.2. Dynamique des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i> en milieu rural et urbain dans l'Alibori et la Donga dans le nord du Bénin.	64
1.2.1. Contexte de l'étude.....	64
1.2.2. Objectifs de l'étude	64
1.2.3. Méthodologie	65
1.2.4. Résultats & et principaux points discutés	65
1.2.5. Conclusion.....	65
1.3. Données entomologiques de base sur la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga.	77
1.3.1. Contexte de l'étude.....	77
1.3.2. Objectifs de l'étude	77
1.3.3. Méthodologie	77
1.3.4. Résultats & et principaux points discutés	78
1.3.5. Conclusion.....	78
1.4. Comportement de gorgement et contribution de <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles gambiae</i> à la transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et la Donga.	93
1.4.1. Contexte de l'étude.....	93
1.4.2. Objectifs de l'étude	93
1.4.3. Méthodologie	93
1.4.4. Résultats & et principaux points discutés	94
1.4.5. Conclusion.....	94
Chapitre 2. Statut de résistance aux insecticides chez <i>Anopheles gambiae</i> s.l. dans l'Alibori et la Donga.	107
2.1. Présentation de l'étude	108
2.2. Statut de résistance aux insecticides chez <i>Anopheles gambiae</i> s.l. dans l'Alibori et la Donga.	108
2.2.1. Contexte de l'étude.....	109
2.2.2. Objectifs de l'étude	109
2.2.3. Méthodologie	109
2.2.4. Résultats & et principaux points discutés	109

2.2.5. Conclusion.....	110
Partie 2 : Données de mise en œuvre	122
Chapitre 3. Impact entomologique de la pulvérisation intradomiciliaire dans l’Alibori et la Donga, au nord du Bénin.	123
3.1. Présentation de l’étude	123
3.2. Efficacité de Actellic 300 CS en pulvérisation intradomiciliaire dans l’Alibori et la Donga...	125
3.2.1. Contexte de l’étude.....	125
3.2.2. Objectifs de l’étude	125
3.2.3. Méthodologie	125
3.2.4. Résultats & et principaux points discutés	126
3.2.5. Conclusion.....	126
4. DISCUSSION GENERALE	141
4.1. Abondance et distribution saisonnière de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. et de <i>Culex quinquefasciatus</i> dans l'Alibori et la Donga.....	142
4.2. Niveau et pic de la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga.....	143
4.3. Contribution des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> dans la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga.....	147
4.4. Dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides et caractérisation des mécanismes biochimiques et moléculaires dans l'Alibori et la Donga.....	150
4.5. Impact entomologique de Actellic 300 CS en pulvérisation intradomiciliaire dans l’Alibori et la Donga.	153
4.6. Défis affectant l'impact de la pulvérisation intradomiciliaire au Bénin.....	155
4.7. Les limites de l’étude	161
4.8. Stratégies complémentaires potentielles pour une lutte antivectorielle plus efficace dans l’avenir	161
5. Conclusions générales et perspectives	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (HORS ARTICLES).....	166
Annexes.....	204
Annexe 1	205
Annexe 2	227

Liste des figures

Figure 1 : Distribution mondiale du paludisme : pays et territoires avec des cas de paludisme autochtone en 2000 et leur statut en 2018. D'après l'OMS, 2019. (WHO, 2019).....	10
Figure 2: Cycle biologique des Anophèles (Carnevale <i>et al.</i> , 2009).	11
Figure 3 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels (Sinka <i>et al.</i> , 2012).	14
Figure 4 : Cycle de développement des <i>Plasmodium spp.</i> Source: (Nilsson <i>et al.</i> , 2015).....	20
Figure 5 : Système vectoriel : agent pathogène, vecteur, hôte et environnement. Source : (Fontenille, 2008).....	22
Figure 6 : Schéma de la capacité vectorielle.	24
Figure 7 : Evolution du nombre de pays déployant la PID pour la lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne de 1997 à 2017 (Tangena <i>et al.</i> , 2020).	33
Figure 8 : Les principales classes d'insecticides utilisés en PID par les programmes nationaux de 2010 à 2017. Source : World malaria report 2018 (WHO, 2018d).....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 9 : Mode d'action d'un insecticide sur un insecte sensible (a) et résistant (b). Source: (Lapied <i>et al.</i> , 2009).....	38
Figure 10 : Modes d'actions des principaux insecticides chimiques agissant au niveau du système nerveux (Pennetier <i>et al.</i> , 2008).	40
Figure 11 : Carte de la zone d'étude montrant les communes étudiées.	47
Figure 12 : Capture de nuit sur appât humain (A) et collecte de moustiques après aspersion de bombe aérosol non rémanent (B).	49
Figure 13: Récolte (A) et élevage des larves et pupe (B) d'anophèles.	51
Figure 14: Emballage de la formulation de pirimiphos méthyle utilisée (Actellic 300CS).....	55
Figure 15: Pulvérisateur à pression de type Goizper et les opérateurs en accoutrements.....	55
Figure 16: Un opérateur traitant un mur.	56

Figure 17: Test en cône sur les murs traités et mise en observation des moustiques pour une lecture après 24 heures.	58
Figure 18 : Membres de ménage dormant à l'intérieur (a) et à l'extérieur (b) des habitations sans protection MIILDs pendant la période chaude (Kandi, mai 2019).	160
Figure 19 : Membres de ménage dormant à l'extérieur (c) des habitations avec protection MIILDs pendant la période chaude (Kandi, mai 2019).....	160
Figure 20 : Vêtements suspendus où les moustiques se reposent en évitant les murs traités	160

Liste des abréviations

AChE : acétylcholinestérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

CNaVdp : Canal sodium voltage dépendant

CS : Suspension concentrée

CSP : Protéine circumsporozoïte

CREC : Centre de recherche entomologique de Cotonou

CTA : Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine

DDT : Dichlorodiphenyltrichloroethane

EC : Concentré émulsionnable

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GPIRM: Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GST: Glutathion-S-transférases

IEC : Information, éducation et communication

IS: Indice sporozoïtique

ITS: Internal Transcripser Spacer

KD: Knock-Down

LAL : Lutte anti-larvaire

LAV : Lutte antivectorielle

MII : Moustiquaires imprégnées d'insecticides

MIILD : Moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action

ODD: Objectifs du Développement Durable

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBO : Pyperonyl butoxide

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHN: Piqûre par home et par nuit

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

PID : Pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide

PMI : President's Malaria Initiative

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

RBM: Roll Back Malaria

TDR: Tests diagnostiques rapides

TIE : Taux d'inoculation entomologique

TII : Technique de l'Insecte Incompatible

TPI: Traitement Préventif Intermittent

TPIp : Traitement préventif intermittent pendant la grossesse

USAID: United States Agency for International Development

WHO: World Health Organization

WHOPES: World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme

WG: Granulés mouillables

WP : Poudre mouillable

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies à transmission vectorielle représentent plus de 17% de toutes les maladies infectieuses, et provoquent plus d'un million de décès chaque année (OMS, 2020). Certaines de ces maladies, à défaut d'être mortelles, entraînent de graves invalidités ou réduisent significativement l'espérance de vie des personnes porteuses. C'est le cas de la trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil (transmise par les mouches tsé-tsé : *Glossina spp.*), l'onchocercose ou cécité des rivières (transmise par les simulies : *Simulium spp.*), la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine (transmise par des triatomes : *Triatoma spp.*) et, la leishmaniose (transmise par des phlébotomes : *Phlebotomus spp.*), etc. Leur répartition est déterminée par une dynamique complexe mêlant facteurs environnementaux et sociaux. Les arthropodes qui transmettent ces maladies sont souvent des hématophages, qui, lors d'un repas de sang, ingèrent des micro-organismes pathogènes présents dans un hôte infecté (homme ou animal), pour les réinjecter dans un nouvel hôte à l'occasion de leur repas de sang suivant et appartiennent à différents ordres. Parmi ces arthropodes vecteurs, les moustiques (*Diptera* : *Culicidae*) constituent le plus important et redoutable groupe tant par leur abondance avec plus de 3000 espèces répertoriées (Rodhain & Perez, 1985), que par les maladies qu'ils véhiculent. Largement répandues dans les zones tropicales et subtropicales, les moustiques sont vecteurs des arboviroses telles que la fièvre jaune (*Aedes spp.*), la dengue hémorragique (*Aedes spp.*), le chikungunya (*Aedes spp.*), la maladie du West Nile (*Culex spp.*), l'encéphalite japonaise (*Culex spp.*), le virus de la Vallée du Rift ainsi que certaines filarioses (*Anopheles spp.*, *Culex spp.*) et le paludisme (*Anopheles spp.*) (Kettle, 1995; Gratz, 1999 ; Mullen & Durden 2002).

Le paludisme est la maladie à vecteur la plus meurtrière et, la parasitose la plus répandue dans le monde (WHO, 2019). Il est dû à un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre d'une femelle de moustique du genre *Anopheles*. Plus de 70 espèces d'anophèles, dont une trentaine en Afrique sub-saharienne, sont décrites comme vectrices de *Plasmodium* (Sinka *et al.*, 2012). Les cinq espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'homme sont : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* (Gilles, 1993; Antinori *et al.*, 2012).

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 228 millions de cas de paludisme et 405 000 décès ont été recensés dans le monde en 2018 (WHO, 2019). L'Afrique sub-saharienne compte pour une part importante et disproportionnée de la charge mondiale, avec 93% de cas et 94% de décès. Au Bénin, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 4 435 318 et le nombre de décès associé à 7 081 en 2018 (WHO, 2019). Dans ce pays, comme dans la plupart des pays endémiques, les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes constituent les couches les plus vulnérables aux crises, et sont donc plus susceptibles de développer un paludisme grave (WHO, 2004 ; Annuaire des statistiques sanitaires du Bénin, 2017).

L'intensité de la transmission du paludisme est hétérogène en Afrique en raison des différences notées dans la distribution des diverses espèces de moustiques vecteurs (*An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus*) impliquées et, de leurs capacités vectorielles. Ces espèces sont en effet, (i) génétiquement compatibles au développement du parasite, (ii) préfèrent prendre leurs repas sanguins sur homme (anthropophilie) et, enfin (iii) ont une durée de vie suffisante leur permettant de réaliser le cycle sporogonique (Mouchet *et al.*, 2004). Ce dernier point est à la base des stratégies de lutte anti-vectorielle visant à diminuer la longévité des vecteurs d'âge épidémiologiquement dangereux et de rompre le contact homme-vecteur.

Les efforts de lutte déployés au niveau mondial contre cette maladie ont entraîné une diminution du nombre de décès dus au paludisme. Ce nombre est passé de près de 585 000 en 2010, à 405 000 en 2018 (WHO, 2019). Ainsi, plusieurs pays africains ont enregistré une diminution du nombre de cas confirmés, d'hospitalisations et de décès dus au paludisme (WHO, 2019). Ces progrès importants enregistrés dans la réduction du paludisme sont principalement dus à la mise en œuvre de l'initiative "Roll Back Malaria" (RBM) qui s'est fixé comme objectif en 2005, la réduction d'au moins 50% du nombre de décès imputables au paludisme en 2010 et, de 75% à l'horizon 2015 (WHO, 2015a). Pour l'atteinte de ces objectifs, l'OMS avait préconisé de lutter à la fois contre le parasite et contre le vecteur. C'est ainsi que le Bénin, à l'instar de beaucoup d'autres pays africains, a mis en place un plan stratégique national de lutte contre le paludisme qui repose essentiellement 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 et iii) la lutte antivectorielle. Cette dernière repose principalement sur l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD) et la Pulvérisation Intradomiciliaire (PID) d'insecticide (Programme National de Lutte contre le Paludisme au Bénin, 2011). Selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), sur 663 millions de cas de paludisme évités en Afrique subsaharienne, entre 2001 et 2015, grâce aux interventions de lutte anti-paludique, 79 % l'ont été grâce aux MIILDs et à la PID (WHO, 2015a). Au Bénin, beaucoup d'efforts ont été déployés ces dernières années pour augmenter l'accessibilité des communautés aux moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action.

Malheureusement, des problèmes importants subsistent, mettant en danger l'atteinte des objectifs fixés par le RBM et l'efficacité dans le temps de ces outils de lutte. Au nombre de ces problèmes, figure la résistance des vecteurs aux insecticides qui constitue un handicap à l'utilisation des matériaux imprégnés.

Ces dernières années, l'aire de distribution et l'intensité de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoides ont considérablement augmenté dans presque tous les pays de l'Afrique subsaharienne (WHO, 2017). Dans ce contexte, la recherche de nouvelles classes d'insecticides efficaces sur les vecteurs résistants aux pyréthrinoides était devenue une nécessité. Une solution possible consiste à utiliser des insecticides déjà disponibles mais ayant des cibles différentes de celles des pyréthrinoides au sein des vecteurs. A l'heure actuelle, les insecticides non-pyréthrinoides pré-qualifiés par l'OMS pour les aspersions intradomiciliaires appartiennent globalement à trois différentes classes (carbamates, organophosphorés et néonicotinoïdes), les néonicotinoïdes ayant intégré la liste en 2017 (WHO, 2020).

Au Bénin, la PID à base d'un non-pyréthrinoides a été introduite en raison de l'émergence et de l'expansion de la résistance des anophèles vecteurs aux insecticides pyréthrinoides (Chandre *et al.*, 1999; Corbel *et al.*, 2007; Yadouleton *et al.*, 2009 ; Djogbénou *et al.*, 2011) qui constituent la seule famille d'insecticide homologuée par l'OMS pour l'imprégnation des MIILDs. Ainsi, de 2008 à 2010, la PID à base de bendiocarb a été mise en œuvre dans le département de l'Ouémé au sud du Bénin caractérisé par une longue période de transmission du paludisme. La stratégie a été par la suite transférée dans le département de l'Atacora au nord du Bénin où la période de transmission est plus courte, ce qui facilite sa couverture par un seul tour de pulvérisation. Ainsi, le bendiocarb y a été utilisé de 2011 à 2013, mais compte tenu de l'émergence de la résistance des vecteurs à ce produit et de sa faible rémanence (Aikpon *et al.*, 2013a), il a été remplacé respectivement par Actellic 50 EC puis Actellic 300 CS (Organophosphoré) entre 2014 et 2016. Globalement, la stratégie a connu un grand succès (réduction significative des indicateurs entomologiques clés de la transmission du paludisme) dans toutes les régions du Bénin où elle a été mise en œuvre (Akogbeto *et al.* 2011; Aikpon *et al.*, 2014 ; Akogbeto *et al.*, 2015). Les aspersions intradomiciliaires sont aussi déployées à grande échelle dans plusieurs autres pays d'Afrique et ont montré un certain degré d'efficacité dans le contrôle du paludisme, notamment en Afrique Australe : Swaziland, Botswana, Afrique du Sud, Zambie, Namibie, Swaziland, Zimbabwe et en Mozambique (Mabaso *et al.*, 2004), au Madagascar (Randriantsimaniry, 1995 ; Brutus *et al.*, 2001), en Guinée équatoriale (île de Bioko) (Kleinschmidt *et al.*, 2006 ; Sharp *et al.*, 2007 ; Overgaard *et al.*, 2012), en Ouganda (Kigozi *et al.*, 2012), au Kenya (Gimnig *et al.*, 2016) et en Tanzanie (Protopopoff *et al.*, 2015).

Après six années de campagne PID dans l'Atacora, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) de commun accord avec les différents acteurs impliqués dans la lutte contre le paludisme a décidé du retrait partiel de l'intervention de certaines communes du département et de son extension dans deux autres départements (Alibori et Donga). Cette décision entre non seulement dans le cadre de la mise en œuvre du plan national de gestion de la résistance aux

insecticides mais, elle offre également la possibilité à deux départements de forte prévalence palustre (Annuaire des statistiques sanitaires du Bénin, 2017) de bénéficier de cette intervention.

Au regard des leçons apprises, de grands défis restent à relever afin d'optimiser l'efficacité des outils de lutte antivectorielle au Bénin dans l'optique de l'atteinte des objectifs fixés par l'OMS parmi lesquels, l'élimination du paludisme à l'horizon 2030. Outre l'émergence et l'expansion de la résistance des anophèles vecteurs aux insecticides (Chandre *et al.*, 1999 ; Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouleton *et al.*, 2009 ; Djogbénou *et al.*, 2011 ; Djègbè *et al.*, 2011 ; Sovi *et al.*, 2014) et plus récemment au bendiocarb (Aïzoun *et al.*, 2013a ; Aïkpon *et al.*, 2013 ; Gnanguenon *et al.*, 2015) qui constituent déjà une menace sérieuse à l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle au Bénin (N'guessan *et al.*, 2007a), le manque de données de base suffisantes pour guider l'élaboration des politiques de lutte est une faiblesse dans la mise en œuvre des stratégies de lutte (Marsh, 2010). En effet, la densité et la distribution des anophèles vecteurs du paludisme varient en fonction de la région et de la période de l'année et, ces variations peuvent modifier le niveau de transmission du paludisme (Cox *et al.*, 1999 ; Kleinschmidt *et al.*, 2002 ; Munga *et al.*, 2009 ; Govoetchan *et al.*, 2014). De plus, plusieurs études ont montré que l'infection palustre est influencée par des facteurs environnementaux (température, précipitation et humidité relative) qui varient d'une région à une autre (Kazembe *et al.*, 2006). Malheureusement, certaines interventions de lutte antivectorielle sont mises en œuvre sans tenir compte des variations spatio-temporelles et du pic de transmission du paludisme et du niveau de résistance des vecteurs aux insecticides alors que ces facteurs conditionnent la bonne planification et le succès des interventions de lutte antivectorielle (Le Sueur *et al.*, 1997 ; Carter *et al.*, 2000 ; Killeen *et al.*, 2011). En prenant l'exemple de l'Ouémé en 2008, la mise en œuvre de la PID a été réalisée sur la base d'un seul tour de pulvérisation (Akogbéto *et al.*, 2011). Or, pour couvrir la période de transmission du paludisme dans la région, deux tours étaient nécessaires, la période de transmission du paludisme étant plus longue que ce qui était imaginée. Cette situation aurait pu être évitée si des données de base sur la transmission du paludisme dans la région étaient disponibles. De même, dans l'Atacora, c'est à la veille de la mise en œuvre de la PID qu'une brève étude de collecte de données de base entomologique a été initiée sur un mois, mais c'était insuffisant pour connaître le pic de la transmission du paludisme.

Au Bénin, le programme de pulvérisation intradomiciliaire a prévu en 2017, un traitement de toutes les maisons des départements de l'Alibori et de la Donga avec un insecticide de la famille des organophosphorés ou des carbamates. En prélude à la mise en œuvre de cette intervention, nous avons conduit une étude sur le profil entomologique du paludisme dans ces deux départements. Les résultats ont servi de données de base à la mise en place de la PID dans l'Alibori et la Donga. Les données collectées ont porté sur la dynamique de la population des principaux moustiques vecteurs,

les différentes espèces d'anophèles qui assurent la transmission du paludisme dans différentes zones, leur niveau de sensibilité aux insecticides, leur degré d'endophilie et d'endophagie et leur degré d'infectivité au *Plasmodium falciparum*. De plus, cette surveillance entomologique a permis de rechercher les insecticides candidats potentiels pour la PID. Ces données de base ont permis de proposer des pistes pour une gestion efficace de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides dans la zone d'étude. Les données de base obtenues ont été confrontées à celles enregistrées après la mise en œuvre de la PID afin d'évaluer l'évolution des indicateurs entomologiques.

C'est dans cette optique que s'inscrit la présente thèse intitulée « **Impact entomologique de la pulvérisation intradomiciliaire dans deux départements (Alibori et Donga) au Nord du Bénin, Afrique de l'Ouest** » qui vise à vérifier si les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus dans l'Ouémé au sud du Bénin (Padonou *et al.*, 2012 ; Ossè *et al.*, 2012) et dans l'Atacora (Aïkpon *et al.*, 2014).

Objectifs et hypothèses de l'étude

Objectif général

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier l'impact de la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide à effet rémanent à grande échelle sur les indicateurs entomologiques de transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et de la Donga.

Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques se déclinent en quatre parties:

- i) recueillir des données entomologiques de base sur le comportement de piquûre des principaux moustiques rencontrés en prélude à la campagne de PID dans les départements de l'Alibori et de la Donga (**Article 1, publié**) ;
- ii) évaluer le niveau de la transmission du paludisme en prélude à la campagne de PID dans les départements de l'Alibori et de la Donga (**Article 2, publié**) et, la contribution des espèces moléculaires du complexe *An. gambiae* (**Article 3, publié**);
- iii) caractériser la résistance des vecteurs aux insecticides en prélude à la campagne de PID dans les départements de l'Alibori et de la Donga (**Article 4, publié**) ;
- iv) évaluer l'impact de l'utilisation en PID de l'insecticide choisi sur la transmission du paludisme (**Article 5, publié**).

Hypothèses

Quatre hypothèses justifient ce travail :

- i) le comportement des moustiques dans l'Alibori et la Donga permet la mise en œuvre de la PID dans ces deux départements;
- ii) le niveau de transmission du paludisme et les espèces moléculaires du complexe *An. gambiae* impliquées varient dans les départements de l'Alibori et de la Donga ;
- iii) plusieurs mécanismes de résistance contribuent à la résistance de *An. gambiae* s.l. aux insecticides dans les deux départements ;
- iv) la PID est efficace sur les populations de *An. gambiae* s.l. dans les départements de l'Alibori et la Donga.

Approche rédactionnelle

La présente thèse est divisée en trois chapitres en dehors de l'introduction générale, des généralités, du matériel et méthodes, de la discussion générale, des conclusions et perspectives: le premier chapitre est constitué de trois articles publiés et les deux derniers chapitres constitués chacun d'un article publié. La chronologie des chapitres dans cette thèse est basée sur l'évolution des idées dans un esprit d'enchaînements progressifs pour aboutir à la conclusion générale.

Après l'introduction qui nous a permis de préciser le contexte du sujet, de fixer les objectifs à atteindre, d'émettre les hypothèses de base, nous avons rappelé, dans la première partie de la thèse, la situation actuelle du paludisme dans le monde, les particularités biologiques et écologiques des espèces vectrices majeures et des parasites responsables du paludisme en Afrique sub-saharienne. Ensuite, nous avons fait un état des lieux sur les efforts de lutte antipaludique et en particulier des méthodes de lutte antivectorielle utilisées contre les principaux anophèles vecteurs et les insecticides disponibles en santé publique. Nous avons enfin évoqué les différents types de mécanismes de résistance susceptibles de compromettre les programmes de lutte à base d'insecticide et, les stratégies de gestion de cette résistance. Nous avons brièvement fait cas du matériel et des différentes méthodologies utilisés pour obtenir les résultats présentés dans les chapitres 1, 2 et 3.

Le chapitre 1 présente les résultats de l'étude entomologique de base en prélude à la PID. Ce chapitre fournit des informations sur la dynamique et le comportement de piqûre des principaux moustiques rencontrés ainsi que sur le niveau de transmission du paludisme avant la mise en œuvre de la PID dans les deux régions cibles. Nous avons également évalué la distribution et la contribution des principales espèces jumelles du complexe *Anopheles gambiae* à la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga.

Dans le deuxième chapitre, nous avons étudié la résistance des vecteurs aux insecticides et les mécanismes impliqués. Cette étude visait l'identification d'un insecticide à utiliser en PID afin de mieux gérer la résistance des vecteurs aux pyréthrinoides dans les départements de l'Alibori et de la Donga.

Dans le chapitre 3, nous avons évalué l'efficacité de l'insecticide choisi pour la PID sur les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme.

Dans la dernière partie, les différents résultats obtenus ont été discutés. Il s'en est suivi une conclusion et des perspectives visant l'atteinte des Objectifs du Développement Durable (ODD), parmi lesquels l'arrêt de la morbidité et la mortalité dues au paludisme à l'horizon 2030.

Etant donné qu'il s'agit d'une thèse en français et que tous les articles insérés sont en anglais, nous avons fait précéder chaque article d'une petite synthèse en français comportant le contexte, les méthodes d'étude, les principaux résultats et la conclusion de chaque article.

1. GENERALITES

1.1. Situation actuelle du paludisme dans le monde

Près de la moitié de la population mondiale est encore exposée au risque de paludisme en 2018 (figure 1) (WHO, 2019). Le paludisme a été éliminé de la plupart des pays tempérés au cours des vingt dernières années pour se retrouver essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique (WHO, 2019). En considérant, la zone Africaine de l'OMS, seulement 2 pays ont été reconnus exempts du paludisme par l'OMS: Il s'agit de l'Île Maurice en 1973 et l'Algérie en 2019. Selon l'OMS, 228 millions cas de paludisme ont été enregistrés en 2018 dans le monde. L'Afrique est de loin, la région la plus touchée, supportant 93% (213 millions de cas) de la charge palustre mondiale. Elle est suivie par la région d'Asie du Sud-Est (3,4%) et la région de la Méditerranée orientale (2,1%) (figure 1). Toutefois, à l'échelle mondiale, l'incidence du paludisme a reculé entre 2010 et 2018, passant de 71 cas pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme à 57 pour 1 000, soit une diminution de 14% pendant cette période. Néanmoins, cette baisse a considérablement ralenti entre 2014 et 2018, l'incidence ayant diminué à 57 pour 1 000 en 2014 pour rester à un niveau similaire jusqu'en 2018. Mais à part la région d'Asie du Sud-Est où une baisse significative de l'incidence continue d'être observée, très peu de progrès ont été obtenus dans les autres régions de l'OMS après 2015. Seulement 31 pays dans lesquels le paludisme était endémique ont réduit l'incidence du paludisme de manière significative entre 2015 et 2018 et étaient donc en passe d'atteindre une baisse de l'incidence égale à au moins 40 % d'ici 2020. À moins d'un changement rapide, les objectifs de morbidité définis pour 2025 et 2030 dans la Stratégie technique de lutte contre le paludisme à l'horizon 2030 ne seront pas atteints.

En ce qui concerne la mortalité due au paludisme, elle a été estimée à 405 000 dans le monde en 2018. La grande majorité de ces décès (94%) ont été enregistrés dans la région Afrique de l'OMS et les enfants de moins de 5 ans étaient les plus vulnérables face au paludisme dans le monde (67%). Près de 85 % des décès dus au paludisme dans le monde en 2018 ont été concentrés dans 20 pays de la région Afrique de l'OMS et en Inde. Le Nigéria a représenté à lui seul près de 24 % de ces décès, suivi par la République démocratique du Congo (11 %), la Tanzanie (5 %), ainsi que l'Angola, le Mozambique et le Niger (4 % chacun). Par rapport à 2010, la mortalité liée au paludisme n'a diminué en 2018 que dans les régions Afrique et Asie du Sud-Est de l'OMS. La baisse la plus prononcée du nombre de décès dus au paludisme, en valeur absolue, a été observée dans la région Afrique de l'OMS, qui est passée de 533 000 décès en 2010 à 380 000 en 2018. Malgré ces progrès, la baisse de la mortalité liée au paludisme a ralenti depuis 2016 (WHO, 2019).

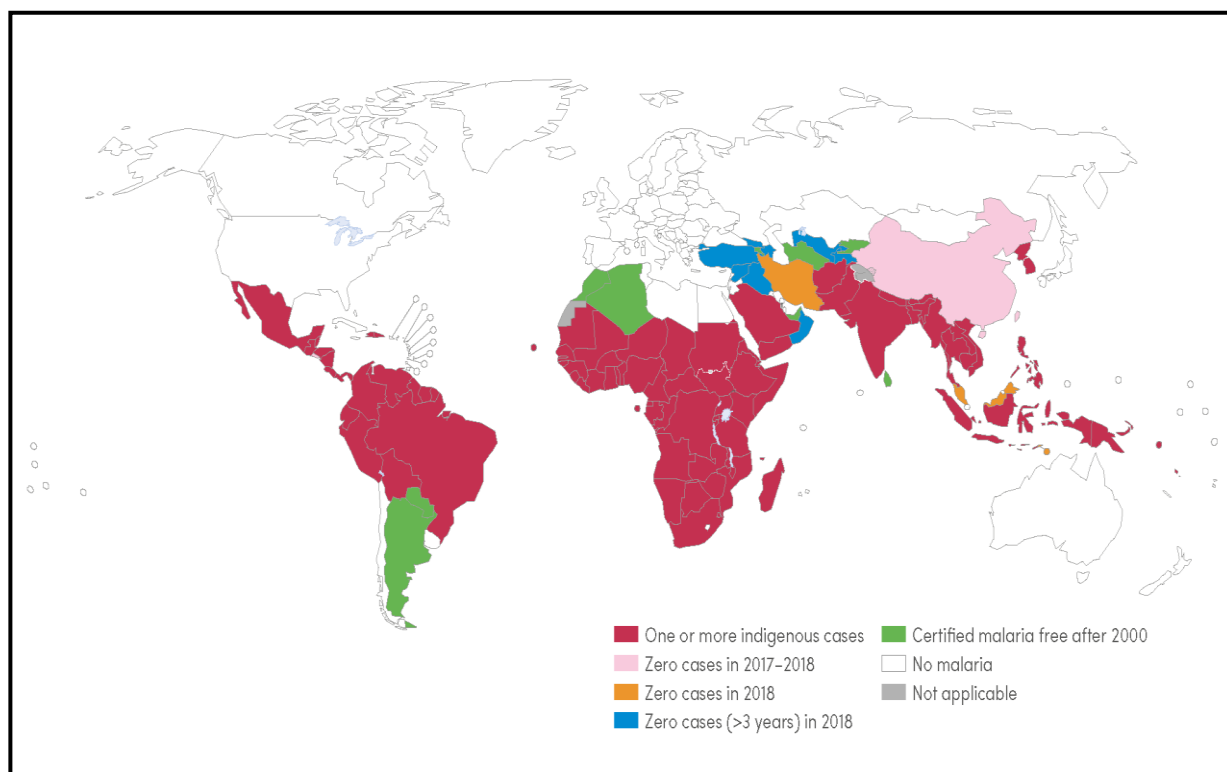


Figure 1 : Distribution mondiale du paludisme : pays et territoires avec des cas de paludisme autochtone en 2000 et leur statut en 2018. D’après l’OMS, 2019. (WHO, 2019)

Les pays qui n'ont enregistré aucun cas de paludisme autochtone au cours des trois dernières années consécutives sont considérés comme exempts du paludisme. Tous les pays de la région européenne de l'OMS ont signalé zéro cas de paludisme autochtone en 2017 et 2018 ; En 2018, la Chine et le Salvador n'ont signalé aucun de paludisme autochtone pour la deuxième année consécutive et l'Iran, la Malaisie et le Timor-Leste ont déclaré zéro cas autochtone pour la première fois. Source : Base de données de l'OMS.

1. 2. Les vecteurs responsables du paludisme

1.2.1. Systématique des anophèles vecteurs

Les moustiques ou Culicidae sont des diptères qui comptent plus de 3500 espèces répartie majoritairement au sein des trois genres principaux *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (Cardé & Resh, 2003). Les anophèles appartiennent à l'embranchement des Arthropoda ; à la classe des Hexapoda ; à la sous-classe des Pterygota ; à l'ordre de Diptera ; au sous-ordre des Nematocera ; à la famille des Culicidae, à la sous-famille des Anophelinae et au genre *Anopheles* (Knight *et al.*, 1977). La sous-famille des Anophelinae comporte trois genres (*Anopheles*, *Bironella*, *Chagasia*) dont un seul a une importance médicale, le genre *Anopheles* qui regroupe les principaux vecteurs du paludisme.

1.2.2. Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes dont le cycle de vie comporte une métamorphose complète, ce sont des holométaboles. Ils ont une activité rythmée, nycthémerale⁷ et saisonnière. Leur développement

est caractérisé par la succession de deux phases : une phase aquatique (œuf, larve et nymphe) et une phase aérienne (adulte). Leur cycle de développement est illustré dans la figure 2.

✚ Phase aquatique ou pré-imaginale

Les œufs d'anophèles pondus séparément sont munis de flotteurs qui leur permettent de rester à la surface de l'eau durant l'embryogénèse. Sous des conditions favorables de température, l'incubation des œufs dure deux à trois jours. Après éclosion, les œufs donnent naissance aux larves de stade I (L1) mesurant environ 1 mm qui vont évoluer par des mues successives pour donner des larves de stades II (L2), III (L3) et IV (L4) mesurant de 5 mm à 1 cm. Comme tous les autres culicidés, les larves d'anophèles se nourrissent en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. Au terme de leur développement, elles subissent une mue particulière, la nymphose, pour donner des nymphes mobiles qui ne se nourrissent pas. De profonds remaniements morphologiques vont se produire au sein de la nymphe et, de cette dernière, va émerger un adulte mâle ou femelle. Bien qu'étant des stades aquatiques, les larves et nymphes ont une respiration aérienne. A la température de 25 °C, la durée de la phase aquatique est d'une dizaine de jours pour *An. gambiae* s.l. et d'une trentaine de jours pour *An. funestus* (Coetzee & Fontenille, 2004) ; elle s'allonge quand la température diminue et raccourcit quand cette dernière augmente (Robert, 2001).

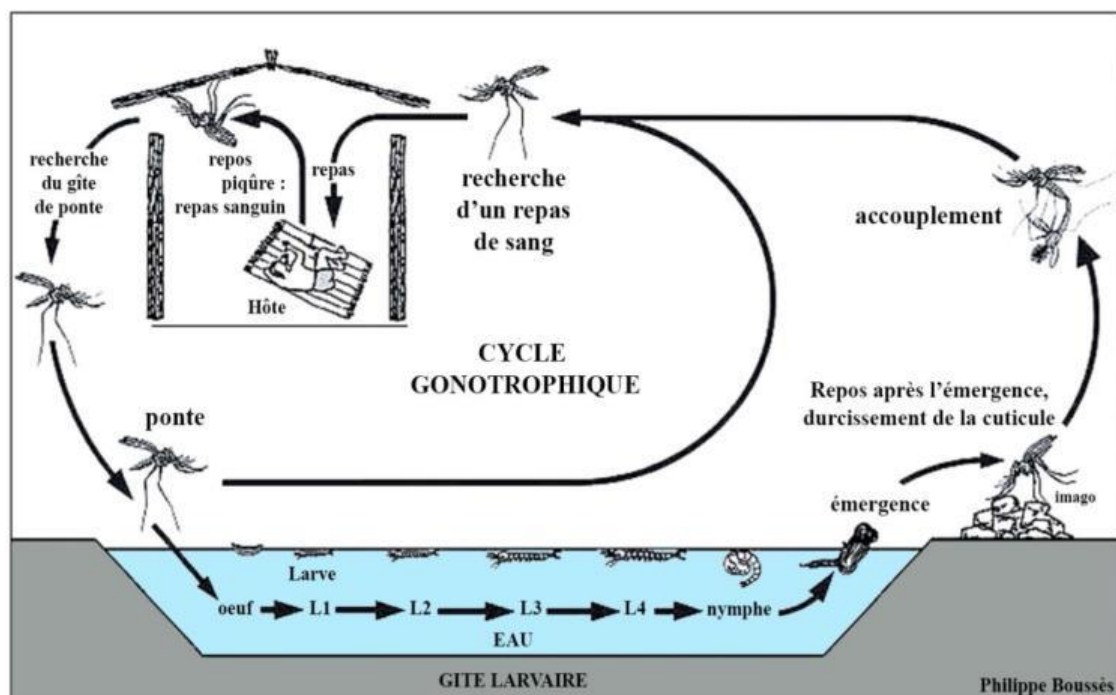


Figure 2: Cycle biologique des anophèles (Carnevale *et al.*, 2009).

✚ Phase aérienne : émergence, accouplement et cycle gonotrophique

L'émergence a lieu à la surface du plan d'eau et dure quelques minutes. Sous l'effet de la pression interne, la cuticule nymphale éclate sur une ligne médiodorsale du céphalothorax, l'adulte se dégage rapidement de l'exuvie et s'envole dès que ses ailes ont séché. Après l'émergence, les femelles ont besoin de douze à vingt-quatre heures et les mâles de soixante-douze heures pour que leur cuticule durcisse et que les organes de reproduction mâles se mettent en place. Cette maturation se fait par une rotation de 180 degrés de l'appareil génital et de l'extrémité abdominale (Clements, 1992).

Avant l'accouplement, les mâles peuvent former des essaims – de quelques dizaines à plusieurs milliers d'individus – observables à quelques mètres du sol et généralement au crépuscule (Diabate *et al.*, 2006 ; Manoukis *et al.*, 2009). La copulation, de courte durée (quelques secondes), peut se dérouler entièrement en vol ou bien commencer en vol et se poursuivre lorsque le couple (la femelle accrochée par les clasps du mâle) est au sol (Charlwood *et al.*, 2002 ; Carnevale et Robert, 2009). En règle générale, les femelles d'anophèles ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie (Clements, 1999). Les spermatozoïdes sont stockés dans un réceptacle, la spermathèque, d'où ils sortent pour féconder les ovocytes au moment de la ponte. Ils conservent leur pouvoir fécondant durant toute la vie du moustique. Mâles et femelles prennent ensuite du jus sucré, plus souvent le nectar des plantes, afin de satisfaire leurs besoins énergétiques pour le vol et maintenir les processus métaboliques.

Pour assurer la survie de l'espèce, les femelles ont besoin de prendre du sang car les protéines du sang sont une source d'acides aminés nécessaires au développement des œufs. De ce fait, seule la femelle⁸ est hématophage. La succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez la femelle entre deux repas de sang successifs constitue le cycle gonotrophique (Carnevale *et al.*, 2009 ; Robert, 2001 ; Clements, 1992). Il est d'une importance capitale en épidémiologie car il conditionne la fréquence du contact hôte-vecteur pendant lequel se déroule la transmission des *Plasmodium spp.* Il est composé de trois phases: recherche de l'hôte vertébré et prise du repas de sang ; digestion du sang et maturation ovarienne ; et pour finir recherche du lieu de ponte et ponte. La durée du cycle gonotrophique varie entre deux et trois jours pour les femelles pares (c'est-à-dire ayant effectué au moins une ponte) et jusqu'à cinq jours pour les femelles nullipares (n'ayant pas encore effectué une ponte). Deux à trois jours après la prise du repas de sang, l'anophèle femelle pond des œufs sur l'eau. La fécondité varie selon les espèces et d'autres facteurs comme l'âge et la saison. Pour *An. gambiae* s.l., le nombre moyen d'œufs par ponte est de l'ordre de 150 et la fécondité diminue avec l'âge (Clements, 1992). De nombreuses espèces prennent d'abord un repas de sang avant de s'accoupler (Charlwood *et al.*, 2003).

1.2.3. Les vecteurs du paludisme en Afrique

1.2.3.1. Les anophèles et leur rôle dans la transmission

Le paludisme (palus = marais) ou malaria est une parasitose due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* et transmise à l'homme par exclusivement des moustiques du genre *Anopheles* (Chabasse, 2002). Sur 537 espèces d'anophèles répandues dans le monde, une cinquantaine sont des vecteurs de *Plasmodium sp.* dont une vingtaine sont à l'origine de la majorité des cas de paludisme (Harbach, 2013). Les autres espèces ne participent pas à la transmission parce qu'elles ne sont pas "compétentes" pour permettre le développement du parasite (Cohuet *et al.*, 2010). Les anophèles ont également une importance en santé humaine par la transmission de la filaire de Bancroft, *Wuchereria bancrofti* et d'arbovirus.

En Afrique Subsaharienne, les vecteurs du paludisme appartiennent à une douzaine d'espèces réparties dans différentes aires géographiques (Sinka *et al.*, 2012) (figure 3). Une dizaine d'espèces est directement impliquée dans la transmission du paludisme mais seuls deux grands complexes d'espèces assurent la presque totalité de cette transmission : *Anopheles gambiae sensu lato* Giles, 1902 (ci-après *Anopheles gambiae s.l.*) et le groupe *Anopheles funestus* Giles, 1900.

Les anophèles du complexe *Anopheles gambiae* sont probablement les plus répandus et sont ceux qui assurent en grande partie la transmission du paludisme en Afrique. La taxonomie permet de repartir ce complexe en huit espèces morphologiquement semblables (Gillies & De Meillon, 1968 ; Coetzee *et al.*, 2013). Parmi celles - ci, six sont inféodées aux eaux douces (*Anopheles gambiae*, *An. coluzzii*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles quadriannulatus A*, *Anopheles quadriannulatus B* et *Anopheles bwambae*) et deux autres aux eaux saumâtres (*Anopheles melas* et *Anopheles merus*) (White, 1974a; Gillies & Coetzee, 1987 ; Hunt *et al.*, 1998 ; Coetzee *et al.*, 2000). Les principales espèces vectrices du complexe *An. gambiae* retrouvées en Afrique sont *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis*.

Le groupe *An. funestus* quant à lui comporte six espèces jumelles : *An. vaneedeni*, *An. rivulorum*, *An. parensis*, *An. leesoni*, *An. rivulorum-like* et *An. funestus s.s.* Seule cette dernière est anthropophage et ayant une très large diffusion en Afrique, joue un rôle dans la transmission du paludisme. Considéré comme l'un des principaux vecteurs à la suite de *Anopheles gambiae s.s* et *Anopheles arabiensis*, *An. funestus* est aussi très endophile. Cette forte endophilie lui permet de s'adapter aux régions d'altitude.

Trois autres vecteurs assurent, avec une fréquence relativement modérée, la transmission du paludisme en Afrique tropicale. Il s'agit de *Anopheles nili* géographiquement localisé en Afrique de l'Ouest et Centrale, *Anopheles pharoensis* qui est surtout répandu dans les zones sèches d'Afrique orientale mais aussi de l'Ouest et *Anopheles moucheti* que l'on retrouve dans les zones

de forêt d'Afrique Centrale (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002 ; Fontenille *et al.*, 2005 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006). Par ailleurs, il existe aussi certaines espèces dites vecteurs secondaires qui assurent localement la transmission du paludisme aux côtés des vecteurs majeurs surtout sur le littoral et en milieu insulaire : *An. melas* sur les côtes lagunaires d'Afrique de l'Ouest, *An. merus* et *An. mascarensis* à Madagascar (Fontenille & Campbell, 1992 ; Pock Tsy *et al.*, 2003). Les vecteurs secondaires assurent moins de 5% de la transmission du paludisme (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-à-vis de l'homme (facteurs extrinsèques). Ces facteurs, avec des facteurs intrinsèques, comme la compétence vectorielle, interviennent pour minimiser leur rôle vecteur (Billingsley *et al.*, 2006).

Cependant, la présence de ces différences espèces dans une localité est influencée par plusieurs facteurs environnementaux dont la température, l'humidité, la nature des sols, le régime des pluies, la salinité de l'eau, etc. (Wiebe *et al.*, 2017) mais également par des facteurs anthropiques (Kamdem *et al.*, 2012). Des études récentes sur le comportement trophique et de repos et sur des analyses cytogénétiques ont permis de caractériser sept (8) espèces jumelles dans le complexe *An. gambiae* (Wiebe *et al.*, 2017).

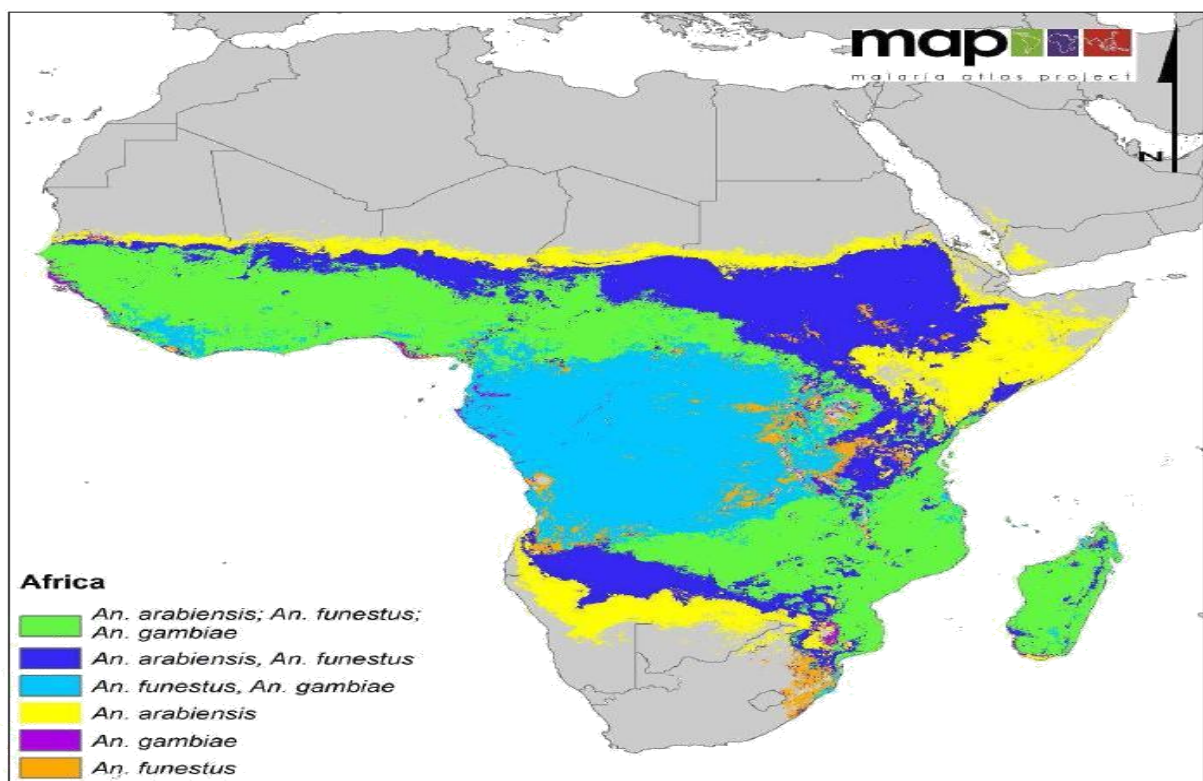


Figure 3 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels (Sinka *et al.*, 2012).

1.2.3.1.1. Le complexe *Anopheles gambiae*

Considéré à l'origine comme une seule espèce, le complexe *Anopheles gambiae* comptait sept espèces (*An. gambiae* s.s. (Giles, 1902), *An. arabiensis* (Patton, 1905), *An. melas* (Theobald, 1903), *An. merus* (Donitz, 1902), *An. bwambae* (White, 1985), *An. quadriannulatus* (Theobald, 1911), *An. amharicus* (Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013) (Coetzee *et al.*, 2013). Des sept espèces du complexe, *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* sont les vecteurs les plus importants. Elles sont seules globalement responsables de 90% de la transmission du paludisme dans la zone intertropicale africaine (Robert & Carnevale, 1984).

La notion de complexe d'espèces a été initialement basée sur des critères écologiques des vecteurs au stade larvaire. Il a fallu attendre le XX^{ème} siècle pour que l'existence du complexe *An. gambiae* soit démontrée par des croisements de référence réalisés entre écotypes (Davidson, 1964). Ainsi, sept « unités de croisements » ont été mises en évidence sur la base de la production de mâles F1 stériles, et ont été considérées comme des espèces au sein du complexe *An. gambiae* (White, 1974b; Hunt *et al.*, 1998). Les études ultérieures ont permis de distinguer et d'identifier les espèces du complexe en se basant sur des critères cytogénétiques (Coluzzi *et al.*, 1979). D'après ces critères cytogénétiques, *An. gambiae* s.s a été scindé en cinq formes chromosomiques « Bamako », « Bissau », « Forêt », « Mopti » et « Savane ». (Coluzzi *et al.*, 1985). Depuis, des techniques moléculaires ont été développées pour identifier les formes Mopti » et « Savane » ou « Bamako » par RFLP- PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR) de l'IGS (Favia *et al.*, 1997) ou par PCR de l'ITS (Internal Transcripter Spacer) (Favia *et al.*, 2001). Les formes chromosomiques sont de véritables marqueurs écologiques. En 2013, *An. gambiae* s.s. (Giles, 1902) a été scindée en deux espèces qui correspondent aux classifications antérieures des deux formes moléculaires M et S, la forme M et la forme S correspondant respectivement à *An. coluzzii* (Coetzee *et al.*, 2013) et *An. gambiae* ramenant actuellement le nombre d'espèces jumelles du complexe *An. gambiae* à huit (Coetzee *et al.*, 2013). Le complexe *An. gambiae* joue un rôle majeur dans la transmission des *Plasmodium spp.* en Afrique sub-saharienne, en particulier *An. gambiae*, *An. coluzzii*, et *An. arabiensis* (Wiebe *et al.*, 2017).

1.2.3.1.2. Distribution et comportement trophique de *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis*

Les aires de distribution de *An. gambiae* et de *An. coluzzii* se chevauchent en Afrique de l'Ouest et Centrale. Il convient de noter que les niveaux d'hybridation entre ces deux espèces varient énormément en fonction des zones géographiques. Certains pays n'ont rapporté aucun cas d'hybridation alors que d'autres ont observé des fréquences peu voire très élevées (Wondji *et al.*,

2005; Yawson *et al.*, 2007; Nwakanma *et al.*, 2013). *An. gambiae* se retrouve, toutefois en allopatrie en Afrique de l'Est mais une étude a observé la présence de *An. coluzzii* au Zimbabwe (Masendu *et al.*, 2004). Les larves de *An. gambiae* se retrouvent dans des gîtes larvaires temporaires avec peu de prédateurs. *An. coluzzii*, par contre, est plus adapté aux gîtes larvaires permanents ou semi-permanents dans lesquels les prédateurs sont abondants (Diabaté *et al.*, 2005; Gimonneau *et al.*, 2012).

An. arabiensis est présent dans toute la zone afrotropicale excepté les zones de forêts. Comparativement à *An. gambiae* s.s. ou *An. funestus* s.s., il s'adapte mieux aux environnements plus secs, ce qui explique sa distribution qui s'étend jusqu'au Nord dans le Sahel, à l'Est de l'Ethiopie, le Sud-Ouest de la péninsule arabique, le Kenya et la Somalie et le Sud dans les environnements désertiques et steppiques de la Namibie et du Botswana en Afrique australe (Wiebe *et al.*, 2017). Il est capable de se développer dans des zones totalement sauvages, adoptant alors un comportement exclusivement zoophile (Duchemin *et al.*, 2001). En général, *An. gambiae* et de *An. coluzzii*, à cause de leur anthropophilie préférentielle, ont développé une tendance forte pour l'endophagie et endophilie, tandis que le plus zoophile *An. arabiensis* a une tendance plus exophage et exophile.

1.2.3.1.3. Le groupe *An. funestus*

Le groupe *An. funestus* est réparti en 3 sous-groupes (Funestus, Rivulorum et Minimus) et est composé de 10 espèces : *An. funestus* s.s., *An. aruni*, *An. parensis*, *An. vaneedeni*, *An. confusus*, *An. rivulorum*, *An. lesoni*, *An. brucei*, *An. fuscivenosus* et *An. funestus-like* (Spillings *et al.*, 2009). Il existe de grandes différences entre les membres du groupe en ce qui concerne leur biologie, leur comportement et leur capacité vectorielle. Seul *An. funestus* s.s. est un vecteur majeur de *Plasmodium spp.*; les autres espèces du groupe jouent un rôle mineur ou ne sont pas vectrices (Choi *et al.*, 2010).

Deux formes chromosomiques de *An. funestus* s.s. (Kiribina et Folonzo) ont été observées au Burkina-Faso et au Sénégal correspondant à des comportements de piqûres et de repos différents (Costantini *et al.*, 1999 ; Dia *et al.*, 2000). La forme Kiribina serait plus abondante dans les zones rizicoles alors que la forme Folonzo serait plus présente dans les zones comportant des retenues d'eau avec une végétation aquatique naturelle. Des études plus récentes sur des populations de *An. funestus* s.s. de 12 pays ont permis d'identifier 3 formes moléculaires : M, W et MW. La forme M est retrouvée essentiellement en Afrique de l'Est, la forme W en Afrique de l'Ouest et centrale et MW au Sud de l'Afrique (Garros *et al.*, 2004). Toutefois, ces 3 formes ont été toutes retrouvées dans des populations d'*An. funestus* s.s. de Malawi. Au moins deux formes ont également été

retrouvées au sein d'une même population collectée dans d'autres pays (Koekemoer *et al.*, 2006). *An. funestus* s.s. est répandu dans toute l'Afrique sub-saharienne, se retrouvant plus dans les savanes ouvertes que dans les zones boisées. Son aire de distribution chevauche celles de *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis*, faisant des quatre espèces les principaux vecteurs de *Plasmodium spp.* sur le continent africain (Wiebe *et al.*, 2017).

1.2.3.1.4. Le complexe *An. nili*

Le complexe *An. nili* est un vecteur secondaire de *Plasmodium spp.* Il est présent dans les zones forestières et de savane humide d'Afrique de l'Ouest, de l'Est et centrale (Fontenille & Simard, 2004). Le complexe *An. nili* comprend 4 espèces : *An. nili* s.s., *An. somalicus*, *An. carnevalei* et *An. ovengensis* (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006). A part *An. somalicus* qui est zoophile et n'a jamais été rapporté comme vecteur de *Plasmodium spp.*, les trois autres espèces peuvent transmettre le parasite. Les espèces du complexe *An. nili* sont restées peu étudiées. *An. nili* s.s. a une importante distribution géographique, se retrouvant surtout en Afrique de l'Ouest, centrale et de l'Est. Les populations forestières sont en général endophages alors que celles présentes dans les savanes sont plus exophiles et exophages (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006). Les larves de *An. nili* s.s. se développent le long des cours d'eau à débit rapide. Une étude récente a montré l'implication de *Anopheles nili* dans la transmission de *Plasmodium falciparum* à Kérou, au Nord Bénin (Ossè *et al.*, 2019).

1.3. Espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme

Le paludisme est l'une des plus importantes parasitoses humaines et constitue jusqu'à présent un problème majeur de santé publique. Il est causé par un protozoaire du genre *Plasmodium* découvert par le parasitologiste Laveran en 1880 et se transmet de l'homme à homme par une piqûre infectante de moustique du genre *Anopheles*. Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium* qui infectent des espèces animales variées. Seules quatre espèces parasitaires sont responsables des infections plasmodiales humaines : *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium malariae* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890) et également, une cinquième espèce qui touche principalement les macaques à queue longue, *Plasmodium knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1932), capable d'infecter l'homme (Singh *et al.*, 2004). A l'exception de *P. falciparum* qui est membre du sous-genre *Laverani*, les quatre autres espèces appartiennent au sous-genre *Plasmodium*. Les deux espèces plasmodiales les plus dangereuses sont *P. falciparum* et *P. vivax*. *Plasmodium vivax* infecte plus de personnes dans le monde mais est moins grave que *P. falciparum* qui est la plus répandue en Afrique. *Plasmodium falciparum* est le parasite du paludisme le plus prévalent dans la région Afrique de l'OMS. En 2018, il a été à l'origine de

99,7 % des cas de paludisme estimés, tout comme dans les régions Asie du Sud-Est (50 %), Méditerranée orientale (71 %) et Pacifique occidental (65 %) (WHO, 2019). Au niveau mondial, 53 % des cas de paludisme à *P. vivax* sont enregistrés dans la région Asie du Sud-Est de l’OMS, avec une majorité des cas en Inde (47 %). *Plasmodium vivax* prédomine dans la région Amériques de l’OMS, représentant 75 % des cas de paludisme. Les trois autres espèces (*Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*) sont moins répandues et ne causent pas d’accès graves (Collins & Jeffery, 2007 ; Mueller *et al.*, 2007). Toutes les espèces plasmodiales sont présentes en Afrique sauf *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium knowlesi*, une espèce qui ressemble à *Plasmodium malariae* au microscope, est habituellement inféodé aux singes macaques de l’Asie du Sud-Est. L’infection à *Plasmodium knowlesi* peut causer des pathologies cérébrales graves (Cox-Singh *et al.*, 2010).

1.3.1. Cycle de développement du *Plasmodium*

Au cours de la piqure, l’anophèle femelle infecté injecte les parasites sous forme de sporozoïtes fusiformes dans la peau de l’homme. Via la circulation sanguine, les sporozoïtes rejoignent rapidement (30 minutes en moyenne) le foie, pénètrent dans les hépatocytes où ils se multiplient et se transforment en schizontes hépatiques. Après une durée d’incubation de 6 à 15 jours en fonction des espèces, le cytoplasme des hépatocytes est envahi par une masse contenant des milliers de mérozoïtes. Les schizontes éclatent alors et libèrent les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ces derniers infectent ensuite les hématies dans lesquelles ils vont se multiplier pour produire de nouveaux mérozoïtes qui sont libérés dans la circulation sanguine pour infecter d’autres hématies : c’est la schizogonie érythrocytaire. Le parasite prend trois formes distinctes successives au cours de son cycle de développement érythrocytaire qui dure 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* et 72 heures pour *P. malariae*. La phase hépatique ou pré-érythrocytaire est cliniquement asymptomatique et dure de 7 à 12 jours pour *P. falciparum*. La phase sanguine, quant à elle, déclenche une crise de paludisme. Pour certaines espèces de *Plasmodium* telles que *P. vivax* et *P. ovale*, des sporozoïtes peuvent rester quiescents sous forme d’hypnozoïtes dans le foie jusqu’à plusieurs années avant de réaliser une schizogonie. Les hypnozoïtes sont responsables des accès palustres survenant plusieurs années après l’infection. Après plusieurs cycles schizogoniques érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes sexués. Ceci marque le début de la phase sexuée des *Plasmodium spp.*

Au cours d’un repas de sang, l’anophèle femelle ingère les gamétocytes. Le macro-gamétocyte femelle se transforme rapidement en macro-gamète femelle alors que les micro-gamétocytes mâles subissent trois cycles successifs conduisant à la formation de huit noyaux,

chacun associé à un flagelle. Ces derniers émergent à la surface du corps du gamétocyte pour former les microgamètes, c'est l'exflagellation. Les membranes plasmiques suivies des noyaux des gamètes mâle et femelle fusionnent ensuite, c'est la fécondation qui conduit à la formation d'un œuf diploïde. L'œuf évolue en un ookinète mobile qui migre dans les parois de l'estomac de l'anophèle où il s'y enkyste sous la forme d'un oocyste. Après maturation, les oocystes libèrent les sporozoïtes qui migrent via l'hémolymph jusqu'aux glandes salivaires du moustique. La durée de la maturation dépend de la température et varie de 4 à 21 jours pour *P. falciparum*. L'inoculation de sporozoïtes dans un nouvel hôte humain boucle le cycle de développement des *Plasmodium* spp. (figure 4).

En matière de transmission vectorielle, deux notions sont fondamentales : la compétence vectorielle et la capacité vectorielle. La compétence vectorielle désigne la faculté du vecteur à s'infecter après ingestion du repas de sang infecté, puis à assurer le développement du pathogène et enfin à transmettre le pathogène au vertébré par une piqûre (Dye, 1992 ; Lord et *al.*, 1996). En d'autres termes, la compétence vectorielle mesure le niveau de coadaptation pathogène / vecteur invertébré et dépend essentiellement de facteurs génétiques. La notion de capacité vectorielle peut aussi être abordée en considérant que si un anophèle prend son repas de sang sur un homme porteur de gamétocytes (stade sanguin du parasite infectant pour le moustique), et si ce moustique renouvelle habituellement un repas de sang toutes les trois nuits (soit un cycle gonotrophique de trois jours), puisque le développement sporogonique du *Plasmodium* (incubation extrinsèque) dure 11 jours (au moins à 27°C), alors le moustique ne pourra héberger des sporozoïtes (stade du parasite infectant pour l'homme) dans ses glandes salivaires, et donc les transmettre, qu'à partir de son 6^{ème} repas sanguin, lui-même étant alors âgé de 17 jours (MacDonald, 1957). La survie de ce moustique jusqu'à son 17^{ème} jour est indispensable pour la transmission à l'homme. Il en résulte qu'une grande longévité des vecteurs potentiels est cruciale pour le système vectoriel. La capacité vectorielle exprime donc le potentiel de transmission d'une population d'un vecteur de *plasmodium*. Elle dépend à la fois des facteurs liés au vecteur, à l'agent infectieux et à l'environnement (densité de population du vecteur, fréquence du contact vecteur - hôte vertébré, survie du vecteur, et durée du développement extrinsèque). Elle constitue donc un des indicateurs du potentiel de transmission de la maladie (même en absence de tout agent de la maladie). Cette approche explique pourquoi la transmission du paludisme humain en Afrique est très supérieure à celle observée dans le reste du monde. Les vecteurs africains qui en sont responsables sont les plus efficaces. On observe que leur longévité est très importante de même que leur anthropophilie. Leur cycle gonotrophique est court avec une densité élevée. On note en général que la capacité vectorielle est très élevée.

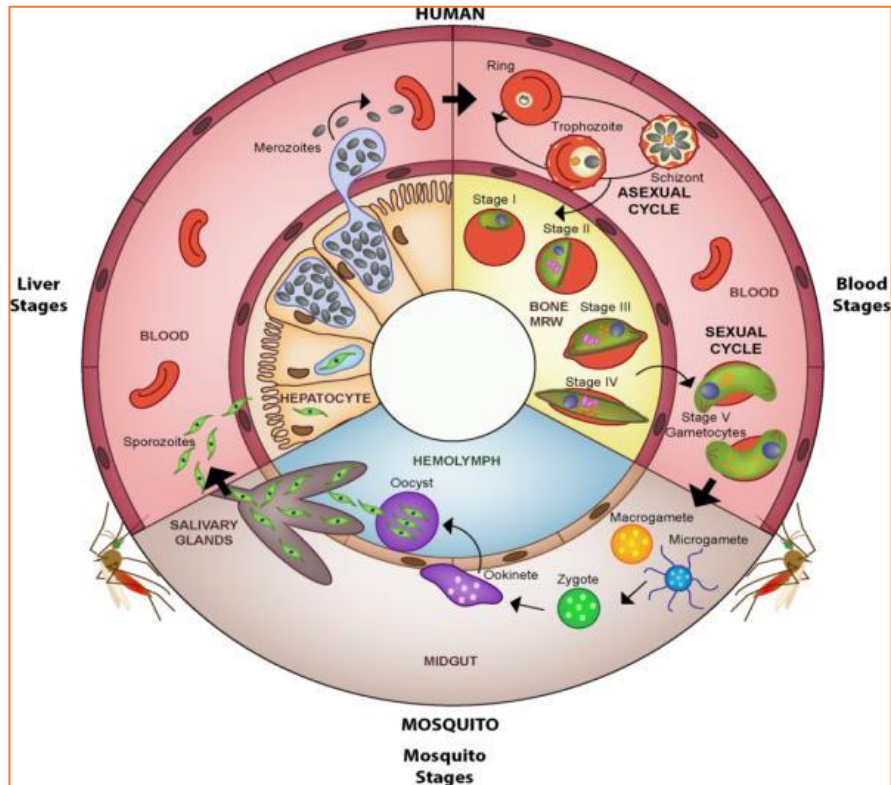


Figure 4 : Cycle de développement des *Plasmodium* spp. Source: (Nilsson *et al.*, 2015)

1.3.2. Faciès épidémiologique du paludisme

La répartition du paludisme dans le monde dépend en partie des caractéristiques intrinsèques du vecteur (compétence vectorielle) et de sa capacité vectorielle. Dans le monde, on distingue des zones non impaludées sans anophèles (continent antarctique, Groenland, Islande, Polynésie centrale et orientale), des zones non impaludées avec anophèles (Anophélisme sans paludisme) et des zones d'endémie palustre. L'anophélisme sans paludisme (Europe et Amérique du nord) regroupe des zones avec des anophèles non-vecteurs et des zones avec des anophèles anciennement vecteurs de souches plasmodiales qui ont disparu au cours des siècles ou qui ont été éradiquées au cours du programme mondial d'éradication du paludisme (1960–1970). Dans ces zones, subsistent des anophèles qui ont assuré au cours des siècles la transmission des différentes espèces de plasmodium et dont la capacité à transmettre des souches de même espèce, originaires d'autres continents, ne doit pas être négligée.

Dans les zones d'endémie palustre (zones intertropicales), différentes tentatives de classification ont été proposées. Cette classification était basée sur des indices cliniques ou parasitologiques et ne prenaient pas en compte la composante vectorielle ni l'apparition d'une immunité de prémunition et les variations de ces indices n'avaient pas les mêmes significations suivant les régions où sévissent les plasmodies. Ce n'est qu'en 1984, Carnevale et collaborateurs

ont proposé le concept de faciès épidémiologique pour l'Afrique de l'Ouest, concept étendu ensuite à toute l'Afrique et généralisé en 1992 (Mouchet *et al.*, 1993 ; Carnevale *et al.*, 1984). La classification épidémiologique est dorénavant locorégionale.

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

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

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

Dans les conditions où la transmission est très basse (moins une piqûre infectante par personne et par an) ou interrompue pendant plusieurs années, la prémunition ne peut s'établir durablement et le paludisme peut se manifester sur le mode épidémique. La morbidité et la mortalité concernent alors indistinctement toutes les classes d'âge de la population. C'est le « paludisme instable » avec un indice de stabilité inférieur à 0,5.

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

transmission (jusqu'à l'éradication dans certaines îles tropicales ou la réintroduction sur le mode épidémique après arrêt du contrôle) (Mouchet *et al.*, 1993).

1.4. Mesure de la transmission

La transmission du paludisme résulte de la rencontre et de la compatibilité du *Plasmodium* avec ses deux partenaires, le vecteur anophèle et l'hôte vertébré, l'homme. L'ensemble qui implique l'agent pathogène, l'arthropode vecteur et l'hôte vertébré, dans un environnement donné, constitue ce qu'on appelle le système vectoriel (Rodhain, 2015) illustré dans la figure 5. Le passage à une phase effective de transmission dépend d'un grand nombre de facteurs : la susceptibilité/immunité de la population d'hôtes vertébrés, l'aptitude du vecteur à s'installer durablement après son introduction et le niveau de sa compétence et de sa capacité vectorielles (Fontenille *et al.*, 2013). La mesure de la transmission du paludisme se fait donc à deux niveaux : au niveau de l'homme par des analyses parasitologiques (présence de parasites sanguins détectés par microscopie, test de diagnostic ou analyse biomoléculaire) et/ou des analyses de marqueurs sérologiques d'exposition au parasite ; et au niveau de la population d'anophèles par mesure des indices entomologiques permettant d'incriminer un vecteur.

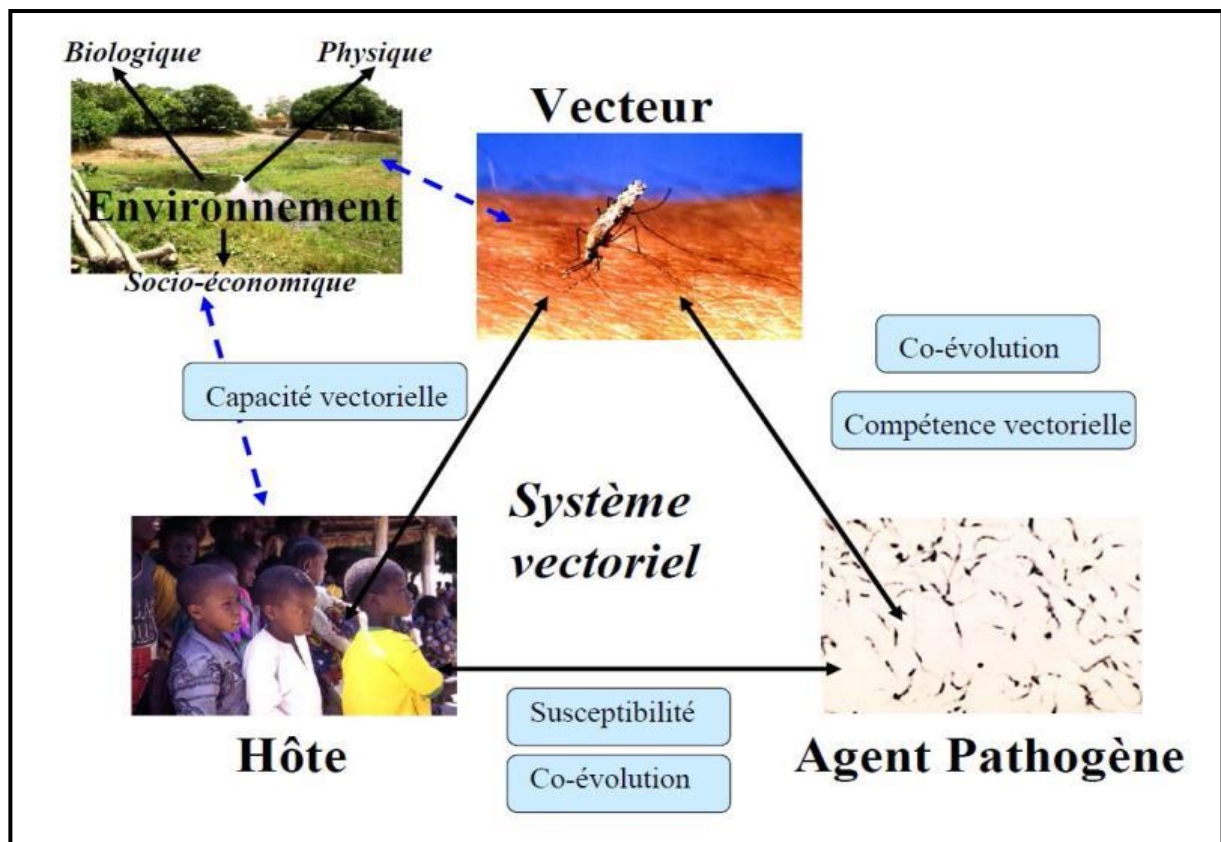


Figure 5 : Système vectoriel : agent pathogène, vecteur, hôte et environnement. Source : (Fontenille, 2008).

1.4.1. Capacité vectorielle et autres indices entomologiques

1.4.1.1. Capacité vectorielle et compétence vectorielle

Entomologiquement, la mesure de la transmission du paludisme s'appuie sur l'analyse de la capacité vectorielle, c'est-à-dire le nombre de piqures infectantes qu'une population anophelienne distribuerait quotidiennement à un cas humain, à un endroit et à un moment donnés, en supposant des conditions de non-immunité (définition basée sur celle énoncée dans l'article de Garret-Jones (Garrett-Jones, 1964). La capacité vectorielle inclut la compétence vectorielle qui est définie comme étant « l'aptitude d'un vecteur à permettre le développement d'un pathogène, de son ingestion dans un repas sanguin à sa maturation dans ses glandes salivaires, lui permettant alors de transmettre le pathogène à l'hôte vertébré ». La capacité vectorielle, illustrée dans la figure 6, est conditionnée par la densité vectorielle, la préférence trophique, la durée du cycle gonotrophique, le taux de survie et la durée du cycle d'incubation extrinsèque du pathogène. Elle est souvent mesurée par la formule suivante : $C = ma \times a \times p^n / -\ln pp$; selon Garrett-Jones (Garrett-Jones, 1964). Ou : C = capacité vectorielle qui s'exprime en nombre de piqures infectantes que peut recevoir un homme par l'intermédiaire d'une population anophelienne par unité de temps.

ma = densité anophelienne agressive pour l'homme estimée en nombre de piqures par homme et par unité de temps. ma peut aussi s'écrire « $m \times a$ », avec m désignant la densité des vecteurs par rapport à l'homme.

a = nombre de repas de sang pris sur homme par un anophèle par unité de temps.

p = probabilité quotidienne de survie de la population anophelienne considérée (calculée à partir du taux de parturité). p^n est la proportion de spécimens qui dépassent l'âge épidémiologiquement dangereux, $1/-\ln p$ est l'espérance de vie et $p^n / -\ln p$ désigne l'espérance de vie infectante. « $\ln$ » désigne le logarithme népérien.

n = durée (en jours) du cycle extrinsèque (ou sporogonique) de l'espèce plasmodiale étudiée dans la zone et pendant la période considérée.

Cependant cette formule n'inclut pas strictement la compétence vectorielle, paramètre important à prendre en considération. Il est depuis admis de définir la capacité vectorielle par la formule : $C = (ma \times a \times p^n) / (-\ln pp) \times V$; selon Reisen (Reisen, 1989). Avec « V » représentant la compétence vectorielle. Celle-ci dépend de facteurs génétiques (susceptibilité de l'hôte moustique) mais également de facteurs environnementaux tels que le microbiote intestinal du moustique (Boissière *et al.*, 2012 ; Tchioffo *et al.*, 2013 ; Dennison *et al.*, 2016 ; Tchioffo *et al.*, 2016a).

Les paramètres pour le calcul de la capacité vectorielle ne sont pas toujours précis et faciles à obtenir, comme la détermination du taux de parturité requérant une expertise spécifique et l'estimation réelle de la durée du cycle sporogonique d'une espèce si on n'a pas les données de

température au moment des captures. C'est pourquoi, la mesure de la transmission se fait généralement en estimant d'autres indices entomologiques spécifiques.

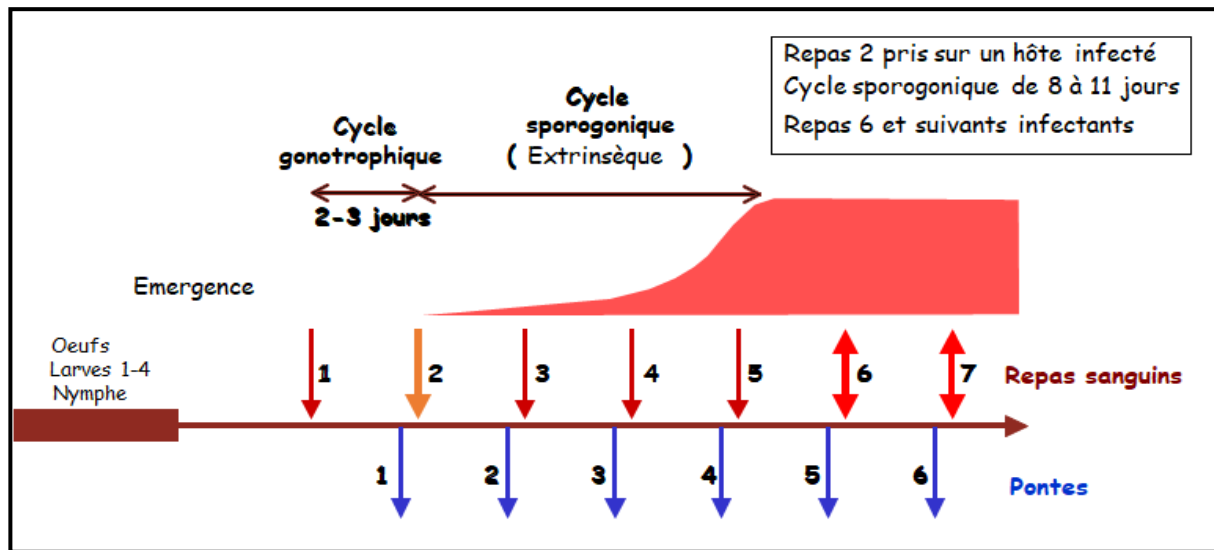


Figure 6 : Schéma de la capacité vectorielle.

Après émergence, le moustique femelle met deux à trois jours pour que sa cuticule durcisse (surtout sa trompe) et qu'elle puisse trouver un hôte vertébré (cycle gonotrophique). Si une femelle prend son deuxième repas de sang sur un hôte infecté, elle pourrait être infectante pour l'homme à partir de son sixième repas sanguin. La durée de vie moyenne d'un anophèle est d'une vingtaine de jours.

1.4.1.2. Autres indices entomologiques utilisés pour la mesure de la transmission

Hormis la formule de la capacité vectorielle, les autres paramètres entomologiques permettant de mesurer la transmission du paludisme sont : le taux d'agressivité (abondance), le taux d'endophilie/exophilie (habitudes de repos), le taux d'endophagie/exophagie (habitudes alimentaires), le taux d'anthrophilie (préférence d'hôte), le taux d'infection et le taux d'inoculation entomologique (WHO, 2014).

Taux d'agressivité ou densité agressive (*ma*) (HBR, « Human biting rate »)

C'est le rapport du nombre de moustiques capturés sur homme par le nombre de captureurs, en une nuit et pour chaque espèce. Il s'exprime en nombre de piqûre/homme/nuit. Pour estimer ce paramètre, il faut réaliser des captures sur appât humain.

Taux d'endophagie/exophagie

C'est la proportion des femelles d'une espèce donnée qui piquent à l'intérieur (endophagie) ou à l'extérieur (exophagie) des habitations.

Taux d'anthrophilie (HBI, « Human blood index »)

C'est la proportion de femelles d'une espèce donnée, portant du sang humain dans leur estomac. Cet indice est obtenu par analyse des repas de sang, généralement par la technique « Enzyme linked

immunosorbent assay » (ELISA) (Beier *et al.*, 1988) et aussi par la technique PCR ciblant le gène Cyt B codant pour la cytochrome b oxydase mitochondriale (Kent & Norris, 2005) qui permettent de distinguer l'origine du repas sanguin entre homme, poulet, bœuf, porc, etc. Il sert à définir le *ma* quand on ne peut pas faire de captures sur homme, principalement dans les pays où capturer des moustiques sur appât humain n'est pas accepté par l'éthique.

Taux d'infection ou Indice sporozoïtique (IS)

C'est la proportion de moustiques d'une espèce donnée, porteurs de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires. Cet indice peut être obtenu par dissection des glandes salivaires et détection par microscopie des sporozoïtes ou par détection de la protéine CSP par analyses ELISA (Wirtz *et al.*, 1985 ; Wirtz *et al.*, 1987) et PCR (Snounou *et al.*, 1993 ; Bass *et al.*, 2008). Les deux dernières techniques sont les plus utilisées de nos jours.

Taux d'inoculation entomologique (EIR, « Entomological inoculation rate »)

C'est le produit du taux d'agressivité *ma* par le taux d'infection IS. Il est exprimé en nombre de piqûres infectantes par homme et par unité de temps (nuit, mois ou année) en zone de faible transmission. Cet indice permet d'évaluer la contribution d'une espèce vectrice dans la transmission du paludisme dans une région donnée, de comparer les niveaux de transmission selon les régions et les faciès épidémiologiques, et d'évaluer l'impact des méthodes de contrôle.

1.5. Contrôle du paludisme

Réduire la transmission du paludisme à un niveau qui ne constitue plus un problème de santé publique est l'objectif de ce qu'on appelle le contrôle du paludisme. Le contrôle du paludisme diffère de son élimination (à portée locale ou régionale) et de son éradication (élimination mondiale). Bien que cela soit difficile à mettre en œuvre, surtout en Afrique qui représente le plus gros fardeau du paludisme, la plupart des programmes nationaux de lutte contre le paludisme visent à éliminer cette maladie. Les méthodes actuelles de contrôle du paludisme ciblent le parasite et le vecteur.

1.5.1. Lutte anti-parasitaire

Traitements médicamenteux chez l'homme

Le traitement médicamenteux a pour objectif premier de guérir le sujet infecté en éliminant rapidement et totalement les plasmodies de son sang. Ceci afin d'éviter des complications pouvant conduire à une infection chronique et potentiellement à la mort. Du point de vue de la santé publique, un traitement efficace a aussi pour but de réduire la transmission du paludisme en diminuant les réservoirs, principalement les porteurs de gamétocytes, et d'éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques (WHO, 2018e). Avant de commencer un traitement, il est

nécessaire de faire un diagnostic précoce du paludisme. Le diagnostic se fait par confirmation parasitologique au moyen d'un examen microscopique (test de référence) ou au moyen d'un TDR. La chloroquine, premier antipaludique de synthèse, avait connu un grand succès au vingtième siècle dans la lutte contre le paludisme. Cependant, une résistance chez *P. falciparum* à ce médicament a été enregistrée dès les années cinquante et ultérieurement chez *P. vivax* (Payne, 1987 ; Wellem & Plowe, 2001 ; Sidhu *et al.*, 2002 ; Howes *et al.*, 2016). La découverte de l'artémisinine a changé radicalement le paysage de la lutte contre le paludisme et a conduit à de nouvelles perspectives dans la recherche et le développement des médicaments antipaludiques (Su & Miller, 2015). Cela a valu au Professeur Youyou Tu en 2015, le Prix Nobel de Médecine pour sa contribution à la découverte de cette molécule. Aujourd'hui, le traitement de première ligne recommandé par l'OMS pour la majorité des cas de paludisme, est l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, les ACT « Artemisinin-based combination therapy » (WHO, 2015b). Cinq ACT sont recommandés par l'OMS : artemeter + lumefantrine ; artesunate + amodiaquine (ASAQ) ; artesunate + mefloquine; dihydroartémisinine + piperaquine; et artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine (S-P). Leur dose est administrée en fonction du poids de l'individu. Le traitement dépend des espèces plasmodiales et de la gravité de la maladie. Il suit les recommandations nationales qui peuvent différer d'un pays à un autre.

Traitement du paludisme non compliqué dû à *P. falciparum*

Le traitement des infections à *P. falciparum* se fait avec l'une des cinq combinaisons d'ACT, sur une durée de trois jours, excepté chez les femmes enceintes dans leur premier trimestre de grossesse. Chez ces dernières, le traitement se fait avec sept jours de quinine + clindamycine. Dans les zones à faible transmission, l'OMS recommande d'ajouter au traitement ACT une dose unique de primaquine, afin de réduire la transmission des plasmodies (WHO, 2012a). En effet, la primaquine en dose unique peut être utilisée comme gamétocytocide et est peu susceptible d'avoir d'effets toxiques chez les sujets déficients en glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD), quels que soient les variants génotypiques en cause (WHO, 2018e). La haute efficacité de l'association S-P + primaquine ou de l'association dihydroartémisinine-piperaquine + bleu de méthylène pour prévenir la transmission de *P. falciparum*, a été récemment démontrée au Mali, avec une bonne tolérance chez des déficients en G6PD (Dicko *et al.*, 2018).

Traitement du paludisme non compliqué dû à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*

Le traitement des infections aux quatre autres espèces plasmodiales se fait soit à base d'ACT, excepté les femmes enceintes durant leur premier trimestre de grossesse, soit à base de chloroquine dans les zones où il n'existe pas de résistance à cette molécule. L'ajout de la primaquine est

nécessaire pour prévenir les cas de rechute dus à *P. vivax* et *P. ovale*. Cependant, à forte dose la primaquine pourrait induire une hémolyse chez les déficients en G6PD.

Traitement préventif chez les enfants et les femmes enceintes

Une des recommandations de l'OMS est la chimio-prévention du paludisme chez les enfants âgés de moins de douze ans et les femmes enceintes au cours de leur première ou deuxième grossesse (WHO, 2015b). Cette chimio-prévention inclue les traitements préventifs intermittents (TPI) et la chimio-prévention saisonnière. L'objectif du traitement préventif est de prévenir le paludisme en maintenant un niveau de médicament thérapeutique dans le sang pendant la période de forte transmission. Chez les enfants, le TPI se fait avec la S-P en même temps que les deuxième et troisième vaccinations contre le tétanos-diphtérie-coqueluche et la vaccination contre la rougeole. Chez la femme enceinte, le TPI se fait toujours avec la S-P, avec trois doses administrées à un mois d'intervalle à partir du deuxième trimestre de grossesse. La chimio-prévention saisonnière se fait avec l'amodiaquine + S-P administrée mensuellement à des enfants âgés de moins de six ans pendant la période de transmission. Elle se fait dans des zones de transmission paludique élevée en Afrique subsaharienne.

Traitement du paludisme grave

Le traitement du paludisme grave se fait avec une injection intramusculaire ou intraveineuse d'artésunate pendant au moins vingt-quatre heures, suivie d'un traitement de trois jours à base d'ACT une fois que le patient peut tolérer des médicaments par voie orale. Ce traitement est applicable chez tous les groupes de patients, aussi bien chez la femme enceinte à tous les trimestres de grossesse que chez les enfants de moins de cinq ans.

Pourtant, l'émergence récente de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à la frontière entre Thaïlande et le Cambodge (Benoit-Vical *et al.*, 2016) (où avait émergé la résistance à la chloroquine dans les années 60, à la sulfadoxine-pyriméthamine dans les années 70, puis à la méfloquine dans les années 80) souligne la difficulté de cette lutte curative et la nécessité de développement de nouveaux médicaments. Toutefois, notons qu'en plus de l'action curative du traitement, il est important d'ajouter une action préventive, à savoir le développement d'un vaccin et la lutte contre le vecteur. L'association des différentes méthodes a permis d'élaborer la lutte intégrée.

Vaccins antipaludiques

A l'heure actuelle, la protection contre le paludisme par la vaccination reste une méthode en cours de développement. Les recherches se poursuivent pour le développement d'un vaccin efficace (Arama & Troye-Blomberg, 2014). Le principal vaccin candidat de la firme GlaxoSmithKline, le RTS, S (une protéine recombinante basée sur une chaîne polypeptidique de la protéine

circumsporozoïte de *P. falciparum*, et qui contient à la fois des épitopes de lymphocytes B et de lymphocytes T, fusionnés à l'antigène de surface de l'hépatite B), distribué sous la marque mosquirix, n'a pas encore atteint l'efficacité protectrice recherchée à l'échelle communautaire (Campo *et al.*, 2014). Néanmoins, le comité des médicaments à usage humain de l'agence européenne des médicaments a ainsi rendu un avis favorable en juillet 2015, à la suite de la phase III de l'étude clinique conduite auprès de 15 459 enfants dans sept pays d'Afrique sub-Saharienne (Burkina Faso, Gabon, Ghana, Kenya, Malawi, Mozambique et Tanzanie) (RTS, 2015). Toutefois, des nouvelles pistes de recherche utilisant les sporozoïtes atténués (Roestenberg *et al.*, 2011) à travers des méthodes de l'irradiation gamma ont montré des résultats satisfaisants et ont entraîné un regain d'espoir (Pfeil *et al.*, 2014).

La prévention contre le paludisme repose essentiellement sur la lutte contre les anophèles vecteurs car le vaccin le plus avancé, RTS, S ne confère qu'une protection partielle contre le paludisme à *P. falciparum* chez le jeune enfant (RTS, 2015).

1.5.2. Lutte anti-vectorielle

Le nombre limité d'antipaludiques et l'absence d'un vaccin efficace jusqu'à nos jours, font de la lutte antivectorielle (LAV) la principale stratégie préventive contre le paludisme. Les méthodes de LAV ne sont efficaces que si certaines conditions sont réunies, en fonction du vecteur ciblé et de la situation locale. En effet, chaque méthode varie du point de vue de l'efficacité, des ressources nécessaires, des moyens potentiels de la rendre accessible à la population cible, et du personnel requis pour la mise en œuvre (WHO, 2014). D'après Carnevale et collaborateurs (Carnevale *et al.*, 2009), les méthodes de LAV peuvent être classées selon : la technique de lutte (physique, biologique, chimique, génétique) ; la cible (les larves, les adultes) ; le niveau de la mise en œuvre (service spécialisé, communauté, individu) ; et l'effet recherché pour réduire le contact hôte/vecteurs, la densité et la longévité des vecteurs.

En Afrique sub-saharienne, la lutte antivectorielle vise surtout à « contrôler » le paludisme. Le contrôle se définit comme une diminution durable de la transmission ou une réduction de la population de vecteurs dans des proportions telles que la maladie n'est plus un problème de santé publique, ni un obstacle au développement socio-économique. Cette lutte tend à diminuer soit la compétence vectorielle, soit la capacité vectorielle des membres du complexe *Anopheles gambiae*. D'une manière générale, diminuer la capacité vectorielle peut être envisagé par différentes stratégies de lutte, généralement classées selon le facteur de transmission qu'elles touchent. En effet, certaines méthodes ont pour objectif de réduire la densité de moustiques (lutte anti-larvaire) ou la longévité des femelles adultes (PID) tandis que d'autres visent à réduire le contact homme-vecteur

(MIILD). Mais le choix de l'une ou l'autre doit tenir compte de la bioécologie des espèces visées, de leur comportement et du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission de la maladie.

Les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et les pulvérisations intradomiciliaires (PID) sont deux principales méthodes de lutte antivectorielle mais actuellement la lutte anti-larvaire également connaît un regain d'intérêt dans plusieurs pays d'Afrique.

1.5.2.1. La lutte anti-larvaire

Après la découverte en 1897 que les anophèles sont les vecteurs des *Plasmodium spp.*, la lutte anti-larvaire (LAL) a été la principale stratégie utilisée pour lutter contre le paludisme. Elle vise à réduire la transmission des *Plasmodium spp.* en diminuant la densité des vecteurs. On distingue quatre catégories de stratégies de LAL: (i) modification de l'habitat, (ii) manipulation de l'habitat, (iii) contrôle biologique, (iv) traitement des gîtes à l'aide de larvicides. En Afrique, des programmes de LAL efficaces contre *An. gambiae* s.l. et/ou *An. funestus* ont été implémentés en Egypte, en Zambie et en Tanzanie (Shousha, 1948; Utzinger *et al.*, 2001; Caldas de Castro *et al.*, 2004). L'utilisation des bio-larvicides comme les bactéries *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus* ont montré leur efficacité sur le terrain au nord-ouest du Burkina Faso (Dambach *et al.*, 2014) et à l'ouest du Kenya (Fillinger *et al.*, 2003). Des poissons larvivores comme *Gambusia affinis* et *Poecilia reticulata* ont aussi montré leur efficacité dans la réduction des larves et nymphes dans des gîtes larvaires et donc des adultes d'anophèles (Bay, 1967; Prasad *et al.*, 1993 ; Howard *et al.*, 2007).

Toutefois, une lutte anti-larvaire bénéfique au plan épidémiologique contre le paludisme implique une réduction quasi totale des gîtes à anophèles, principalement dans les zones de paludisme stable où la transmission peut être assurée par un petit nombre de vecteurs. Or les caractéristiques des gîtes larvaires des espèces vectrices de *An. gambiae* et *An. arabiensis* (nombreux et temporaires) ne permettent pas l'utilisation des méthodes de lutte anti-larvaire quelles qu'elles soient (aménagement de l'environnement, lutte biologique, lutte chimique). La méthode larvicide reste difficile à appliquer dans les zones endémiques du paludisme du fait de la distribution et la dynamique des gîtes larvaires de *An. gambiae* et de son coût économique (WHO, 2014). La lutte anti-larvaire est uniquement recommandée par l'OMS en tant que mesure complémentaire à la lutte antivectorielle dans les zones où les gîtes larvaires sont peu nombreux, faciles à localiser, cartographier et à traiter (WHO, 2013).

1.5.2.2. Lutte adulticide

La lutte contre les vecteurs adultes est une composante essentielle dans la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme (WHO, 2008). Cette méthode vise l'élimination des moustiques adultes (imago) par la pulvérisation intradomiciliaire (PID) d'insecticide et les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD). L'efficacité de ces deux méthodes repose sur les préférences trophiques des vecteurs majeurs qui sont considérés comme anthropophiles et endophiles.

1.5.2.2.1. Les moustiquaires imprégnées d'insecticides

L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action est l'une des méthodes les plus efficaces pour la lutte antivectorielle. L'usage des moustiquaires remonte aux temps anciens pendant lesquels il permettait de lutter contre les nuisances des insectes nocturnes. Ce n'est qu'à partir du XIX^{ème} siècle que les moustiquaires ont été reconnues comme un outil de lutte contre les maladies vectorielles. Elles offrent une protection individuelle efficace contre les anophèles car ceux-ci piquent généralement la nuit et à l'intérieur des habitations. Cependant, le niveau de protection conféré par une moustiquaire dépend largement de sa bonne utilisation et de son état d'usure physique. L'imprégnation des moustiquaires a permis de conférer à l'individu une protection au moyen d'une barrière chimique qui renforce la barrière physique. Darriet *et al.* ont été les premiers à prouver l'efficacité des moustiquaires imprégnées de perméthrine (un insecticide de la classe des pyréthrinoides) au Burkina-Faso en 1983 (Darriet *et al.*, 1984). Très rapidement, les moustiquaires imprégnées d'insecticide se sont affirmées comme l'outil de choix pour réduire significativement le poids du paludisme dans le monde, en particulier en Afrique. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide induisent plusieurs effets (Carnevale *et al.*, 1988) : (i) effet Knock-Down (KD) ou effet choc. Le contact du moustique avec l'insecticide provoque une perturbation des influx nerveux qui se traduit par une paralysie momentanée du moustique ; (ii) effet létal. En fonction de la durée de contact, le moustique exposé au matériel imprégné meurt ; (iii) effet excito-répulsif. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide réduisent à distance le nombre de vecteurs entrant dans les habitations ; (iv) effet irritant qui limite le temps de contact avec la moustiquaire et induit l'envol du moustique (qui peut revenir au contact après) et l'effet de masse ou protection collective si le taux d'utilisation est supérieur à 50% (Killeen & Smith, 2007). Il s'explique par le fait qu'un taux élevé (>50%) d'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide dans une communauté pourrait entraîner une réduction de la densité et de la longévité des vecteurs, ce qui pourrait conférer une certaine protection aux personnes n'utilisant pas de moustiquaires.

Depuis quelques années, le développement des moustiquaires imprégnées à « longue durée d'action » (MILD) a permis d'augmenter la durée d'efficacité des moustiquaires imprégnées

d'insecticide et leur résistance aux lavages (Guillet *et al.*, 2001). Les technologies utilisées pour la fabrication des MIILDs varient et dépendent du matériau utilisé. Les MIILDs tissées en polyéthylène ou polypropylène ont l'insecticide incorporé par fusion dans la fibre alors que l'insecticide est fixé sur la fibre à l'aide d'une résine pour celles en polyester. La première technologie permet de relarguer progressivement l'insecticide à la surface de la moustiquaire par régénération alors que, pour la seconde, l'insecticide est directement disponible.

A travers le programme « Roll Back Malaria », les chefs d'Etats africains réunis à Abuja en avril 2000, avaient fixé entre autres objectifs d'atteindre une couverture en MIILDs de 60% chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes avant 2005. Cet objectif a ensuite été revu à la hausse (80%) pour 2010. Ces taux visés n'ont malheureusement pas été atteints dans la plupart des pays. De nos jours, l'OMS recommande la couverture universelle de MIILDs dans toutes les zones endémiques, pas seulement pour les groupes les plus vulnérables (enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes) (Roll Back Malaria, 2011). En conséquence, la couverture en MIILDs a considérablement augmenté ces dernières années. Il a été estimé que près d'un milliard de MIILDs ont été distribuées en Afrique sub-saharienne depuis 2000 et la population dormant sous MIILDs a augmenté de 2 à 53% entre 2000 et 2015 (WHO, 2015a). Ceci a largement contribué (69%) au progrès obtenu dans la lutte contre le paludisme entre 2000 et 2015 (Bhatt *et al.*, 2015 ; WHO, 2015a). Plusieurs autres études effectuées sur les évaluations de l'efficacité des moustiquaires imprégnées de perméthrine et de deltaméthrine ont donné des résultats satisfaisant (Li zuzi *et al.*, 1987 ; Carnevale *et al.*, 1988 ; Snow *et al.*, 1988). Mais, la nature nomade de certains groupes ethniques, les habitudes culturelles des paysans, les habitudes des villageois à dormir hors de leur case pendant les périodes de chaleur et les représentations liées aux croyances sont autant de barrières qui peuvent rendre inefficaces l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. De même, l'efficacité des MIILDs baisse en présence de moustiques exophiles et exophages. Raison pour laquelle elle est renforcée par des pulvérisations d'insecticides rémanents dans les maisons et autres abris extérieurs, ainsi que d'autres méthodes comme l'utilisation des répulsifs (cutanés et vestimentaires) et la mise en place des protections au niveau des maisons (grillages de fenêtres, rideaux imprégnés, ventilateurs, etc.).

Il convient également de noter que de nouvelles moustiquaires bi-traitées (pyréthrianoïde et un autre ingrédient actif) sont disponibles actuellement et ont récemment reçu une recommandation provisoire de l'OMS (WHOPES, 2017). Les ingrédients actifs ajoutés aux pyréthrianoïdes sont soit un nouvel insecticide (le chlorfenapyr de la famille des pyrroles) ou un régulateur de croissance (le pyriproxyfen de la catégorie des juvénoïdes) ou un synergiste (le butoxyde de pipéronyle ou PBO).

1.5.2.2.2. La pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent

La pulvérisation (ou aspersion) intradomiciliaire (PID) d'insecticides à effet rémanent peut être définie comme l'application d'un insecticide liquide qui sèche et forme un dépôt cristallin rémanent sur les surfaces pulvérisées (Najera & Zaim, 2004). Le principe de la méthode repose sur le comportement des vecteurs qui recherchent après chaque repas de sang, des endroits tranquilles et sombres pour le repos et la digestion (endophilie). La PID permet ainsi de tuer les moustiques qui se posent sur les surfaces traitées avant et/ou après la prise de repas sanguins. Elle induit une mortalité très importante des vecteurs adultes en réduisant leur longévité et par conséquent la probabilité que le *Plasmodium* puisse achever son développement en leur sein. De cette façon, cette méthode baisse le taux d'agressivité pour l'homme ainsi que l'espérance de vie infectante du vecteur, deux facteurs déterminants de sa capacité vectorielle (Mac Donald, 1956 ; Gillies & Meillon, 1968).

La découverte du dichlorodiphényltrichloroethane (DDT) en 1939 a marqué le début de la lutte contre les vecteurs par les pulvérisations intradomiciliaire à effet rémanent (PID). La PID avec du DDT fut l'outil de base du programme mondial d'éradication du paludisme lancé par l'OMS en 1955. Pendant les 10 premières années (1957-1966), les résultats obtenus furent spectaculaires, avec notamment l'éradication du paludisme aux Etats Unis d'Amérique, dans l'ancienne Union Soviétique et dans plusieurs pays d'Europe. En Asie du Sud-Est, en Inde et en Amérique du Sud, une diminution significative de l'incidence du paludisme avait été observée. Dans la même période, environ 26% (12/45) des pays d'Afrique subsaharienne ont déployé la PID, ce chiffre étant passé à 63% (29/46) à la fin de l'année 2017 (Tangena *et al.*, 2020). Dans des pays comme le Bénin, le Togo, le Burkina-Faso, le Sénégal, le Libéria, le Nigéria, le Cameroun, la Tanzanie, le Rwanda, le Burundi, l'Ouganda et le Kenya, la couverture de la PID allait de petites études pilotes à des campagnes nationales de masse. D'importantes réductions de la densité des vecteurs et des cas de paludisme ont été observées dans ces pays mais la transmission n'a pas pu être interrompue (Payne *et al.*, 1976 ; Bradley, 1991 ; Najera & Zaim, 2001). Par conséquence, entre les années 1997 et 2005, la PID n'a pas été implémentée à grande échelle dans la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne sauf dans des pays situés au Sud du continent tels que l'Afrique du Sud, la Zambie, la Namibie, le Swaziland, le Zimbabwe et le Botswana (Mabaso *et al.*, 2004). Notons que le DDT a été ensuite progressivement remplacé par des insecticides moins dangereux pour l'environnement à savoir ceux de la classe des pyréthrinoides, des carbamates et des organophosphorés. En 2005, l'OMS a réaffirmé l'importance de la PID comme stratégie primaire et complémentaire aux MIILDS dans la lutte antivectorielle contre le paludisme (WHO, 2006). Ces dernières années, les campagnes

de PID se sont multipliées grâce notamment au programme President's Malaria Initiative (PMI). La couverture de la PID la plus élevée a été atteinte entre 2010-2013, en partie, en raison du lancement de cette intervention en Afrique de l'Ouest (figure 7). Le nombre de personnes protégées par la PID en Afrique sub-saharienne est passé de 13 millions en 2005 à 45 millions en 2016, avec un pic observé en 2010 (78 millions) (WHO, 2017).

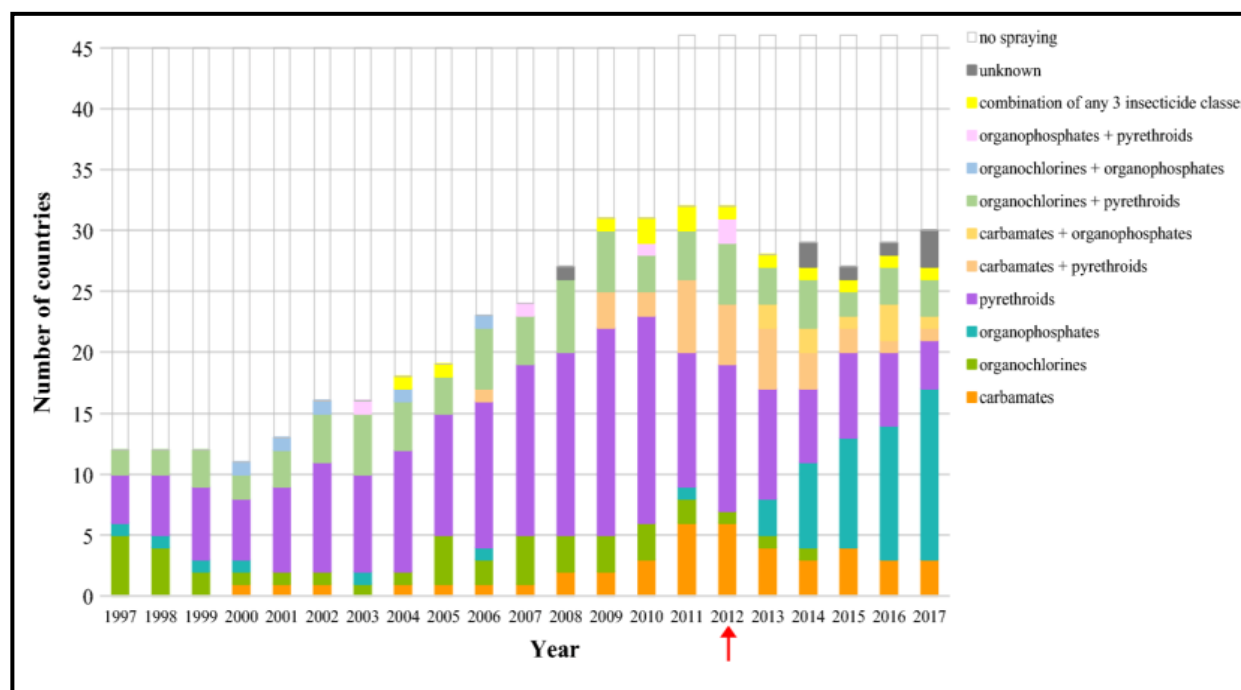


Figure 7 : Evolution du nombre de pays déployant la PID pour la lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne de 1997 à 2017 (Tangena *et al.*, 2020).

1.5.2.2.3. Lutte contre la transmission du *Plasmodium* : nouvelles approches

Face au développement de résistances des anophèles contre les insecticides couramment utilisés en lutte antivectorielle, de nouvelles approches ciblant les vecteurs ont été proposées : l'utilisation de bactéries symbiotiques des anophèles ou le développement de moustiques transgéniques.

De nombreuses études ont montré que certaines entérobactéries, comme *Escherichia coli*, résidant dans le tube digestif du moustique, peuvent inhiber le développement des plasmodies humaines chez les vecteurs de paludisme (Cirimotich *et al.*, 2011a ; Cirimotich *et al.*, 2011b ; Boissière *et al.*, 2012 ; Dennison *et al.*, 2016 ; Tchioffo *et al.*, 2016a, 2016b). Par ailleurs, l'utilisation de la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* a été largement proposée en tant qu'outil de lutte contre le paludisme car elle peut agir à la fois sur le développement du *Plasmodium* chez les vecteurs ainsi que sur la longévité et la densité de ces derniers (Walker & Moreira, 2011 ; Hughes *et al.*, 2014). D'autre part, cette bactérie endosymbiotique se transmet verticalement et permet de maintenir ses effets sur de nombreuses générations. Cependant ces données ont été obtenues avec un *Plasmodium* d'oiseaux se développant chez *Aedes aegypti* sensible à la colonisation par

Wolbachia. Ce n'est qu'en 2014 que la présence naturelle de *Wolbachia* a été rapportée chez un anophèle, *An. gambiae*, jusque-là expérimentalement résistant aux *Wolbachias* capables d'infester *Ae. aegypti* (Baldini *et al.*, 2014). Depuis, une étude menée au Burkina Faso a montré que les infections à *Wolbachia* dans les populations naturelles de *An. coluzzii* affectent la ponte et sont négativement corrélés avec le développement du *P. falciparum* (Shaw *et al.*, 2016). Une seconde étude au Mali (Gomes *et al.*, 2017) a montré que la prévalence et le taux d'infection à *P. falciparum* dans une population sauvage d'*An. gambiae* s.l., sont significativement plus faibles chez les femelles infectées par *Wolbachia*. Des résultats similaires ont été observés à partir d'une colonie de *An. coluzzii* mais avec une charge oocystique plus élevée chez les moustiques infectés. L'incompatibilité cytoplasmique n'a pas encore été observée chez les anophèles vecteurs de plasmodies humaines.

La seconde nouvelle approche de « LAV » fait appel aux développements d'anophèles transgéniques à des fins de remplacement des populations vectrices par des populations non vectrices, ou de « suppression » des populations vectrices. Ainsi, il a été montré que l'expression de molécules ciblant le développement sporogonique de *P. falciparum* chez un anophèle transgénique empêchait la production de sporozoïtes (Isaacs *et al.*, 2012). L'approche transgénique visant à la suppression de population, exploite l'inactivation de gènes essentiels à la reproduction. Il existe à l'heure actuelle un engouement très fort pour le déploiement de ces approches depuis la découverte de la technologie CRISPR-cas9 « Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - associated protein 9 » (Jinek *et al.*, 2012) permettant de créer un système efficace de propagation des « transgènes » dans les populations naturelles (Gantz *et al.*, 2015 ; Hammond *et al.*, 2016 ; Macias *et al.*, 2017). Des essais sont programmés, en particulier au Burkina Faso où ce projet fait débat (Douce, 2018). Le déploiement de tels moustiques transgéniques et les risques associés sont examinés de près par différentes autorités (James *et al.*, 2018).

1.6. Les insecticides utilisés en santé publique et modes d'action

Les stratégies décrites précédemment sont essentiellement basées sur l'utilisation d'insecticide. Un insecticide est une substance active ou une préparation susceptible de tuer les insectes (ou d'autres Arthropodes, tels que les acariens) au stade adulte et/ou larvaire. La quasi-totalité des insecticides utilisés en santé publique proviennent de la lutte contre les insectes d'intérêt agricole. On distingue les insecticides chimiques de synthèse et les insecticides biologiques.

Les insecticides de synthèse disponibles pour la lutte contre les vecteurs d'agents pathogènes appartiennent à 7 grandes familles : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthréinoïdes, les régulateurs de croissance, les pyrroles et les néonicotinoïdes. Les deux dernières ont intégré la liste en 2017 (WHOPES, 2017). En plus de ces familles, on a les toxines bactériennes qui sont les principaux insecticides biologiques utilisés dans la lutte antivectorielle.

1.6.1. Les organochlorés

Les organochlorés furent la première famille d'insecticide utilisée en pulvérisation intradomiciliaire avec le dichlorodiphenyl-trichloroéthane (DDT) dans les années 50 (Bruce-Chwatt, 1984). Ils appartiennent à 3 sous-familles différentes en fonction de leur mode d'action et leur structure chimique : le DDT et ses analogues, les cyclodiènes et le lindane. Les cyclodiènes et le lindane sont des neurotoxines qui inhibent les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Le DDT agit sur le système nerveux central et périphérique en interagissant avec le canal sodium voltage dépendant. Il ralentit la fermeture des canaux sodiques, ce qui induit chez le moustique un tremblement généralisé (incoordination motrice) puis une paralysie. La toxicité aiguë des organochlorés envers les vertébrés est relativement faible et leur rémanence est longue (> 6 mois). Ils ont été très utilisés de 1940 à 1970 mais ils sont toxiques pour la faune non cible et persistent durablement dans l'environnement. De fait, seul le DDT est encore utilisé pour la PID mais il est remplacé dans la plupart des pays par des insecticides moins dangereux. Il convient de noter que le DDT n'est actuellement autorisé que pour la lutte antivectorielle (WHO, 2011a).

1.6.2. Les pyréthrinoïdes

Ce sont des insecticides de synthèse copiés sur les pyréthrines naturelles (extraits des fleurs de chrysanthème). Ils ont le même mode d'action que le DDT. Ils sont peu toxiques pour les mammifères et ont le coefficient de sécurité (rapport de la toxicité pour les insectes et pour les mammifères) le plus élevé comparativement aux autres insecticides utilisés en santé publique. Ils sont également très biodégradables et possèdent des propriétés excito-répulsives. Ces particularités justifient leur utilisation pour imprégner les moustiquaires. Les pyréthrinoïdes sont classés en deux groupes : groupe I et groupe II. Les insecticides du groupe I ne possèdent pas de groupement cyané en α de la liaison ester alors que ceux du groupe II en possèdent. Les pyréthrinoïdes du type II ralentissent la fermeture des canaux sodiques pendant une durée plus longue que ceux du type I.

1.6.3. Les organophosphorés

Les organophosphorés sont très hétérogènes. Ils inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine. L'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique empêche la transmission de l'influx nerveux, entraînant la paralysie puis la mort de l'insecte. Les organophosphorés sont moins dangereux pour l'environnement que les organochlorés. Cependant leur rémanence est plus faible (3 mois en moyenne). Récemment, une nouvelle formulation micro-encapsulée de pirimiphos-méthyl a montré une rémanence plus longue (pouvant aller jusqu'à 10

mois) (Rowland *et al.*, 2013). Cette nouvelle formulation est celle utilisée pour la PID au Bénin et dans de nombreux programmes de pulvérisations intradomiciliaires depuis quelques années.

1.6.4. Les carbamates

Les carbamates les plus utilisés en pulvérisation intradomiciliaire sont le bendiocarb et le propoxur (Coosemans & Carnevale, 1995; Chavasse & Yap, 1997). Ils sont des dérivés de l'acide carbamique et agissent, comme les organophosphorés, en inhibant l'acétylcholinestérase. Toutefois, contrairement aux organophosphorés, l'acétylcholinestérase est capable de se réactiver spontanément après la phosphorylation par un carbamate (Fukuto, 1990). Jusqu'à récemment, les carbamates (bendiocarb notamment) étaient beaucoup utilisés en Afrique mais à cause de leur faible rémanence (2-6 mois) (WHO, 2020) et de l'accroissement de la résistance des vecteurs aux carbamates, ils sont progressivement remplacés par les organophosphorés (pirimiphos-méthyl notamment). La figure 8 montre les principales classes d'insecticides utilisées en PID par les programmes nationaux de 2010 à 2017 (WHO, 2018d).

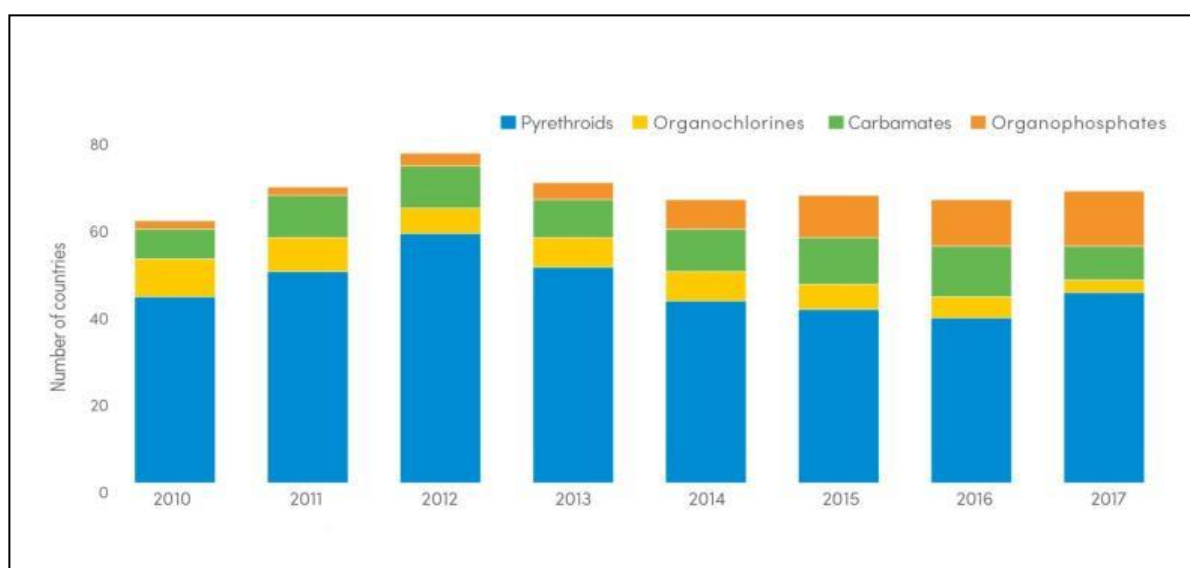


Figure 8 : Les principales classes d'insecticides utilisés en PID par les programmes nationaux de 2010 à 2017. Source : World malaria report 2018 (WHO, 2018d)

1.6.5. Les régulateurs de croissance

Ce sont des analogues d'hormones de croissance des insectes qui entravent le développement des stades pré-imaginaux. Les juvénoides (méthoprène, pyriproxifen) inhibent la nymphose, quand les ecdysoïdes (diflubenzuron) inhibent la sclérification de la chitine de la larve après une mue larvaire ou nymphale causant ainsi la mort (Chandre, 1998). Les régulateurs de croissance ont en général une durée d'efficacité courte (2-7 jours) et une action lente.

1.6.6. Les toxines bactériennes

Deux bactéries entomopathogènes sont utilisées comme larvicides. Il s'agit de *Bacillus thuringiensis israelensis* et de *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.

1.6.7. Les pyrroles

Le chlorfénapyr, de la classe des pyrroles, est un nouvel insecticide synthétique disponible en santé publique. En 2017, l'OMS a recommandé provisoirement l'utilisation des moustiquaires Interceptor G2 qui sont bi-imprégnées de chlorfénapyr et d'alpha-cyperméthrine (WHOPES, 2017). Le chlorfénapyr a un mode d'action complètement différent des autres insecticides. Il agit en perturbant la production d'ATP dans les mitochondries, et donc la respiration cellulaire (phosphorylation oxydative). Son effet insecticide est plus lent que les insecticides classiques car il doit être métabolisé *in vivo* avant d'être actif (N'Guessan *et al.*, 2007b).

1.6.8. Les néonicotinoïdes

La clothianidine, de la classe des néonicotinoïdes, est aussi un nouvel insecticide synthétique utilisable en santé publique. SumiShield® 50WG avec pour principe actif la clothianidine a été pré-qualifié par le Système d'évaluation des pesticides de l'Organisation mondiale de la santé (WHOPES) en 2017 (WHO, 2018b) et Fludora Fusion® WP-SB (WHO, 2018c) contenant un mélange de deltaméthrine (6,25%) et de clothianidine (50%) en 2018. Le mode d'action de la clothianidine est également particulier et assez lent. L'insecticide tue les insectes en se fixant sur le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, interrompant ainsi la transmission de l'influx (Elamathi *et al.*, 2014).

1.7. Résistance aux insecticides

Depuis l'introduction des insecticides synthétiques dans les années 1950, il y a eu sélection de mécanismes d'adaptation chez les insectes qui leur permettent survivre aux traitements insecticides (Georghiou, 1972). Pour qu'un insecticide soit efficace, l'insecte doit entrer en contact avec l'insecticide et la molécule active doit pénétrer dans le corps de l'insecte, être transportée jusqu'à sa cible et interagir avec celle-ci (figure 9a). Tout mécanisme modifiant cette séquence d'événements peut conduire à une résistance (figure 9b). En d'autres termes, la résistance peut être définie comme tout mécanisme permettant à un individu de survivre à des doses de substances

toxiques létales pour la majorité des individus composant une population normale de la même espèce. Un mécanisme de résistance est héritable et soumis à la sélection darwinienne.

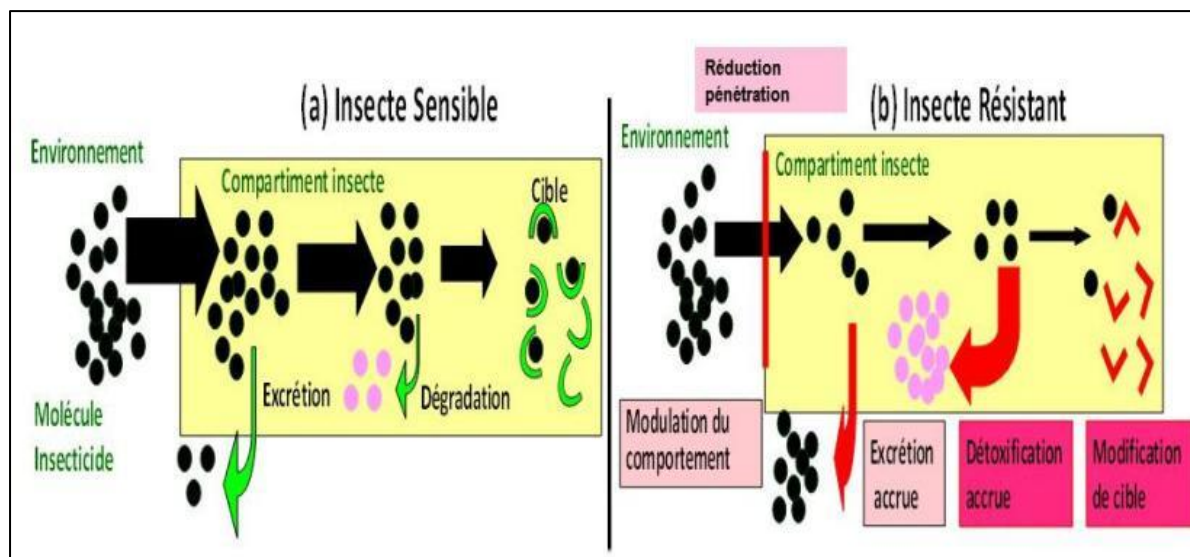


Figure 9 : Mode d'action d'un insecticide sur un insecte sensible (a) et résistant (b). Source: (Lapied *et al.*, 2009)

1.7.1. Les mécanismes de résistances aux insecticides chez les moustiques

Il existe actuellement trois types de mécanismes de résistance : la résistance biochimique (enzymes), la résistance cuticulaire et la résistance comportementale (évitement).

Trois termes sont employés pour décrire les patrons de résistance des insectes aux substances chimiques : résistance simple, résistance croisée, résistance multiple et résistance multiplicative (Nikou *et al.*, 2003). On parle de résistance simple lorsqu'un mécanisme de résistance permet à l'insecte de résister à une classe d'insecticide donnée. Quant à la résistance croisée, le mécanisme de résistance qui permet aux insectes de résister à un insecticide, peut aussi conférer la résistance à un autre insecticide. Un tel phénomène s'observe généralement entre des insecticides de classes différentes mais ayant le même site d'action. Par exemple, les organophosphorés et les carbamates ont des cibles et des modes d'actions relativement similaires et la résistance à une famille entraîne souvent celle de l'autre. La résistance croisée désigne également la résistance à plusieurs insecticides avec des modes d'action différents mais qui sont métabolisés par les mêmes enzymes (isozymes) (Lepoivre, 2003). La résistance multiple est la résistance conférée par plusieurs mécanismes de résistances chez un insecte. A titre illustratif, un insecte possédant des gènes mutés distincts qui le rendent résistant à deux familles d'insecticides avec des modes d'action différents (Perera *et al.*, 2008). Enfin, la résistance multiplicative désigne le fait que plusieurs mécanismes de résistance confèrent le statut de résistance à l'insecte (Hardstone *et al.*, 2009). Autrement dit, les mécanismes de résistances peuvent agir en synergie.

1.7.1.1. Modifications de la cible

Il s'agit d'une ou plusieurs mutations sur le gène qui code pour la synthèse de la protéine cible de l'insecticide, ce qui modifie la structure de la protéine et donc diminue l'affinité insecticide-cible. Ces mécanismes confèrent une résistance croisée à tous les insecticides agissant sur une même cible (Carnevale *et al.*, 2009). Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux. Nous avons le canal sodium voltage dépendant (CNaVdp), le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et l'acétylcholinestérase (AChE) (figure 10). Les mutations les plus connues chez *An. gambiae s.l.* sont *kdr* et *ace-1*.

La mutation *kdr*, située sur le gène codant pour le canal sodium, confère une résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT. Les pyréthrinoïdes et le DDT agissent au niveau des CNaVdp et perturbent le fonctionnement normal des canaux et la transmission de l'influx le long des fibres nerveuses. Concernant les moustiques, il s'agit d'une substitution de la leucine sur le codon 1014 par la phénylalanine (L1014F, anciennement dénommée "*kdr*-ouest") (Martinez-Torres *et al.*, 1998) ou par la sérine (L1014S, anciennement dénommée "*kdr*-est") (Ranson *et al.*, 2000). La mutation *kdr* L1014F est très répandue dans les populations d'*An. gambiae s.l.* étudiées en Afrique de l'Ouest. La mutation *kdr* L1014S est également présente en Afrique de l'Ouest mais sa fréquence est relativement faible (WHO, 2018d). En 2011, cette mutation a été rapportée pour la première fois au Bénin (Djègbè *et al.*, 2011). Quant à la mutation *kdr* L1014F, elle s'est fixée dans tout le pays (Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouleton *et al.*, 2009 ; Gnanguenon *et al.*, 2015).

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

La cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase, une enzyme située dans les synapses des cellules nerveuses. Les insecticides de ces deux familles agissent sur l'acétylcholinestérase en l'inhibant, ce qui entraîne la mort de l'insecte par accumulation de l'acétylcholine (substrat de l'enzyme) dans la fente synaptique (figure 10). Cette mutation *ace-1*

(G119S), résulte d'une substitution de la glycine sur le codon 119 par la sérine (G119S) (Weill *et al.*, 2004). Elle est répandue en Afrique de l'Ouest mais retrouvée généralement à des fréquences plus faibles que celles de *kdr* L1014F. Ceci est dû notamment au fort coût de l'allèle *ace-1* (Djogbénou *et al.*, 2010). Cependant la présence de l'allèle dupliquée *ace-1D* chez le vecteur réduit considérablement ce coût (Djogbenou *et al.*, 2008; Assogba *et al.*, 2015).

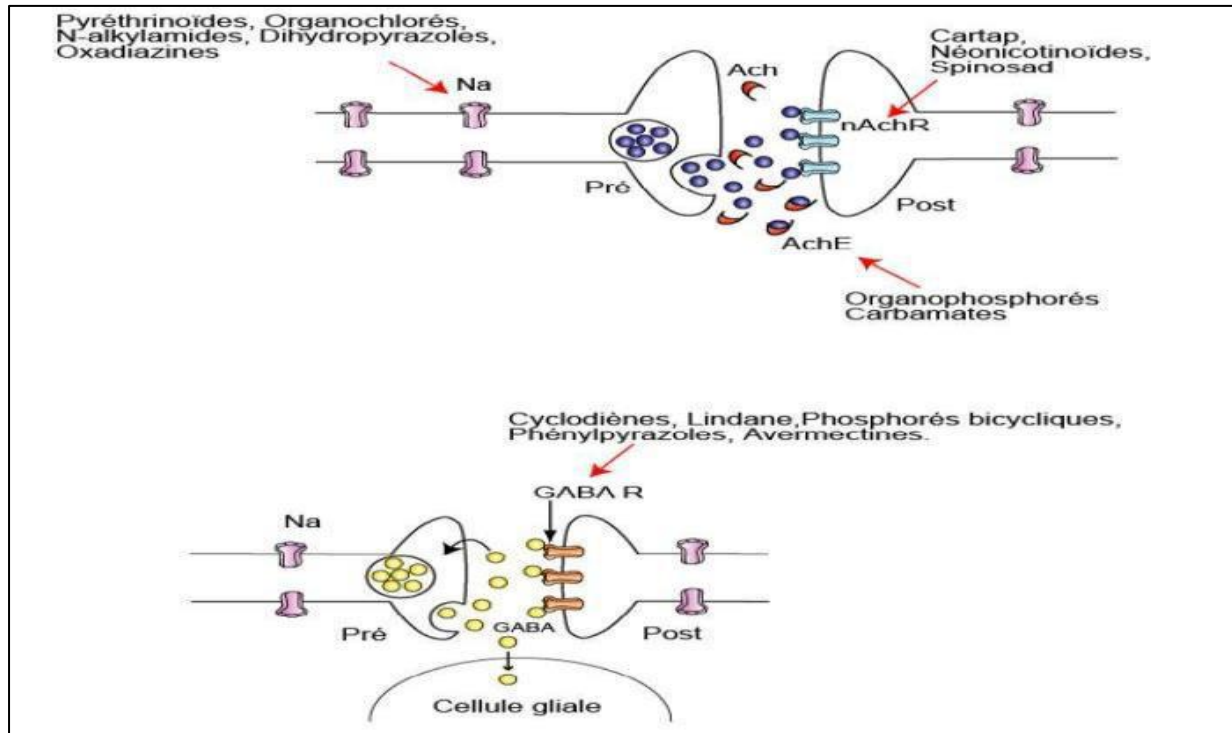


Figure 10 : Modes d'actions des principaux insecticides chimiques agissant au niveau du système nerveux (Pennetier *et al.*, 2008).

1.7.1.2. La résistance métabolique

Ce type de résistance s'explique par une surexpression des enzymes capables de détoxifier ou de séquestrer l'insecticide avant sa cible et / ou encore une substitution d'un acide aminé sur le site d'affinité de l'enzyme avec l'insecticide. Ce phénomène se traduit par une diminution de la quantité d'insecticide atteignant la cible et donc une augmentation de la tolérance de l'insecte. Trois enzymes sont fortement associées à la résistance des vecteurs de *Plasmodium spp.* aux insecticides : les oxydases à cytochrome P-450, les estérases et les glutathion-S-transférases (GST). La surproduction des oxydases a été associée à la résistance aux pyréthrinoides (Wondji *et al.*, 2012; Edi *et al.*, 2014) et celle des estérases à la résistance aux organophosphorés et aux pyréthrinoides (Brogdon *et al.*, 1999; Vulule *et al.*, 1999). La surproduction des GST a été impliquée dans la résistance au DDT (Ranson *et al.*, 2001; Riveron *et al.*, 2014). Il convient de noter que l'expression accrue de ces enzymes peut entraîner une détoxification d'une gamme plus large d'insecticides. Ces trois enzymes

de détoxification ont été surexprimées chez de nombreuses populations de *An. gambiae s.l.* au Bénin (Aïzoun *et al.*, 2013b ; Gnanguenon *et al.*, 2015) ces dernières années.

1.7.1.3. La résistance comportementale

La résistance comportementale se définit par des changements sélectionnés ou induits par le déploiement d'outils de lutte antivectorielle et qui permettent aux vecteurs d'éviter le contact avec les insecticides. Elle se traduit généralement par une exophagie accrue ou une zoophagie plus élevée ou un décalage des heures de piquê au moment où les populations ne sont pas protégées par les outils de lutte (Muirhead-Thomson *et al.*, 1960; Fornadel *et al.*, 2010; Moiroux *et al.*, 2012; Ojuka *et al.*, 2015). Les mécanismes impliqués dans cette résistance restent mal compris à l'heure actuelle malgré un récent regain d'attention de la part de la communauté scientifique (Carrasco *et al.*, 2019).

1.7.1.4. La résistance cuticulaire

Elle désigne l'ensemble des modifications qui surviennent au niveau de la cuticule et / ou du système digestif de l'insecte pour prévenir ou ralentir l'absorption ou la pénétration de l'insecticide. Ce type de résistance est le plus souvent décrit comme un mécanisme mineur de résistance. La cuticule est un milieu biologique complexe ayant des propriétés physico-chimiques particulières notamment une très forte lipophilie.

Des cas de résistance cuticulaire ont été rapportés dans les populations de *Musca domestica* (Plapp, 1984) et de moustiques du genre *Culex* (Apperson & Georgiou, 1975). Une augmentation de l'épaisseur de la cuticule des tarsi des moustiques ou une réduction de la perméabilité de cette couche externe de la peau de l'insecte aux insecticides pourrait avoir un impact considérable sur la biodisponibilité de l'insecticide *in vivo*. Deux gènes (*cplcg3* et *cplcg4*) ont été récemment identifiés après analyse par microarray et dont les produits d'expression sont impliqués dans la résistance cuticulaire. Ces gènes qui codent pour des protéines cuticulaires sont surexprimés chez les populations de *Anopheles gambiae* résistants aux pyréthrinoïdes (Awolola *et al.*, 2009).

Des études récentes ont également montré leur implication dans la résistance phénotypique de *An. funestus* et de *An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes (Wood *et al.*, 2010; Balabanidou *et al.*, 2016; Yahouédo *et al.*, 2017). Ce mécanisme de résistance à lui seul offre des niveaux de résistance faibles comparés aux autres mécanismes physiologiques. Lorsqu'il est combiné à des mécanismes de détoxification, il est susceptible de générer des niveaux de résistance beaucoup plus importants (Résistance multiplicative). Ainsi, il a été suggéré que ce phénomène pourrait en être impliqué et agirait de concert avec une augmentation de la résistance métabolique chez des moustiques du genre *Anopheles* résistants aux pyréthrinoïdes (Djouaka *et al.*, 2007 ; 2008 ; Vontas *et al.*, 2007).

1.8. Impact de la résistance sur les programmes de luttres contre *An. gambiae* s.l.

L'efficacité d'une méthode de lutte contre les vecteurs du paludisme et notamment *An. gambiae* est généralement évaluée sur le plan entomologique, et ensuite d'un point de vue épidémiologique (Fegan *et al.*, 2007).

Du point de vue entomologique, l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides, tant en zone sensible que résistante aux pyréthriinoïdes, a beaucoup été étudiée. Selon plusieurs auteurs (Chandre *et al.*, 2000; Corbel *et al.*, 2004), les moustiques résistants aux pyréthriinoïdes, moins sensibles à l'effet irritant, resteraient plus longtemps sur la moustiquaire et absorberaient en conséquence par contact tarsal une dose d'insecticide plus importante, ce qui expliquerait des taux de mortalité sensiblement identiques entre moustiques sensibles et moustiques résistants (Darriet *et al.*, 1998 ; Darriet *et al.*, 2000). Néanmoins en 2004, une étude rapporte une diminution de la mortalité d'individus homozygotes résistants pour le *Kdr* en contact avec des tissus imprégnés de pyréthriinoïdes (Corbel *et al.*, 2004). Plus récemment, une évaluation menée au Bénin a montré que l'efficacité des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine était considérablement réduite en zone de résistance (N'Guessan *et al.*, 2007a). Les résultats ont en effet montré que la mortalité induite par les MIILDs passait de 98% en zone sensible à 30% en zone résistante. Quant aux pulvérisations intradomiciliaires, de récents travaux menés au Bénin ont montré une réduction drastique des paramètres entomologiques de la transmission dans les zones de forte résistance aux pyréthriinoïdes (Akogbéto *et al.*, 2011 ; Aikpon *et al.*, 2014 ; Akogbéto *et al.*, 2015).

Du point de vue épidémiologique, l'impact des MIILDs a été démontré sur la prévalence et la morbidité liées au paludisme en Afrique (Carnevale *et al.*, 1991 ; Lyimo *et al.*, 1991 ; Lengeler *et al.*, 1996), mais aucune étude jusque là n'a clairement démontré une quelconque diminution de l'efficacité des moustiquaires imprégnées ou des pulvérisations intradomiciliaires due à des mécanismes de résistance sur ces indicateurs. Une étude réalisée au nord de la Côte d'Ivoire avec des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine sur une population de *An. gambiae* fortement résistante aux pyréthriinoïdes (fréquence du *Kdr* d'environ 90%) a permis de réduire la prévalence des porteurs asymptomatiques de 12 % pour une protection contre le paludisme estimée à 56%, i.e. réduisant de plus de deux fois le nombre d'accès palustres chez les enfants de moins de 5 ans (Henry *et al.*, 2005). Cette protection s'est avérée comparable à celle conférée par des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine dans une région de Sierra Leone où les populations anophéliennes étaient sensibles aux pyréthriinoïdes (Marbiah *et al.*, 1998).

Bien que ces résultats méritent d'être confirmés dans d'autres contextes entomologiques, la résistance des vecteurs aux insecticides pourrait s'avérer être un véritable obstacle au bon

fonctionnement des programmes de lutte contre le paludisme basés sur l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées et des pulvérisations intradomiciliaire.

1.9. Les stratégies de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides

Face à la menace du développement de la résistance des vecteurs aux insecticides et le nombre très limité d'insecticides utilisables en santé publique, la mise en place de stratégies de gestion de la résistance aux insecticides s'avère indispensable. En 2012, l'OMS a publié un plan de gestion de la résistance aux insecticides, le GPIRM (Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors) dans l'objectif ultime de maintenir l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle (WHO, 2012b). Ce plan fixe des priorités à court, moyen et long terme et repose sur cinq piliers :

- iii) Pilier I : planifier et appliquer des stratégies de gestion de la résistance aux insecticides dans les pays endémiques.
- iv) Pilier II : veiller au suivi entomologique en temps utile, à la surveillance de la résistance et à une gestion efficace des données.
- v) Pilier III : élaborer des outils novateurs de lutte antivectorielle.
- vi) Pilier IV : combler les lacunes de connaissances au niveau des mécanismes de résistance aux insecticides et de l'impact des stratégies actuelles de gestion de la résistance.
- vii) Pilier V : veiller à mettre en place des mécanismes (plaidoyer, ressources humaines et financières) créant des conditions favorables.

Quatre stratégies de gestion de la résistance des vecteurs des *Plasmodium spp.* aux insecticides ont été proposées par l'OMS :

- La rotation des insecticides : deux insecticides ou plus à modes d'action différents sont utilisés en alternance dans le temps (en général chaque année).
- Les mosaïques : deux insecticides ou plus à modes d'action différents sont utilisés selon une alternance spatiale. Un insecticide est utilisé contre les populations vectrices dans une zone alors qu'un autre insecticide est appliqué contre les vecteurs de la zone adjacente.
- Les mixtures : deux insecticides ou plus à modes d'action différents sont mélangés en une formulation.
- La combinaison d'interventions : deux interventions ou plus à base d'insecticides à mode d'action différents sont déployées simultanément dans une même zone.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Description de la zone d'étude

Toutes les études sur la transmission du paludisme, le comportement des moustiques et la résistance des vecteurs aux insecticides ont été menées majoritairement dans les départements de l'Alibori (Kandi, Gogounou et Ségbana), de la Donga (Djougou, Copargo et Ouaké) et en partie dans les départements de l'Atacora (Kouandé) et du Borgou (Bembèrèkè), au nord du Bénin en Afrique de l'Ouest. Les huit localités regroupées en quatre zones sanitaires, appartiennent à deux zones agro écologiques différentes. La zone sanitaire (Kandi- Gogounou- Ségbana) et la commune de Bembèrèkè, situées respectivement dans le département de l'Alibori et du Borgou appartiennent à la région de savane sèche alors que la zone sanitaire (Djougou, Copargo et Ouaké) (ZS-DCO) et la commune de Kouandé sont localisées respectivement dans le département de la Donga et dans l'Atacora, se situent entre les régions de savane sèche et humide (zone de transition) (figure 11). Les communes de Kandi, Gogounou, Ségbana, Djougou, Copargo et Ouaké ont été identifiées par le PNLP pour l'extension de la PID au Bénin. Deux communes appariées, ayant les mêmes caractéristiques écologiques que les localités d'extension de la PID ont été choisies pour servir de témoins après intervention: Kouandé pour la zone sanitaire (Djougou-Copargo-Ouaké) et, Bembèrèkè pour la zone sanitaire (Kandi-Gogounou-Ségbana).

L'activité économique dominante est l'agriculture caractérisée par la production du coton, du maïs, du sorgho, du petit-mil, du fonio et de l'igname. Les pratiques agricoles actuelles sont caractérisées par l'agriculture extensive, l'agriculture itinérante sur brûlis et l'utilisation des intrants agricoles (engrais et insecticides) afin d'accroître le rendement des productions.

Au plan sanitaire, l'incidence du paludisme simple et grave en 2016 était de 26,4% dans le département de la Donga et 13,3% dans l'Alibori (SGSI/DPP/MS, 2016).

Les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILDs) distribuées chaque 03 ans sur tout le territoire national constituent le principal moyen de protection contre les piqûres de moustiques dans les quatre départements. Cependant, chaque zone présente des caractéristiques spécifiques:

Zone sanitaire (Kandi-Gogounou-Segbana) (ZS- KGS) et la commune de Bembèrèkè

Elle couvre une superficie d'environ 12.943 Km² et constitue la plus grande zone sanitaire du Bénin avec une population estimée en 2013 à 325 522 habitants en majorité rurale. Elle est composée de trois communes : Kandi (11°07'29''N et 2°56'9''W), Gogounou (10°50'30''N et 2°50'20''W) et Segbana (10°32' et 11°23' de latitude Nord et 3°08' et 3°50' de longitude Est), situées au Nord-Est du Bénin (figure 11). Quant à la commune de Bembèrèké (10°13'30'' N et 02°40'05''W), située dans le département du Borgou, est limitée au Nord par la commune de Gogounou. Ces communes sont reconnues comme la zone cotonnière du nord Bénin. D'importantes quantités d'insecticides y sont donc utilisées afin de lutter contre les ravageurs du cotonnier. Son climat est de type soudanien avec deux saisons par an : une seule saison des pluies qui va de mai à octobre et une saison sèche de novembre à avril. La pluviométrie varie entre 700 mm et 1 200 mm avec de fortes précipitations enregistrées entre juillet et septembre. Pendant la saison sèche, l'harmattan, vent chaud et sec, souffre du nord-Est. Il est responsable de la baisse brutale de l'humidité relative à compter du mois de décembre. La température oscille entre 18°C et 45°C surtout en saison sèche. Les principaux types de sols sont ferrugineux tropicaux et sableux. Ce sont des sols ayant une profondeur plus ou moins importante; leur perméabilité et leur porosité sont généralement bonnes et favorisent l'infiltration rapide de l'eau après les pluies. La zone sanitaire KGS est traversée par les fleuves Alibori et Sota alors qu'à Bembèrèkè, on distingue deux cours d'eau qui sont des affluents du fleuve Ouémé auxquelles s'ajoutent de nombreuses sources qui ne résistent pas à la saison sèche. Le relief est dominé par les plateaux et les plaines. La végétation est constituée d'une savane arborée herbeuse fortement dégradée, arbustive et herbacée souvent clairsemée sous l'influence de l'agriculture.

Zone sanitaire Djougou-Copargo-Ouaké (ZS-DCO) et la commune de Kouandé

La zone sanitaire Djougou-Copargo-Ouaké couvre une superficie de 5.465 Km² avec une population estimée à 397 942 habitants. Cette zone est composée de trois communes : Djougou (09°42'10''N et 01°40'55''W), Copargo (09°50'19'' N et 01°32'39'' W) et Ouaké (09°40'45.3'' N et 01°22'51.7'' W), situées au Nord-Ouest du Bénin (figure 11). Quant à la commune de Kouandé (10°19'54'' N et 1°41'29'' W), située dans le département de l'Atacora, elle s'étend sur une superficie

de 4.500 km² et est limitée au sud par les communes de Copargo et de Djougou. Le climat dans les quatre communes est de type soudano-guinéen avec deux saisons. La saison des pluies s'étend sur 06 mois, de mi-avril à mi-octobre. La moyenne des précipitations se situe entre 1200 mm et 1300 mm. La température moyenne est d'environ 27°C. La zone sanitaire Djougou-Copargo-Ouaké est traversée par les fleuves Ouémé, Donga et Kéran et leurs affluents alors que le Mékrou est le cours d'eau le plus important qui arrose la commune de Kouandé. Les sols sont de texture argilo-sableuse ou latéritique (gravillonnaire ou caillouteux) globalement favorables à l'agriculture. Les principales cultures sont l'igname, les céréales et le coton.

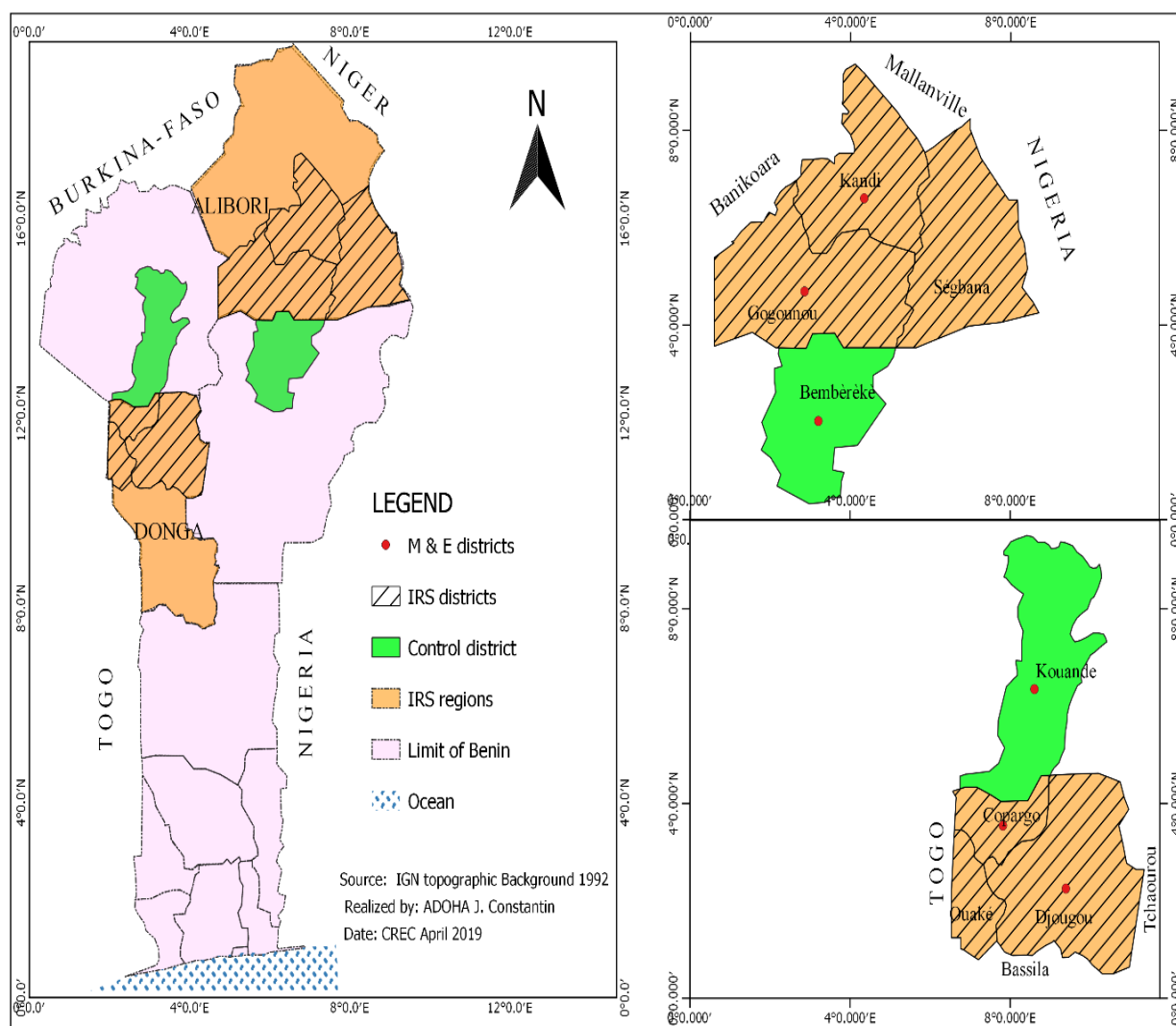


Figure 11 : Carte de la zone d'étude montrant les communes étudiées.

En 2016, avant la mise en œuvre de la PID, nous avons collecté les données entomologiques de base dans six communes des départements de l'Alibori et de la Donga. En 2017 et 2018, les six communes (Kandi, Gogounou, Ségbana, Djougou, Copargo et Ouaké) ont bénéficié de la campagne de PID. Pour la collecte des données au cours des deux années d'intervention, quatre communes traitées ont été retenues pour être évaluées (Kandi, Gogounou, Djougou et Copargo) et

deux communes témoin non traitées (Bembèrèkè et Kouandé) (Figure 11). Nous avons choisi comme témoin respectif pour les communes traitées dans la Donga (Djoungou et Copargo) et dans l'Alibori (Kandi et Gogounou), respectivement la commune de Kouandé située dans le département de l'Atacora, présentant les mêmes caractéristiques que les communes de la Donga et la commune de Bembèrèkè située dans le département du Borgou et ayant les mêmes caractéristiques que les communes de l'Alibori, mais où aucune maison n'a été traitée (Figure 11). Les données issues des communes sous traitement PID ont été comparées dans un premier temps aux données de base collectées en 2016 avant la PID, et dans un second temps à celles des zones témoin (Kouandé et Bembèrèkè). En 2017, a eu lieu la distribution universelle de moustiquaires imprégnées dans tout le pays, la seule différence en terme d'intervention de lutte entre les communes traitées et le témoin est la PID. Dans ces conditions, nous considérons que toute différence au niveau des paramètres entomologiques dans les communes traitées par rapport à aux communes témoins est imputable à la PID.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Dynamique des populations de *Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* et de la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga

Avant la mise en œuvre de la campagne PID dans l'Alibori et la Donga, nous avons réalisé une étude entomologique pour connaître les principaux moustiques, le niveau de la transmission du paludisme et la contribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* dans la transmission avant la campagne et vérifier si la zone d'étude remplit les conditions exigées par les critères entomologiques de la mise en œuvre de la PID.

2.2.1.1. Collecte des moustiques

La collecte des moustiques a été réalisée de mai 2016 à février 2017 dans les six communes des départements de l'Alibori et de la Donga avant le démarrage de la campagne de pulvérisation (Figure 11). Dans chaque commune, 2 villages, un au centre plus ou moins urbanisé, l'autre à la périphérie essentiellement rural, ont été choisis pour des captures mensuelles de moustiques réalisées de 21h à 5h du matin, a permis d'évaluer la fréquence du contact homme-vecteur (taux de piqure) dans quatre communes (Kandi, Gogounou, Djoungou et Copargo). A cet effet, quatre volontaires (02 à l'intérieur et 02 à l'extérieur) ont capturé les moustiques dans 02 maisons choisies au hasard par site, soit au total huit collecteurs/commune/par nuit (figure 12). Les collecteurs ont effectué une rotation dans les différentes maisons pour éviter les biais liés à leur habileté ou à leur attractivité individuelle. Les risques de souffrir du paludisme ont été minimisés en employant des

captureurs locaux (disposant déjà d'une certaine immunité en raison de leur exposition prolongée aux moustiques). Ils sont régulièrement surveillés et en cas d'accès palustre confirmé, ils sont immédiatement pris en charge par un médecin de l'équipe selon les procédures de prise en charge en vigueur. Ils sont tous vaccinés contre la fièvre jaune. L'étude a reçu l'accord du comité institutionnel d'éthique du CREC (IECC (N338/MS/DC/SGM/DRFMT/CREC/CEI-CREC/SA)).

La seconde méthode de collecte (capture matinale de moustiques après aspersion de bombe aérosol), réalisée très tôt le matin (entre 6h et 8h) dans 40 maisons par commune, a permis la collecte des moustiques au repos à l'intérieur des maisons (figure 12). Cette méthode a permis d'évaluer le comportement de repos et le taux de gorgement des vecteurs dans les six communes (Kandi, Gogounou, Ségbana, Djougou, Copargo et Ouaké).



A

B

Figure 12 : Capture de nuit sur appât humain (A) et collecte de moustiques après aspersion de bombe aérosol non rémanent (B).

2.2.1.2. Identification morphologique des espèces et traitement des moustiques

Après chaque collecte, les moustiques récoltés sont dénombrés et identifiés morphologiquement grâce à la clé taxonomique de Gillies & Meillon (1968) et de Gillies & Coetzee (1987). Les femelles de *An. gambiae* s.l. capturées sur appât humain sont ensuite disséquées pour évaluer leur âge physiologique grâce à l'observation du degré d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). Chaque spécimen est enfin conservé dans un tube à eppendorf étiqueté contenant du silicate gel pour des analyses de laboratoire.

Pour détecter l'infection au *Plasmodium falciparum*, toutes les têtes et thorax des femelles de *An. gambiae* s.l. capturées sur des volontaires humains ainsi que celles collectées après aspersion de bombe aérosol ont été analysées par ELISA CSP (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) selon

le protocole décrit par Wirtz *et al.* (1987). Les abdomens, pattes et ailes de l'ensemble des spécimens de *An. gambiae* s.l. analysés à l'ELISA CSP dans chaque commune, chaque mois, ont été analysés par PCR selon le protocole de Santolamazza *et al.* (2008), pour l'identification des espèces moléculaires du complexe.

Ces différentes activités ont permis l'étude de la dynamique des anophèles vecteurs et du *Culex quinquefasciatus*, le niveau de transmission du paludisme et la contribution des espèces du complexe *An. gambiae* dans la transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et la Donga avant la mise en œuvre de la PID.

2.2.1.3. Paramètres estimés

Les paramètres entomologiques évalués dans la présente étude sont les suivants: 1) le taux de piqûre sur homme (PHN) défini comme le nombre moyen de piqûres reçues/homme/nuit; 2) Indices d'endophagie et d'exophagie directement obtenus à partir des estimations des taux d'agressivité calculés à partir des captures sur volontaires humains à l'intérieur (i) et à l'extérieur (e) des habitations ; 3) le taux d'infection qui est la proportion de moustiques trouvés positifs à l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum*; 4) Le taux de parité déterminé en divisant le nombre de moustiques pares sur le total disséqué x 100; 5) le taux d'inoculation entomologique (TIE), variable clé exprimant le niveau de transmission du paludisme qui se définit comme le nombre de piqûres infectantes reçues/homme/nuit. Il est le produit du taux de piqûre et du taux d'infectivité ; 6) le taux de gorgement défini comme le nombre de moustiques gorgés et semi-gravides sur le total collecté après aspersion de bombe aérosol) et, 7) la proportion et l'infectivité de chaque espèce du complexe *An. gambiae* détectée.

2.2.1.4. Analyse des données

La richesse spécifique (Taxa_S), qui correspond au nombre d'espèces collectées, et leur abondance relative (P_i) ont été évaluées par localité: $P_i = n_i/N$, où n_i = nombre d'espèces i ; N = total du nombre d'espèces rencontrées, $i = 1$. L'indice de diversité de Shannon-Wiener = $-\sum (P_i \times \ln P_i)$ ou P_i est la proportion de l'espèce i dans la population étudiée a été déterminée par commune (Shannon, 1948). L'indice d'équitabilité a également été calculé. Il est le rapport entre l'indice de Shannon de l'échantillon et la valeur maximale que cet indice pourrait atteindre si toutes les espèces qui constituent l'échantillon y étaient également représentées. L'indice de Simpson (D), qui est un indice de dominance, a été déterminé selon la formule : $D = 1/\sum P_i^2$ (Simpson 1949). La comparaison des indices de diversité des espèces de moustiques a été faite en utilisant le test t de Student à l'aide du logiciel PAST 2.07.

Les données ont été analysées avec le logiciel de statistiques R, version 2.8. La méthode de calcul des intervalles de confiance de Poisson (Rothman, 2012) a été utilisée pour estimer les intervalles de confiance des taux d'agressivité (PHN) et des taux d'inoculation entomologique (TIE) *An. gambiae* s.l. Le test Khi2 de comparaison des proportions ont été utilisés pour comparer les taux d'infectivité, de gorgement et de parturité. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

2.2.2. Dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides chez *Anopheles gambiae* s.l. dans l'Alibori et la Donga, nord du Bénin, Afrique de l'Ouest.

2.2.2.1. Prospection des gîtes larvaires et élevage

Les larves et les pupes de *Anopheles gambiae* s.l. ont été collectées dans plusieurs gîtes identifiés dans quatre villages choisis au hasard par commune dans l'ensemble des six communes (Kandi, Gogounou, Ségbana, Djougou, Copargo et Ouaké). Une fois le gîte repéré, les larves et les nymphes sont prélevées à la surface de l'eau avec une louche, puis transportées vers l'insectarium aménagé sur le terrain pour l'élevage jusqu'au stade adulte (figure 13). Le nombre insuffisant de larves collectées à Ségbana et à Ouaké n'a pas permis de réaliser tous les tests.



A

B

Figure 13: Récolte (A) et élevage des larves et pupe (B) d'anophèles.

2.2.2.2. Tests de sensibilité OMS

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

✚ Pyréthrinoïdes : Deltaméthrine (0,05%), Perméthrine (0,75%) et (utilisés pour l'imprégnation des MIILDs) ;

✚ Pyréthrinoïdes + synergistes : Deltaméthrine 0,05% + PBO 4% et Perméthrine 0,75% + PBO 4% (utilisés pour l'imprégnation des MIILDs de nouvelle génération : Olyset plus et PermaNet 3) ;

✚ Carbamate : le bendiocarb (0,1%) (utilisé en PID) ;

✚ Organophosphoré : le pirimiphos-méthyl (0,25%) (utilisé en PID).

Le synergiste PBO (piperonyl butoxide) à 4% est un inhibiteur des oxydases et des estérases (Khot *et al.*, 2008). Il est utilisé afin d'évaluer l'implication des enzymes de détoxification dans la résistance phénotypique des populations de *An. gambiae* s.l. de chaque localité.

Lors des tests, des lots de 20 à 25 moustiques ont été introduits dans chaque tube muni d'un papier imprégné. Au cours de l'exposition qui a duré une heure, le nombre de moustiques tombés sous le choc de l'insecticide (effet knock-down) au bout de différents intervalles de temps (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutes) a été enregistré. Des lots de moustiques soumis aux papiers non imprégnés ont servi de contrôle. Les tests réalisés avec les papiers imprégnés de pyréthrinoïdes + synergistes PBO et ceux faits avec les pyréthrinoïdes seuls ont été effectués simultanément sur les mêmes populations de moustiques issues de chacune des localités. Après 60 minutes d'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes d'observation tapissée de papiers non traités (25°C et 80% d'humidité) avec un accès libre au jus sucré (jus de miel à 10%). La mortalité au bout de 24 heures a été déterminée selon le protocole de l'OMS. La résistance phénotypique aux insecticides a été évaluée par le taux de mortalité estimé comme suit : Taux de mortalité (%) = Nombre d'individus morts x 100 / Nombre d'individus testés.

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

Les vivants et les morts des spécimens de chaque localité issus des tests ont été soumis à la PCR pour l'identification des espèces et la détermination des mécanismes de résistance (*Kdr* et *Ace-1R*).

2.2.2.3. Identification des espèces au sein du complexe *An. gambiae* et caractérisation moléculaire de la résistance *Kdr* et *Ace-1*

Les moustiques vivants et morts issus des tests de sensibilité ont été analysés à la PCR (Polymerase Chain Reaction) selon le protocole de Santolamazza *et al.* (2008) pour la détermination des espèces moléculaires du complexe *An. gambiae* s.l. Les génotypes des mutations *Kdr* L1014F et *Ace-1* G119S ont été déterminés respectivement suivant les protocoles de Martinez *et al.* (1998) et de Weill *et al.* (2004). La fréquence allélique de ces deux mutations a été évaluée suivant la formule

suivante : $Fr(A) = (2NAA + NAa) / 2(NAA + NAa + Naa)$ sur chaque site afin de voir la corrélation existante avec la résistance phénotypique.

2.2.2.4. Caractérisation biochimique de la résistance

Environ 30 femelles de *An. gambiae* s.l. (F1) âgées de 2-5 jours issues de chaque localité et n'ayant préalablement servies à aucun test insecticide ont été utilisées pour les analyses biochimiques. Avant lesdites analyses, les spécimens de moustiques ont été tués au frais et immédiatement utilisés. Des dosages biochimiques ont été effectués pour comparer le niveau d'activité des oxydases à fonctions mixtes (MFO), des estérases non spécifiques (α et β -estérases) et des glutathion S-transférases (GST) sur ces différentes populations de moustiques par rapport à la souche sensible Kisumu (Bradford, 1976). Tous les moustiques ont été testés selon le protocole décrit par Hemingway (Hemingway *et al.*, 1998).

2.2.2.5. Analyses des données

Le statut de résistance des populations de moustiques testés est déterminé selon les critères de l'OMS (WHO, 2013). Pour cela, toute population de moustiques dont le taux de mortalité est compris entre 98-100% est considérée comme sensible. Quand la mortalité se trouve entre 90-97%, la population est suspectée de résistance. En deçà de 90% de mortalité, la population est considérée comme résistante. Les taux de mortalité des populations de *An. gambiae* s.l. ont été comparés à l'aide du test Khi2 de comparaison des proportions. Les fréquences alléliques des mutations *Kdr L1014F* et *Ace-1 G119S* ont été analysées pour évaluer la variabilité de la fréquence des mutations à travers les populations. Une régression linéaire avec analyse de la variance a été utilisée pour apprécier la variation de l'activité enzymatique dans chaque localité. Les Tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer l'activité des enzymes entre les moustiques de terrain et sensibles de laboratoire. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R 3.3.2 (R Development Core Team, 2011).

Après l'étude sur les données de bases, les résultats encourageants obtenus ont permis au PNLP de lancer la campagne de PID dans l'Alibori et la Donga

2.2.3. Impact entomologique de la pulvérisation intradomiciliaire

2.2.3.1. Mise en place des pulvérisations intradomiciliaires

Les études entomologiques de base réalisées en 2016 avant la mise œuvre de la PID ont permis de sélectionner un organophosphoré, le pirimiphos-méthyl pour réaliser la pulvérisation dans l'Alibori et la Donga, étant le seul insecticide au quel, les vecteurs ont montré une parfaite sensibilité (Salako *et al.*, 2018) (chapitre 2). Le pirimiphos-méthyl est un des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase qui

est une enzyme intervenant dans la régulation de l'influx nerveux. Ils agissent par contact et ingestion. La formulation utilisée pour traiter les murs a été l'Actellic 300 CS (Syngenta, Suisse) à base du pirimiphos-méthyl à 300 g/l (figure 14). Une dose de 1 g a.i./m² de l'Actellic 300 CS a été appliquée sur les murs, une fois chaque année. Pour parvenir à cette dose sur les murs, une bouteille d'Actellic® 300 CS (833 ml) a été diluée dans l'eau et le mélange d'un volume de 7,5l/pulvérisateur Goizper a été appliqué sur une surface d'environ 250 m². Les pulvérisations ont été faites par des opérateurs autochtones, recrutés et formés par le projet PMI VectorLink en collaboration avec le PNLP du Bénin. Ceux-ci étaient dotés d'équipement de protection (masque, chapeau, gants, lunettes, combinaison, bottes) nécessaire pour l'opération (figure 15). Les traitements ont été faits à l'aide d'un pulvérisateur Goizper, recommandé par l'OMS et actuellement utilisé par le projet PMI VectorLink, partenaires d'exécution de l'USAID. D'une capacité de 10 litres (dont 8 litres utile), le pulvérisateur Goizper permet de pulvériser à une pression de 3 BAR: 0,50 l/min (figure 16).

Avant les pulvérisations, les populations ont été informées et instruites quant aux précautions à prendre. Les principales précautions consistaient à sortir la nourriture, la vaisselle, les vêtements et les récoltes des maisons avant les pulvérisations. A la fin de chaque journée, les équipements de protection et le matériel utilisé ont été lavés dans les aires de lavage construites par le projet PMI VectorLink.

Les campagnes de pulvérisation ont lieu une fois l'an en début de saison pluvieuse dans le mois de mai. Plus de 85 % des ménages sont traités à chaque campagne.



Figure 14: Emballage de la formulation de pirimiphos méthyle utilisée (Actellic 300CS).



Figure 15: Pulvérisateur à pression de type Goizper et les opérateurs en accoutrements.



Figure 16: Un opérateur traitant un mur.

2.2.3.2. Résultats des opérations de pulvérisation de 2017 et 2018

En 2017, 419 785 structures étaient recensées dans six communes de l'Alibori et la Donga sur lesquelles 384 761 ont été traitées, soit un taux global de couverture de 91,7 %. Cette couverture a permis de protéger un total de 1 227 536 habitants dont 234 984 enfants de moins cinq ans et 46169 femmes enceintes. En termes de quantité d'insecticide utilisé pour cette campagne, un total de 79,968 bouteilles de 833 ml de Actellic 300 CS a été utilisé.

En 2018, sur les 442 548 structures recensées dans les mêmes communes, 400 997 étaient traitées soit un taux de couverture de 90,6%. Au total 1 321 758 personnes, dont 58,086 femmes enceintes et 269 164 enfants de moins cinq ans, ont été protégées par la campagne PID 2018. En termes de quantité d'insecticide utilisé pour cette campagne, un total de 62,873 bouteilles de 833ml de Actellic 300 CS a été utilisé.

2.2.3.3. Contrôle de la qualité du traitement et évaluation de l'activité résiduelle de Actellic 300 CS

La qualité du traitement et l'activité résiduelle de Actellic 300 CS sur les murs traités ont été évaluées après chaque campagne PID grâce aux tests en cône de l'OMS (WHO, 2006). Ce test a été réalisé avec des femelles de *An. gambiae* Kisumu (souche sensible de référence), élevée et maintenue à l'insectarium du Centre de recherche entomologique de Cotonou (CREC).

2.2.3.3.1. Tests en cône OMS sur des murs traités

En 2017 et en 2018, des tests en cônes OMS mensuels ont été réalisés respectivement dans les départements de la Donga et de l'Alibori sur les murs traités de 20 maisons sélectionnées au hasard. Les surfaces des murs non traités ont été utilisées comme témoin. Ces tests visaient non seulement l'évaluation de la qualité du traitement mais aussi le suivi de l'effet résiduel de Actellic 300 CS sur les murs traités. Les tests ont été réalisés sur les murs en ciment et en banco rencontrés dans la zone d'étude. Ainsi, 15 jeunes moustiques femelles âgés de 2 à 5 jours ont été délicatement prélevés à l'aide d'un aspirateur et introduits dans chacun des 03 cônes transparents fixés à des hauteurs différentes sur le support traité (0,5m ; 1m ; 1,5m) (figure 17). Ces moustiques restés en contact du support pendant 30 minutes ont ensuite été retirés avec précaution des cônes et transférés dans des gobelets stériles étiquetés et voilés sur lesquels sont posés des tampons de coton imbibés du jus sucré à 10%. Après 24 heures de mise en observation à 27 ± 2 °C (Température) et $80 \pm 10\%$ (Humidité relative), le taux de mortalité sur les différents types de murs traités a été déterminé (figure 17). Lorsque la mortalité du témoin est comprise entre 5% et 20%, la mortalité dans la case traitée est corrigée avec la formule d'Abott (Abbott, 1925). Lorsque la mortalité des témoins est supérieure à 20%, le test est considéré comme non valide et repris.

La réalisation des bioessais sur les supports traités a été échelonnée dans le temps suivant des périodes T0, T1, T2, T3, T4, T5 et T6 définies comme suit : T0 (mai) : 07 jours après la date de pulvérisation ; T1 (juin) : 1 mois après la date de pulvérisation ; T2 (juillet) : 2 mois après la date de pulvérisation ; T3 (août) : 3 mois après la date de pulvérisation ; T4 (septembre) : 4 mois après la date de pulvérisation ; T5 (octobre) : 5 mois après la date de pulvérisation et T6 (novembre) : 6 mois après la date de pulvérisation.



Figure 17: Test en cône sur les murs traités et mise en observation des moustiques pour une lecture après 24 heures.

2.2.3.4. Mesure de l'impact de la PID sur les indicateurs entomologiques du paludisme

Nous avons conduit les enquêtes entomologiques (Juin-Octobre 2017 ; Juin-Octobre 2018) pour évaluer l'efficacité de la PID sur la transmission des *Plasmodium spp.* Les méthodes de collecte des moustiques étaient les mêmes que celles utilisées pendant les enquêtes de pré-intervention.

Au laboratoire, les moustiques ont été analysés en suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour traiter les échantillons de pré-intervention. Les détails des protocoles utilisés se trouvent en Annexe 2.

2.2.3.5. Analyse des données

Les données ont été analysées avec le logiciel de statistiques R, version 2.8. La méthode de calcul des intervalles de confiance de Poisson (Rothman, 2012) a été utilisée pour comparer la densité résiduelle des moustiques et les taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. gambiae* s.l. Le test Khi2 de comparaison des proportions a été utilisé pour comparer les taux d'infectivité, de gorgement et de parturité.

Ces différents paramètres ont été comparés avant et après la PID d'une part puis, entre les zones traitées et témoins d'autre part.

2.2.3.6. Synthèse des activités de terrain

Pour conclure cette partie méthodologique du manuscrit, le chronogramme des activités de terrain que nous avons menées peut être résumé en trois volets : collectes de données entomologiques avant

les interventions (Mai 2016 à Février 2017), mise en place de la PID (Mai 2017 et 2018) et collectes de données après la PID (Juin 2017 à Décembre 2017 ; Juin 2018 à Décembre 2018).

3. RESULTATS

Première partie : Données de base

Chapitre 1. Dynamique des populations de *Anopheles gambiae* s.l et de *Culex quinquefasciatus*, de la transmission du paludisme et contribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* dans la transmission en prélude à la pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori et la Donga

1.1. Présentation de l'étude

La Pulvérisation Intradomiciliaire d'insecticide (PID) est l'un des piliers stratégiques dans la prévention du paludisme et autres nuisances occasionnées par les moustiques au Bénin. Cette intervention démarrée depuis 2008 au Bénin, a été un grand succès (Akogbéto *et al.*, 2011 ; Ossè *et al.*, 2012 ; Akogbeto *et al.*, 2015). Malgré ces succès, de grands défis restent à relever afin d'optimiser l'efficacité des outils de lutte antivectorielle dans l'optique de l'atteinte de l'un des objectifs fixés par l'OMS qu'est, l'élimination du paludisme à l'horizon 2030. Au nombre des leçons apprises après huit années d'intervention, figurent la disponibilité au préalable de données de bases solides qui doivent être désormais une priorité pour guider l'élaboration des politiques de lutte (Marsh, 2010).

En effet, la diversité des populations d'anophèles et leur répartition saisonnière sont des données essentielles dans l'évaluation du risque lié au paludisme. Cette répartition des espèces vectrices, de leur abondance et de leur survie déterminent l'intensité de la transmission du paludisme et dépendent des facteurs climatiques (la température et les pluies) et écologiques (Gemperli *et al.*, 2006 ; Mabaso *et al.*, 2007).

Au Bénin, depuis l'avènement de la PID, le suivi de son impact a été uniquement orienté sur le changement de comportement des anophèles vecteurs du paludisme. Or, les moustiques du genre *Culex*, en particulier *Culex quinquefasciatus*, sont des moustiques de forte nuisance mais négligés dans les évaluations entomologiques. En raison de leur forte résistance aux insecticides (Yadouleton *et al.*, 2015), ils pourraient même être à la base de l'échec de certaines interventions de lutte antivectorielle. Par ailleurs, *Culex quinquefasciatus* est un important vecteur de la filariose lymphatique (*Wuchereria bancrofti*) (Maxwell *et al.*, 1990). Les interventions de lutte antivectorielle ont certainement un impact sur ces moustiques (Hougard *et al.*, 1993) qui sont souvent négligés. Bien que n'étant pas un problème de santé publique au Bénin, la nuisance, voire le stress quotidien occasionnés par les piqûres de *Culex* constitue un facteur important (Viniaker & Lavaud, 2005).

En 2017, il était prévu que toutes les maisons des départements de l'Alibori et de la Donga soient traitées. Cependant, très peu d'informations de base étaient disponibles sur le comportement des principaux moustiques, la densité et la répartition des anophèles vecteurs et, le niveau et le pic de transmission du paludisme dans les deux régions. Les deux régions étant situées dans deux zones éco-géographiques différentes (zone soudanienne dans l'Alibori et soudano-guinéenne dans la Donga) malgré leur proximité, il est possible que les variations de l'écologie des vecteurs affectent la micro-épidémiologie du paludisme (Mouchet *et al.*, 2004). En prélude à cette campagne de lutte, la présente étude a été donc initiée pour disposer dans un premier temps d'informations sur la distribution et le comportement de piqûre des deux principaux moustiques vecteurs rencontrés au

Bénin : *An. gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* et leurs variations saisonnières (**Article 1**). Dans un second temps, l'estimation des paramètres entomologiques clés de la transmission du paludisme, en particulier, l'indice sporozoïtique (IS) et le taux d'inoculation entomologique (TIE), ont permis d'assurer la programmation efficiente ainsi que, la mesure de l'impact de l'intervention (**Article 2**). Le comportement de piqûre et, la contribution à la transmission du paludisme des espèces jumelles du complexe *An. gambiae* présentes et vivant en sympatrie dans les deux régions cibles ont été évaluées (**Article 3**). Les données relatives à ce chapitre sont présentées en détails dans les articles 1, 2 et 3 suivant un ordre chronologique. Les points essentiels relatifs aux résultats ont fait l'objet d'une discussion générale.

1.2. Dynamique des populations de *Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* en milieu rural et urbain dans l'Alibori et la Donga dans le nord du Bénin.

Publié à *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*

Dans cette rubrique, nous avons donné quelques informations relatives à la distribution et au comportement de piqûre des deux principaux moustiques vecteurs rencontrés au Bénin : *An. gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* et, leurs variations saisonnières. Une brève synthèse de l'étude est fournie et, l'article correspondant est joint immédiatement à la page suivante.

1.2.1. Contexte de l'étude

Malgré l'impact positif des interventions de lutte antivectorielle en Afrique, de grands défis restent à relever pour améliorer davantage leur performance. En effet, certains pays mettent en œuvre des interventions de lutte sans disposer au préalable des données de base relatives à la dynamique et au comportement des vecteurs. Pour pallier à cette insuffisance, la présente étude vise à collecter des données de bases suffisantes, afin de guider la mise en place de la PID et, faciliter l'évaluation de son impact.

1.2.2. Objectifs de l'étude

Cette étude vise à apporter des informations sur la diversité des *Culicidae*, le comportement de piqûre et la variation spatio-saisonnière de l'abondance de *Anopheles gambiae* s.l. (vecteur majeur du paludisme) et de *Culex quinquefasciatus* (vecteur de *Wuchereria bancrofti* et moustique de forte nuisance) en milieux rural et urbain des départements de l'Alibori et de la Donga où une campagne de Pulvérisation intradomiciliaire (PID) est programmée.

1.2.3. Méthodologie

L'étude a été réalisée dans six communes des deux régions situées au Nord du Bénin (Alibori et Donga). Les captures sur appât humain (HLC) à l'intérieur et à l'extérieur des habitations et après asperersion de bombe aérosol (PSC) dans les chambres ont été utilisées pour l'échantillonnage des populations de moustiques de mai 2016 à février 2017. Après identification morphologique de tous les spécimens de moustiques, le comportement de piqure et la variation saisonnière de la densité de *Anopheles gambiae* s.l. et *Culex quinquefasciatus* ont été étudiés. La Polymérase Chain Reaction (PCR) a été également effectuée sur *An. gambiae* s.l., afin d'identifier les espèces jumelles et leurs variations saisonnières.

1.2.4. Résultats & et principaux points discutés

Environ 10 367 moustiques ont été collectés dans la zone d'étude. Au total 14 espèces de moustiques appartenant à 04 genres (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*) ont été identifiées. Deux principaux vecteurs du paludisme avaient été rencontrés: *Anopheles gambiae* s.l. qui représentait 40,39% (4187/10367) des moustiques et, *Anopheles funestus* (0,98%: 102/10367). *Culex quinquefasciatus* était le principal moustique collecté (56,85% : 5893/10367).

An. gambiae s.l. était plus abondant dans le département de la Donga (2521 spécimens) que dans l'Alibori (1666 spécimens). La tendance inverse a été observée avec *Culex quinquefasciatus* (2162 spécimens dans la Donga contre 4028 dans l'Alibori). Une prédominance de *An. gambiae* s.l. ayant un fort taux de gorgement en zones rurales comparativement aux zones urbaines, a été observée. Par contre, *Cx. quinquefasciatus* était majoritaire en zones urbaines dans les deux régions.

Le complexe *An. gambiae* était composé de deux espèces jumelles : *An. coluzzii* [56% (n=835)] majoritaire pendant la sécheresse, et *An. gambiae* [44% (n=662)] prédominant pendant la saison des pluies.

1.2.5. Conclusion

Le caractère endophagique marqué de *An. gambiae* s.l. est un atout pour la Pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide à effet rémanent (PID) dans la zone d'étude. La prédominance de *An. gambiae* s.l. pendant la saison pluvieuse est favorable à une PID programmée au début de la saison, contrairement à *Cx. quinquefasciatus* qui prédomine en saison sèche, période au cours de laquelle l'effet résiduel de la PID est généralement terminé.

Population Dynamics of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in Rural and Urban Settings Before an Indoor Residual Spraying Campaign in Northern Benin

Albert Sourou Salako,^{1,2} Razaki Ossè,^{1,3} Gil G. Padonou,^{1,2} Fortuné Dagnon,⁴ Rock Aikpon,^{1,5} Casimir Kpanou,^{1,2} Hermann Sagbohan,^{1,2} Arthur Sovi,¹ Michel Sèzonlin,² and Martin C. Akogbeto^{1,2}

Abstract

Background: The purpose of this report is to provide information on Culicidae diversity; biting behavior and spatio-seasonal variation of abundance of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* in rural and urban settings of the Alibori and Donga regions, Northern Benin, where an indoor residual spraying (IRS) campaign to control malaria is planned.

Methods: Both human landing catches, associated with pyrethrum spray catches were used to monitor the mosquito populations in 12 sites with 1 urban and 1 rural located in each of the 6 districts randomly selected in the two targeted regions. After morphological identification of all mosquito specimens, biting behavior and density of *An. gambiae* s.l. and *Cx. quinquefasciatus* were studied. PCR was also performed on *An. gambiae* s.l., to identify sibling species and its seasonal variation.

Results: A total of 10,367 mosquitoes were captured, related to 14 species of the genera, *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* and *Mansonia*. Of the total species collection, 40.39% were *An. gambiae* s.l. and 56.85% were *Cx. quinquefasciatus*. *An. gambiae* s.l. was more abundant in Donga (2521 specimens) compared with Alibori (1666 specimens). The opposite trend was observed with *Cx. quinquefasciatus* (2162 specimens in Donga against 4028 in Alibori). *An. gambiae* s.l. was predominant and displayed a higher blood feeding rate in rural areas, whereas *Cx. quinquefasciatus* was in majority in urban areas. *An. gambiae* s.l. was more endophagic, whereas *Cx. quinquefasciatus* showed similar indoor and outdoor biting behavior. *An. gambiae* s.l. was composed of *An. coluzzii* found in majority in the drought, and *An. gambiae*, which was predominant in the rainy season.

Conclusion: The predominance of the malaria vector, *An. gambiae* s.l. and their higher blood feeding rate and their significantly high endophagy in rural areas indicate that these areas should be primarily targeted with the IRS operations to have a substantial impact on malaria transmission. Endophagy, characteristic of *An. gambiae* s.l. in our study area, suggests that IRS will have a positive impact on vector control if implemented 1 week before June that is the onset of the rainy season.

Keywords: *Anopheles gambiae* s.l., *Culex quinquefasciatus*, biting behavior, seasonal variation, Alibori, Donga, Benin

Background

IN PUBLIC HEALTH, mosquitoes are considered as one of the most important groups of arthropods (Schaffner et al. 2001, Becker et al. 2010). Those belonging to the *Anopheles*,

Culex, and *Aedes* genera, are the most studied because of their role in the transmission of a variety of human and animal diseases. According to the World Health Organization (WHO 2014), vector-borne diseases account for 17% of the estimated global burden of all infectious diseases; the main

¹Vector Ecology Department, Center for Research in Entomology of Cotonou, Cotonou, Benin.

²Department of Zoology, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey Calavi, Abomey Calavi, Benin.

³Laboratory of Animal and Fishery Sciences, School of Management and Exploitation of Livestock Systems, National University of Agriculture, Ketou, Benin.

⁴U.S. President's Malaria Initiative, US Agency for International Development, Cotonou, Benin.

⁵Biology Department, Superior Normal School, National University of Sciences, Technology, Engineering and Mathematics, Abomey, Benin.

vector-borne disease in West Africa being malaria. In Benin, *Anopheles gambiae* s.l. is the major vector of malaria (Akogbeto 1992, Akogbeto and Di Deco 1995), which is the leading cause of morbidity and mortality in children under 5 years old (Ministère de la Santé/DPP 2013).

Long-lasting insecticidal nets (LLINs) massively distributed in the country in 2014 and indoor residual spraying (IRS) remain the strategic pillars in the prevention of malaria in Benin. In 2008, IRS was introduced in the Oueme department, Southern Benin with a carbamate insecticide (Bendiocarb) as the high pyrethroid resistance observed in malaria vectors (Akogbeto and Yacoubou 1999) has reduced the efficacy of standard LLINs (N'guessan et al. 2007). The strategy which displayed a great success (Akogbeto et al. 2011, 2015, Osse et al. 2012) was then relocated in the Atacora department, northern Benin from 2011 to 2015.

The technical rationale for this relocation was the short transmission period that can be easily covered by a single spray round in the new targeted department, allowing a better cost effectiveness. IRS success has also been recorded in other countries, namely Madagascar (Randriantsimaniry 1995), Equatorial Guinea (Bioko Island) (Sharp et al. 2007) and Southern Africa (Sharp et al. 2000, Mabaso et al. 2004). Despite these successes, major challenges remain, including the fact that some countries implement vector control interventions without reliable baseline on entomological data. Indeed, those data are necessary as they allow national malaria control program to know the exact places where vector biting rates or malaria transmission are high and also, the right moment for the implementation of a control intervention such as IRS to have the maximum impact on the peak in biting of malaria vectors.

For that, the availability of sufficient entomological baseline data should be a priority to guide the development of vector control policies (Marsh 2010). Success in the planning, implementation, and evaluation of vector control interventions depends on the knowledge of spatial and temporal variation of disease vectors (Killeen et al. 2011).

In Benin, since the advent of IRS, the monitoring of its impact has focused solely on the behavioral change of *Anopheles*, vectors of malaria (Akogbeto et al. 2011, 2015, Osse et al. 2012). However, *Culex quinquefasciatus*, which is a vector of lymphatic filariasis (*Wuchereria bancrofti*) (Maxwell 1990), have been neglected in entomological evaluations. Although high resistance to insecticides (Yadouleton et al. 2015) has been detected in *Cx. quinquefasciatus*, some authors have reported that some strategies could have a positive impact on the control of this mosquito (Hougard et al. 1993). So far, lymphatic filariasis has not been a public health problem in Benin, but the nuisance and even the daily stress caused by *Culex* bites are important factors that should not be neglected (Viniaker and Lavaud 2005).

In 2017, an IRS campaign with Actellic 300CS was planned to target the Alibori and Donga regions. As a prelude to this control campaign, this study was initiated in some urban and rural sites of the targeted regions to obtain information on the distribution, density, biting behavior, and seasonal variations of *An. gambiae* s.l., main malaria vector (Akogbeto 1992, Akogbeto and Di Deco 1995) and *Cx. quinquefasciatus*, mosquito of high nuisance (Agbanrin et al. 2015) in Benin.

Materials and Methods

Study area

Data collection took place in six districts located in two regions: the Kandi, Gogounou and Segbana (KGS) districts in the Alibori region, then the Djougou, Copargo and Ouake (DCO) districts in the Donga region. The Alibori region is characterized by a Sudanese climate and the Donga region by a Sudano-Guinean climate. Both regions have a single dry season (December to May) and a single rainy season (June to November). Overall, the average monthly temperature varies between 23°C and 40°C. The region of Donga has more rivers than the region of Alibori. The DCO and KGS health zones cover an area of 5465 km² and 12,943 km² with a population of 424,425 and 325,522 inhabitants, respectively, mostly farmers. The incidence of malaria was 21.4% in the DCO health zone and 19.4% in the KGS health zone (SGSI/DPP/Zs-DCO/MS 2016) (SGSI/DPP/Zs-KGS/MS 2014).

In the current study, one urban and one rural sites were selected in each district for the monthly collections of mosquitoes. Urban sites have several development infrastructures, such as gutters, sewers, and roads, unlike rural sites that do not have. Urban/Rural villages were Bantansoue/Gounarou, Kossarou/Sonsoro, Segbana-Centre/Liboussou, Parakounan/Kataban, Zountori/Barienou, and Aboulaoude/Komde, respectively, in the districts of Gogounou, Kandi, Segbana, Copargo, Djougou, and Ouake (Fig. 1).

Mosquito sampling

Human landing catches (HLCs) were conducted in two houses per village from 9 PM to 5 AM for two nights per month over 7 months (May 2016 to February 2017, with no data collected in September, November, and December 2016) to monitor the mosquito populations. At each house, one indoor mosquito collector and one outdoor mosquito collector collected all mosquitoes that landed on their feet (World Health Organization 1993). The number of collectors and the number of sessions were the same for all surveyed districts in each month. In each district, recorded data were used to evaluate the mosquito species composition and to determine the human biting rate (HBR) of *Anopheles* and *Cx. quinquefasciatus*.

In addition, pyrethrum spray catches (PSCs) were performed, as described by WHO 1993 for 20 rooms (10 in the urban site and 10 in the rural site) per month over the same 7 months to assess the resting behavior and the vectors' blood feeding rate in each of the six districts. The number of sessions and of investigated rooms were the same for all surveyed districts in each month. PSCs consisted of covering the floor with white sheets, spraying the rooms and collecting all fallen mosquito specimens. After collection, mosquitoes were counted and morphologically identified.

Processing methodology

After each collection, collected mosquitoes were counted and separated into Culicinae and Anophelinae using a stereomicroscope. Mosquitoes were identified using the taxonomic keys of Gillies and De Meillon (1968) and Gillies and Coetzee (1987). Specimens of *An. gambiae* s.l. were separated for further molecular analyses.

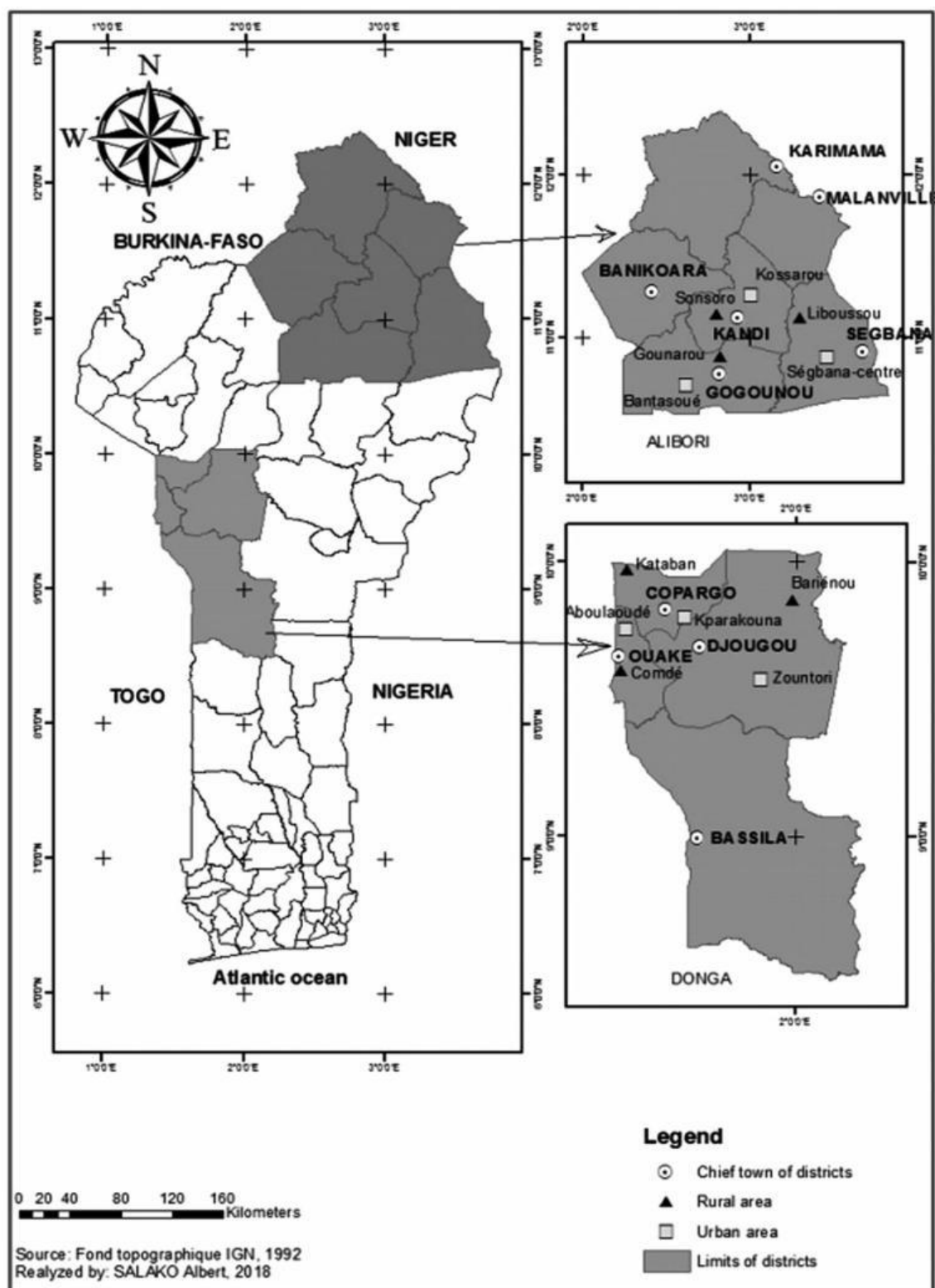


FIG. 1. Map showing the study area.

A sample of 8–68 female specimens of *An. gambiae* s.l., randomly sampled per district per month, bringing to a total number of 111–350 over the study period according to the district, was analyzed by PCR according to the protocol of Santolamazza et al. (2008) for the determination of the molecular species of the *An. gambiae* complex. Thus, specific primers (F6: TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA and R6: CGC TTC AAG AAT TCG AGA) were used. The reactions were carried out in a total volume of 25 μ L containing 10 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of $MgCl_2$, 1 U of Taq polymerase and 0.5 μ L of the template DNA.

The thermocycler conditions were 94°C for 5 min (step 1), followed by 35 cycles (94°C for 30 s [step 2], 54°C for 30 s [step 3], 72°C for 1 min [step 4]), and 72°C for 7 min (step 5). The products resulting from the amplification were analyzed on a 1.5% gel stained with ethidium bromide.

Data analysis

Species Richness (S), which corresponds to the number of collected species, and their relative abundance (P_i) were assessed ($P_i = n_i/N$, where n_i = number of species i ; N = total number of species encountered, $i = 1$) by district.

The Shannon–Wiener index (H) shows that the species diversity was determined by district using the formula $H = -\sum P_i \times \log(P_i)$ (Shannon 1948).

The equitability index was also calculated. It equals to the ratio of the Shannon index to the maximum value that this index could attain if all species in the district were represented in similar proportions.

The Simpson index (D), which is a dominance index was determined according to the formula: $D = 1/\sum P_i$ (Simpson 1949).

The HBR for *An. gambiae* or *Cx. quinquefasciatus* was calculated as the number of collected mosquito species divided by the number of collectors and of nights of sampling effort. The mean indoor resting density of *An. gambiae* s.l. was determined by the following way: The total number of vectors collected by PSC/Total number of rooms surveyed. The Poisson method (Rothman 2012) was used to estimate confidence intervals for biting rates and compare them between districts, urbanization level (rural and urban), and location (indoors and outdoors). The same method was also used to compare the average indoor resting densities between rural and urban areas. Densities of *An. gambiae* (s.l.) with different superscripts (a, b) are significantly different ($p < 0.05$).

The abundance of a given species of mosquito was obtained by cumulating its total number obtained through both HLC and PSC. To assess the spatiotemporal variation of this indicator, it was blot versus monthly rainfall data obtained from Agence pour la Sécurité de la Navigation aérienne en Afrique et à Madagascar (ASECNA) using an excel spreadsheet.

The blood feeding rate of *An. gambiae* s.l. was obtained by dividing the number of fed and half gravid mosquitoes by the total number of collected mosquitoes. The chi-squared test of comparison of proportions was used to compare the proportions of sibling species of the *An. gambiae* complex on one hand, and the blood feeding rates of *An. gambiae* (s.l.) between the rural and urban areas on the other hand, using the R software, version 3.3.2.

Ethics approval

This study was approved by the Institutional Ethics Committee of CREC (IECC) (N°338/MS/DC/SGM/DRFMT/CREC/CEI-CREC/SA).

Mosquito collectors were regularly monitored. In case of confirmed malaria, they were immediately taken care of by the medical doctor of the team according to protocol.

Results

Mosquito species composition

A total of 10,367 mosquitoes were captured during the study period in the six districts using both HLC and PSC. The mosquitoes belonged to 4 genera (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*) and 14 species. Overall, seven *Anopheles* species were harvested, including the two main malaria vectors: *An. gambiae* s.l. (40.39%) and *An. funestus*: (0.98%) (Table 1). As shown by the Table, the other species of *Anopheles* captured included *An. nili* (0.01%), *An. pharoensis* (0.03%), *An. ziemanni* (0.02%), *An. paludis* (0.01%) and *An. coustani* (0.09%) (Table 1).

Cx. quinquefasciatus was collected at high densities (56.85%) unlike other *Culex* species, such as *Cx. nebulosus* and *Cx. decens*. *Cx. quinquefasciatus* was the most captured mosquito species in Segbana (81.15%), Gogounou (75.71%), Kandi (56.76%), Ouake (55.72%), and Djougou (49.53%). *Mansonia africana* was also collected in most districts but at very low frequency (0.22% on overall) (Table 1).

The species richness observed at Copargo (11 species) is similar to that of Kandi (10 species), Gogounou (9 species), Djougou (8 species), Segbana (7 species), and Ouake (6 species) ($p > 0.05$).

The Shannon–Wiener index was 0.89 [0.87–0.92] in the DCO health zone against 0.69 [0.68–0.72] in the KGS health zone ($p < 0.05$). The Simpson indices were 0.56 [0.53–0.58] and 0.43 [0.42–0.44], respectively, in the DCO health zone and the KGS health zone.

Monthly variation of abundance of *An. gambiae* s.l. and *Cx. quinquefasciatus* in Alibori and Donga

An. gambiae s.l. and *Cx. quinquefasciatus* were present permanently throughout the study period in Alibori and Donga regions, but the abundance of both species varied seasonally. The density of *An. gambiae* s.l. was more abundant during the rainy months in the two regions with a single peak in Alibori (October) compared with two peaks in Donga (July and August). Conversely, the density of *An. gambiae* s.l. was relatively low from January to May during the drought and the Harmattan period (Fig. 2). For *Cx. quinquefasciatus*, the period of highest density coincided with the driest and warmest months, whereas the period of lowest density corresponded with the rainy months.

Spatiotemporal distribution of species of the *An. gambiae* s.l. complex

Out of the 1497 specimens of *An. gambiae* s.l. analyzed by PCR, two sibling species were observed: *An. coluzzii* (56%, $n=835$) and *An. gambiae* (44%, $n=662$) ($p=0.0000324$). The distribution of these species varied in time and space (Fig. 3). Overall, in Alibori (KGS combined), 69% (452/658)

TABLE 1. MOSQUITO SPECIES COMPOSITION AND DENSITY IN THE STUDY SITES WITH THE TWO COLLECTION METHODS
(HUMAN LANDING CATCH AND PYRETHRUM SPRAY CATCH METHODS)

Species	Donga region						Alibori region											
	Djougou		Copargo		Ouake		Total Donga		Kandi		Gogounou		Segbana		Total Alibori		Total	
	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)	ni	Pi (%)
<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	1087	46.14	1188	76.74	246	36.07	2521	54.97	869	41.80	649	22.62	148	17.77	1666	28.82	4187	40.39
<i>Anopheles funestus</i>	60	2.55	8	0.52	27	3.96	95	2.07	4	0.19	1	0.03	2	0.24	7	0.12	102	0.98
<i>Anopheles nili</i>	0	0	0	0	1	0.15	1	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.00	1	0.01
<i>Anopheles pharoensis</i>	0	0	2	0.13	0	0	2	0.04	0	0	1	0.03	0	0	1	0.02	3	0.03
<i>Anopheles ziemanni</i>	0	0	1	0.06	0	0	1	0.02	1	0.05	0	0	0	0	1	0.02	2	0.02
<i>Anopheles coustani</i>	1	0.04	8	0.52	0	0	9	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.09
<i>Anopheles paludis</i>	0	0	1	0.06	0	0	1	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
<i>Aedes aegypti</i>	14	0.59	8	0.52	5	0.73	27	0.59	11	0.53	15	0.52	2	0.24	28	0.48	55	0.53
<i>Aedes vittatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.05	0	0	0	0	1	0.02	1	0.01
<i>Aedes luteocephalus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.05	1	0.03	0	0	2	0.03	2	0.02
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1167	49.53	319	20.61	380	55.72	1866	40.69	1180	56.76	2172	75.71	676	81.15	4028	69.68	5893	56.85
<i>Culex gr decens</i>	3	0.13	1	0.06	0	0	4	0.09	1	0.05	3	0.10	1	0.12	5	0.09	9	0.09
<i>Culex nebulosus</i>	17	0.72	9	0.58	23	3.37	49	1.07	8	0.38	18	0.63	3	0.36	29	0.50	78	0.75
<i>Mansonia Africana</i>	7	0.3	3	0.19	0	0	10	0.22	3	0.14	9	0.31	1	0.12	13	0.22	23	0.22
Total	2356	100	1548	100	682	100	4586	100	2079	100	2869	100	833	100	5781	100	10367	100
Taxas_S	8		11		6		12		10		9		7		11		14	
Shannon diversity index	0.89		0.67		0.98		0.89		0.77		0.64		0.54		0.69			
	[0.86–0.92]		[0.63–0.72]		[0.92–1.04]		[0.87–0.92]		[0.75–0.80]		[0.61–0.67]		[0.49–0.59]		[0.68–0.72]			
Simpson's dominance	0.54		0.37		0.56		0.53		0.5		0.38		0.31		0.43			
	[0.53–0.54]		[0.34–0.39]		[0.53–0.58]		[0.52–0.54]		[0.49–0.51]		[0.36–0.39]		[0.28–0.34]		[0.42–0.44]			
Equitability Index	0.43		0.28		0.55		0.36		0.34		0.29		0.28		0.29			
	[0.42–0.44]		[0.26–0.30]		[0.52–0.58]		[0.35–0.37]		[0.33–0.35]		[0.28–0.31]		[0.26–0.32]		[0.28–0.3]			

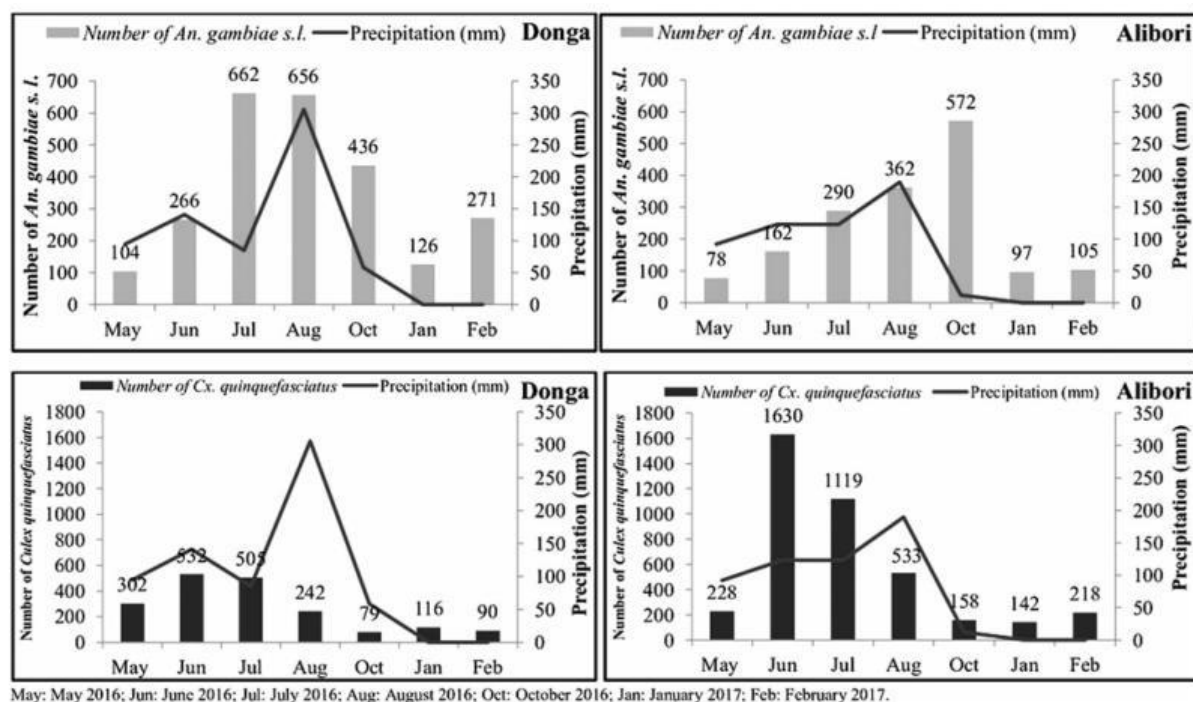


FIG. 2. Spatiotemporal distribution of abundance of *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* according to the rainfall in Alibori and Donga

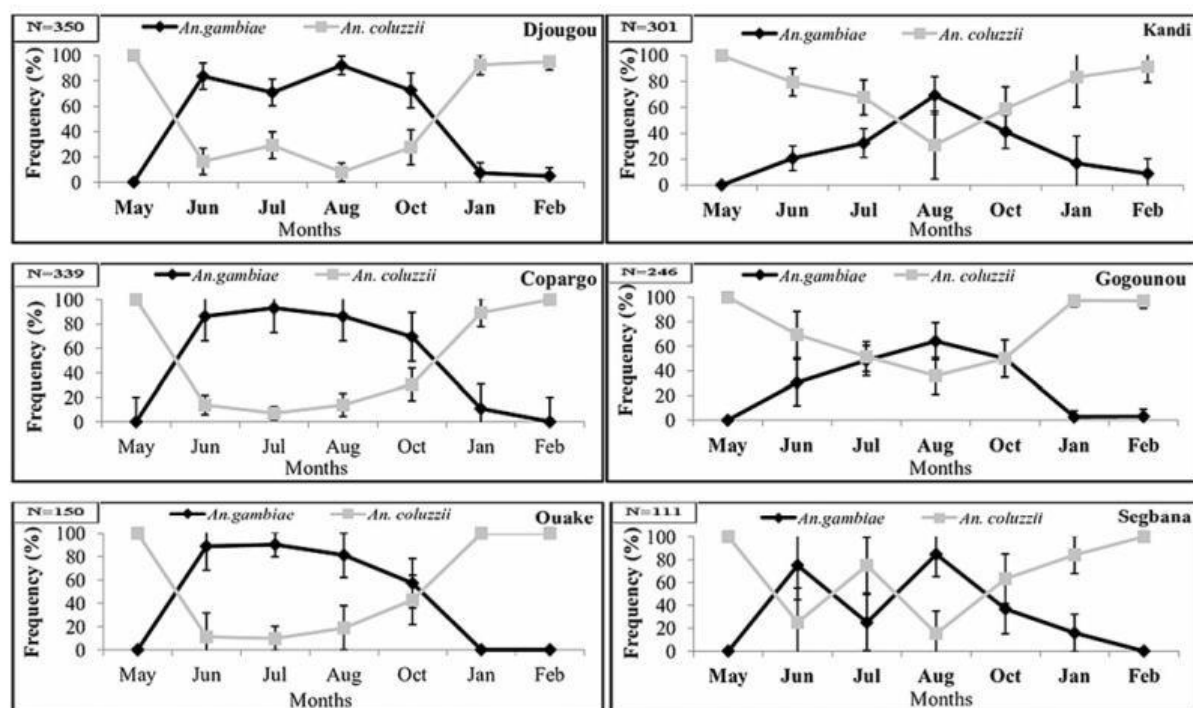


FIG. 3. Spatiotemporal distribution of species of the *Anopheles gambiae* s.l. complex in Alibori and Donga.

TABLE 2. VARIABILITY OF *ANOPHELES GAMBIAE* S.L. BITING RATE

Variables	Modality	Total of <i>Anopheles gambiae</i> s.l. collected	Nb of collectors	HBR	HBR/month	95% CI [HBR]
Donga	Djougou	682	104	6.56	196.73	[6.07–7.07]
	Copargo	782	104	7.52	225.57	[7.00–8.07]
Alibori	Kandi	498	104	4.78	143.65	[4.37–5.22]
	Gogounou	458	104	4.4	132.11	[4.00–4.83]
Urbanization level	Urban area	459	208	2.20	66.2	[1.99–2.39]
	Rural area	1961	208	9.42	282.83	[9.01–9.85]
Location	Indoor	1326	208	6.37	191.25	[6.03–6.72]
	Outdoor	1094	208	5.25	157.78	[4.95–5.58]

Nb, number; HBR, human biting rate; CI, confidence intervals.

of specimens were *An. coluzzii* and 31% ($n=206/658$) were *An. gambiae* ($p=0.00000022$). In Donga (DCO cumulated), 54% ($n=456/839$) of specimens were *An. gambiae* and 46% ($n=383/839$) were *An. coluzzii* ($p=0.00043$). Both species were present throughout the study period, except between January and February when *An. gambiae* was not found in most of the surveyed districts (Fig. 3). *An. coluzzii* predominated during the dry season (Periods May to June and February to January), whereas *An. gambiae* predominated from June to October (rainy season) (Fig. 3).

HBR of *An. gambiae* s.l.

The HBR of *An. gambiae* s.l. varied significantly from one region to another ($p<0.001$) with 132–143 bites/man/month in Alibori and 196–225 bites/man/month in Donga (Table 2). Overall, the HBR was four times higher in rural areas than in urban areas (rate ratio=4.27; $p<0.001$) and was higher indoors (191.25 bites/man/month) than outdoors (157.78 bites/man/month) ($p=0.0000002$) (Table 2).

HBR of *Cx. quinquefasciatus*

The HBR of *Cx. quinquefasciatus* was higher in Gogounou, Kandi (Alibori region), and Djougou (Donga region) (Table 3). Contrary to *An. gambiae* s.l., the HBR of *Cx. quinquefasciatus* was significantly higher in urban areas than in rural areas ($p<0.001$) with 291 bites/man/month in urban areas compared with 128 bites/man/month in rural areas. Moreover, this species exhibits similar biting behavior indoors (201.63 bites/man/month) and outdoors (217.78 bites/man/month) with an endophagic index of 0.48 [(1398)/(1398+1510)] against an exophagic index of 0.52 [(1510)/(1398+1510)] (Table 3).

Blood feeding rate, indoor resting density of *An. gambiae* s.l.

Table 4 shows the blood feeding rate and the indoor resting density of *An. gambiae* s.l. in rural and urban areas of the Alibori and Donga regions.

Overall, cumulated data show that vector density was higher in rural than in urban areas in each of the two regions (2.3 *An. gambiae* s.l./room vs. 0.56 in Donga [$p=0.000$] and 1.35 *An. gambiae* s.l./room vs. 0.49 in Alibori [$p=0.0001$]).

The blood feeding rate was high and similar in urban and rural areas of Donga, 93.27% and 96.11% ($p=0.111$), respectively. By contrast, a significant higher blood feeding rate was observed in rural (93.64%) than in urban (86.17%) areas ($p=0.002$) of Alibori. Similarly, combined data of both regions show a higher blood feeding rate in rural areas (95.17%) as compared with urban areas (89.9%) ($p=0.00016$).

Discussion

This study provides some entomological baseline data on mosquito population dynamics in Alibori and Donga regions, two areas in northern Benin, where IRS was planned to be applied. A total of 14 different species of mosquitoes were collected during this study, compared with 13 and 15 species collected in southeastern Benin by Huttel (1950) and Hamon (1954), respectively. Our data are similar to those of Gnan-guenon et al. (2014) who reported 12 species of mosquitoes in sentinel sites, including the Borgou region, which is not far from Alibori and Donga.

The Shannon–Wiener and Simpson indices, which are higher in the DCO health zone compared with the KGS health zone show that mosquito population is more diverse in the DCO health zone than that of KGS.

TABLE 3. VARIABILITY OF *CULEX QUINQUEFASCIATUS* BITING RATE

Variables	Modality	Total of <i>Culex quinquefasciatus</i> collected	Nb of collectors	HBR	HBR/month	95% CI [HBR]
Donga	Djougou	732	104	7.03	211.15	[6.53–7.56]
	Copargo	167	104	1.6	48.17	[1.37–1.86]
Alibori	Kandi	698	104	6.71	201.34	[6.22–7.22]
	Gogounou	1311	104	12.6	378.17	[11.93–13.30]
Urbanization level	Urban area	2017	208	9.69	290.91	[9.27–10.13]
	Rural area	891	208	4.28	128.50	[4.00–4.57]
Location	Indoor	1398	208	6.72	201.63	[6.37–7.08]
	Outdoor	1510	208	7.26	217.78	[6.89–7.63]

TABLE 4. BLOOD FEEDING RATE AND INDOOR RESTING DENSITY OF *ANOPHELES GAMBIAE* S.L. COLLECTED BY PYRETHRUM SPRAY CATCH METHOD IN RURAL AND URBAN AREAS OF ALIBORI AND DONGA

Variables	Modality	Zone	Total of <i>Anopheles</i> <i>gambiae</i> collected	Unfed	Fed	Gravid	Half- gravid	Nb of rooms	Room density	Blood feeding rate (%)	p-Value
Donga	Djougou	Rural	352	7	319	5	21	120	2.93 ^a	96.59	0.0871
		Urban	52	5	45	0	2	119	0.44 ^b	90.38	
	Copargo	Rural	366	4	331	13	18	129	2.84 ^a	95.36	0.683
		Urban	40	1	36	2	1	130	0.31 ^b	92.5	
	Ouake	Rural	130	2	115	2	11	119	1.09 ^a	96.92	0.611
		Urban	116	4	104	2	6	120	0.97 ^a	94.83	
	Total (DCO)	Rural	848	13	765	20	50	368	2.3 ^a	96.11	
Alibori	Kandi	Urban	208	10	185	4	9	369	0.56 ^b	93.27	0.111
		Rural	336	9	277	12	38	125	2.69 ^a	93.75	
	Gogounou	Urban	35	3	29	0	3	129	0.27 ^b	91.43	0.090
		Rural	96	3	88	4	1	130	0.74 ^a	92.71	
	Segbana	Urban	92	2	75	13	2	128	0.72 ^a	83.7	0.206
		Rural	87	1	73	4	9	130	0.67 ^a	94.25	
	Total (KGS)	Urban	61	3	48	5	5	130	0.47 ^a	86.89	
Donga and Alibori	Grand Total	Rural	519	13	438	20	48	385	1.35 ^a	93.64	0.002
		Urban	188	8	152	18	10	387	0.49 ^b	86.17	
			1367	26	1203	40	98	753	1.82 ^a	95.17	0.00016
			396	18	337	22	19	756	0.52 ^b	89.9	

p-Value: p-Value of comparison of the blood feeding rate of *Anopheles gambiae* s.l. between rural and urban areas; densities of *Anopheles gambiae* s.l. with different superscript (a, b) are significantly different ($p < 0.05$).

KGS, Kandi, Gogounou and Segbana; DCO, Djougou, Copargo, and Ouake.

The abundance of *An. gambiae* s.l. in both regions confirms earlier findings of studies carried out in northern Benin (Aïkpon et al. 2013, Gnanguenon et al. 2014). The relative abundance of *Cx. quinquefasciatus* in urban sites would be due to the presence of several larval habitats (sewers, abandoned wells, and cisterns) containing organic matters, and which were favorable to the development of *Cx. quinquefasciatus*, around houses.

In rural areas, where there is a lack of development infrastructures, such as gutters, drainage channel, and roads, much less polluted breeding sites that are conducive to the development of *Anopheles*, were formed in large numbers after rains. Such larval habitats were very close to the rural agglomerations made of several houses, which facilitated the blood meal intake and the oviposition of *Anopheles gambiae* s.l. resulting thus in their proliferation as observed by Go-voetchan et al. (2014). Similarly, Fontenille et al. (1997), Gila et al. (2003), and Hay et al. (2005) have noticed a higher risk of malaria transmission in rural areas than in urban areas. This suggests that, vector control interventions, such as IRS operations must focus more on rural areas so as to have a substantial impact on malaria transmission.

Indoor and outdoor HBR of the two species differs by study site. Contrary to *Cx. quinquefasciatus*, which had similar indoor and outdoor trophic activity, the proportion of *An. gambiae* s.l. inside dwellings was relatively high throughout the study areas. The indoor biting behavior observed in *An. gambiae* s.l. is justified by its anthropophilic characteristics and by the fact that people do not typically rest outside their dwellings in the study area during the rainy season, which is also the period with the highest vector abundance. These observations support the plans to imple-

ment IRS, which preferentially targets endophagic and/or endophilic vectors.

Moreover, the data collected simultaneously on the levels of resistance to different classes of insecticide showed resistance to pyrethroids (permethrin and deltamethrin), emerging resistance to bendiocarb and full susceptibility to pirimiphos-methyl in *An. gambiae* (s.l.) populations in both targeted regions (Salako et al. 2018). However, the short residual life (3 months) of pirimiphos-methyl observed by Aïkpon et al. (2014) in the neighboring region of Atacora suggests the use of another effective insecticide that has at least 6 months of remanence. For that, Fludora® Fusion, a mixture of clothianidin and deltamethrin that displayed a residual life of 10 months (Agossa et al. 2018) in a small-scale field evaluation carried out in Benin could be a good candidate.

Given the relationship between increasing rainfall and increasing density of *An. gambiae* s.l., it is likely that rainfall is a key factor in determining the existence and abundance of *Anopheles* species and the duration of seasonal malaria transmission (Lindsay and Birley 1996, Besancenot et al. 2004). In the Sahel in Senegal, Fontenille et al. (2003) noticed a decrease in *Anopheles* density following a decrease in precipitation. That should be taken into account in setting the spraying schedule. Indeed, for a more efficient insecticide treatment, the spraying campaign should start 1 week before June, the onset of the rainy season to protect people against malaria when the bites of *Anopheles* are likely to be high.

Only two species of the *An. gambiae* s.l. complex, *An. gambiae* and *An. coluzzii*, were involved in malaria transmission in both regions (Akogbéto et al. 2018) with predominance of *An. coluzzii* further north in Alibori probably

due to higher aridity as reported in some studies in Nigeria (Coluzzi et al. 1979, 1985), Cameroon (Onyabe and Conn 2001, Simard et al. 2009), and Burkina Faso (Diabate et al. 2005). In the Alibori, a region in the extreme north of Benin, where the degree of aridity is high, *An. coluzzii* was predominant (69%) during most of the study period. On the other hand, in the more southern Donga region, *An. gambiae* was predominant. These results confirm the works of Toure et al. (1994) who reported a gradual decrease in the frequency of *An. coluzzii* when moving from a Sahelian environment in the north to a forest environment in the south.

The abundance of *An. gambiae* during the rainy season is due to the creation of numerous temporary larval breeding sites during raining season (Diabate et al. 2008, Lehmann and Diabate 2008). No specimen of *An. arabiensis*, a malaria vector of dry savanna areas, was found in our samples, whereas Akogbeto (1992), Akogbeto and Di Deco (1995), and Djogbenou et al. (2010) previously reported their presence in sympatry with *An. gambiae* s.s. in northern Benin.

Our results confirm works by Aikpon et al. (2014), which also reported the only presence of *An. gambiae* and *An. coluzzii* in Kouande, Tanguieta, and Copargo districts, which are quite close to our study area. The absence of *An. arabiensis* could be due to an accelerated urbanization that destroyed the natural habitats of this species, which are mostly dry savannas (Dukeen and Omer 1986). This species is also known as being zoophilic (Duchemin et al. 2001), but the longer droughts observed in recent years in northern Benin have created a lack of grazing leading to the displacement from the north to the center of the country of most animals on which *An. arabiensis* used to feed blood, hence its absence.

The blood feeding rate, which is a proxy indicator of the man–vector contact frequency and of malaria transmission risk (Garrett-Jones and Shidrawi 1969) was overall higher in rural than in urban areas ($p=0.00016$). This could be due to a stronger man–vector contact facilitated by the proximity, between numerous breeding sites of *Anopheles* and the houses in rural areas. Another contributing factor could also be, the fact that most rural populations might have spent more time outdoors before sleeping under their nets or preferred to spend most nights outside their nets, because of their low level of education that does not allow them to know the importance of the use of LLINs to avoid infected bites of mosquitoes as compared with urban populations. This suggests that people from rural areas need more sensitization.

The cross-sectional nature (only 7 months) of the current study stresses the need for further elaborate studies to complete the picture of population dynamics of vectors for all seasons.

Conclusion

This study revealed that *An. gambiae* s.l. and *Cx. quinquefasciatus* were the most abundant mosquito species in our study area, but with different levels according to the region. The endophagy character of *An. gambiae* s.l. noted in the study is an asset for IRS implementation 1 week before June, which is the start of the rainy season. *Cx. quinquefasciatus* had a similar indoor and outdoor trophic habit and predominated during the dry season, during which time IRS has little residual efficacy. The high abundance of *An. gambiae* s.l. and its higher blood feeding rate in rural areas stress the

need for those areas to be primarily targeted by the IRS operations to have a substantial impact on malaria transmission. A longitudinal study covering at least all 12 months of a year is required to have sufficient data on the vector population dynamics for all seasons.

Ethics Approval and Consent to Participate

The protocol of this study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of CREC (IECC). Before mosquito collectors were involved in this study, they gave their consent to participate. They were vaccinated against yellow fever, regularly checked up by a medical doctor, and taken care in case of confirmed malaria case.

Availability of Data and Materials

The data used and/or analyzed in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Author's Contributions

A.S.S., R.O., R.A., G.G.P., and M.C.A. conceived the study. A.S.S., R.A., C.K., H.S., and M.C.A. have participated in the design of the study. A.S.S., G.G.P., R.O., C.K., H.S., and R.A. carried out the field activities and the laboratory analysis. A.S. and M.C.A. drafted the article. A.S.S., A.S., F.D., M.S., and M.C.A. critically revised the article for intellectual content. All authors read and approved the final article.

Acknowledgments

The authors are grateful to the President's Malaria Initiative, which supported this study financially. The authors thank Bruno AKINRO for statistical analysis and André SOMINAHOUIN for the realization of the map of the study area. The authors would also like to thank the populations of Sonsorou, Kossarou, Gounarou, Bantansouè, Bariénou, Zountori, Kataban, Kparakouna, Komdè, Aboulaoudè, Liboussou, and Segbana center for their collaboration. This study was financially supported by the United States President's Malaria Initiative (PMI) through the United States Agency for International Development (USAID) Africa Indoor Residual Spraying Project (AIRS) Project.

Author Disclosure Statement

No conflicting financial interests exist.

References

- Agbanrin R, Padonou G, Yadouléon A, Attolou R, et al. Abundance and diversity of culicidae fauna at Cotonou in southern Benin. *Int J Curr Res* 2015; 3:85–91.
- Agossa FR, Padonou GG, Fassinou AJYH, Odjo EM, et al. Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin, West Africa. *Malar J* 2018; 17:484.
- Aikpon R, Osse R, Govoetchan R, Sovi A, et al. Entomological baseline data on malaria transmission and susceptibility of *Anopheles gambiae* to insecticides in preparation for indoor residual spraying (IRS) in Atacora, (Benin). *J Parasitol Vector Biol* 2013; 5:102–111.

- Aikpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, et al. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC indoor residual spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasit Vectors* 2014; 7:256.
- Akogbeto M. Study of the epidemiological aspects of coastal lagoon malaria in Benin. Doctoral thesis. University of Paris XI. 1992.
- Akogbeto M, Di Deco M. Distribution of members of the *Anopheles gambiae* complex and their chromosomal variants in Benin and Togo, West Africa. *Afr Zool* 1995; 109:443–454.
- Akogbeto M, Padonou G, Bankole H, Kinde Gazard D, et al. Dramatic decline of malaria transmission after implementation of large-scale indoor residual spraying using bendiocarb in Benin, West Africa, an area of high *Anopheles gambiae* resistance to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85:586–593.
- Akogbeto MC, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, et al. Six years of experience in entomological surveillance of indoor residual spraying against malaria transmission in Benin: Lessons learned, challenges and outlooks. *Malar J* 2015; 14: 242.
- Akogbeto MC, Salako AS, Dagnon F, Aikpon R, et al. Blood feeding behaviour comparison and contribution of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*, two sibling species living in sympatry, to malaria transmission in Alibori and Donga region, northern Benin, West Africa. *Malar J* 2018; 17:307.
- Akogbeto M, Yakoubou S. Resistance of malaria vectors to pyrethroids used for impregnated bednets, Benin, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot* 1999; 92:123–130.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, et al. *Mosquitoes and Their Control*. Springer, Heidelberg, Germany. 2010:577.
- Besançon J-P, Ndione J-A, Handschumacher P, Ibrahima M, et al. Climate, water and health in the West African Sahel. *Science Global Change/Drought Synthesis* 2004; 15:233–241.
- Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradations and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* 1985; 52:45–63.
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73:483–497.
- Diabate A, Dabire RK, Heidenberger K, Crawford J, et al. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: Role of predation. *BMC Evol Biol* 2008; 8:5.
- Diabate A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, et al. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: A transplantation experiment. *J Med Entomol* 2005; 42:548–553.
- Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, et al. Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Tropica* 2010; 114:116–122.
- Duchemin J-B, Leong Pock Tsy J-M, Rabarison P, Roux J, et al. Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *A. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Med Vet Entomol* 2001; 15:50–57.
- Dukeen MYH, Omer SM. Ecology of the malaria vector *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) by the Nile in northern Sudan. *Bull Entomol Res* 1986; 76:451–467.
- Fontenille D, Cohuet A, Ambene PHA, Nkondjio CA, et al. Systematics and biology of *anopheline* vectors of *Plasmodium* in Africa, recent data. *Med Trop* 2003; 63:247–253.
- Fontenille D, Lochouart L, Diagne N, Sokhna C, 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; 56: 247–253.
- Garrett-Jones C, Shidrawi GR. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. *Bull World Health Org* 1969; 40:531–545.
- Gila LHS, Alvesb FP, Zielera H, Salcedoa JMV, et al. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazônia. *J Med Entomol* 2003; 40:636–641.
- Gillies M, Coetzee MA. A supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. SAIMR (Johannesburg) 1987; 55: 143.
- Gillies MT, De Meillon B. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. SAIMR (Johannesburg) 1968; 54:1–343.
- Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Osse R, et al. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar J* 2014; 13:444.
- Govoetchan R, Gnanguenon V, Ogouwalé E, Oké-Agbo F, et al. Dry season refugia for anopheline larvae and mapping of the seasonal distribution in mosquito larval habitats in Kandi, northeastern Benin. *Parasit Vectors* 2014; 7:137.
- Hamon J. Contribution to the study of *Culicidae* in the Porto-Novo region (Bas-Dahomey). *Ann parasitol* 1954; 29:588–594.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ. Tropical infectious diseases: Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:81–90.
- Hougard JM, Mbentengam R, Lochouart L, Escaffre H, et al. Control of *Culex quinquefasciatus* by *Bacillus sphaericus*: Results of a pilot campaign in a large urban agglomeration of Equatorial Africa. *Bull World Health Org* 1993; 71:367–375.
- Huttel J. Note on the distribution of mosquitoes in Lower-Dahomey. *Bull Soc Pathol Exot* 1950; 43:563–566.
- Killeen GF, Okumu FO, N'Guessan R, Coosemans M, et al. The importance of considering community-level effects when selecting insecticidal malaria vector products. *Parasit Vectors* 2011; 4:160.
- Lehmann T, Diabate A. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective. *Infect Genet Evol* 2008; 8:737–746.
- Lindsay SW, Birley MH. Climate change and malaria transmission. *Ann Trop Med Parasitol* 1996; 6:573–588.
- Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 846–856.
- Marsh K. Research priorities for malaria elimination. *Lancet* 2010; 376:1626–1627.
- Maxwell CA, Curtis CF, Haji H, Kisumku S, et al. Control of *bancroftian filariasis* by integrated therapy with vector control using polystyrene beads in wet pit latrine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:709–714.
- Ministère de la Santé. *Annuaire des statistiques sanitaires 2012*. Cotonou, Benin: Direction de la Programmation et de la Prospective, 2013.
- N'guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroids resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:199–206.
- Onyabe DY, Conn JE. Genetic differentiation of the malaria vector *Anopheles gambiae* across Nigeria suggests that selection limits gene flow. *J Hered* 2001; 87:647–658.

- Osse R, Aikpon R, Padonou G, Oussou O, et al. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroids resistant malaria vectors in Benin: Results of the third campaign. *Parasit Vectors* 2012; 5:163.
- Randriantsimaniry D. Vector control in the Madagascar plateau epidemic. *Sante* 1995; 5:392–396.
- Rothman KJ. *Epidemiology: An Introduction*. Oxford University Press, NY 2012.
- Salako AS, Ahogni I, Aikpon R, Aboubakar S, et al. Insecticide resistance status, frequency of L1014F *Kdr* and G119S *Ace-1* mutations, and expression of detoxification enzymes in *Anopheles gambiae* (s.l.) in two regions of northern Benin in preparation for indoor residual spraying. *Parasit Vectors* 2018; 11:618.
- Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, et al. Insertion polymorphisms of *SINE200* retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J* 2008; 7:163.
- Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy JP, et al. *The mosquitoes of Europe/Les moustiques d'Europe [Computer Program]*. Montpellier, France: IRD Editions, 2001.
- Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* 1948; 27:379–423.
- Sharp BL, Craig M, Curtis B, Mnzava A, et al. In: Health Systems Trust, ed. *South African Health Review 2000*. Chapter 18: Malaria. Durban, South Africa: The Press-Gang. 2000:351–364.
- Sharp BL, Ridl FC, Govender D. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malar J* 2007; 6:52.
- Simard F, Ayala D, Kamdem G, Pombi M, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: The ecological side of speciation. *BMC Ecol* 2009; 9:17.
- Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature* 1949; 163:688.
- Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, et al. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.str. in Mali, West Africa. *Genetica* 1994; 94:213–223.
- Viniaker H & Lavaud F. Allergy to mosquito bites, *French Journal of Allergology and Clinical Immunology* 2005, 45: 620–625.
- World Health Organization (WHO). *Training Module on Malaria Control: Malaria Entomology and Vector Control. Guide for Participants*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1993.
- World Health Organization (WHO). *A Global Brief on Vector-Borne Diseases*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
- Yadouleton A, Badirou K, Agbanrin R, Jöst H, et al. Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. *Parasit Vectors* 2015; 8:17.

Address correspondence to:
 Albert Sourou Salako
 Faculty of Sciences and Techniques
 University of Abomey Calavi
 Abomey Calavi
 06BP2604 Cotonou
 Benin
 E-mail: albertsourousalako@yahoo.fr

1.3. Données entomologiques de base sur la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga.

Publié à *Malaria journal*

Cette étude dont l'article est fourni à la suite de cette brève synthèse, a permis de collecter des données entomologiques sur la transmission du paludisme en prélude à la campagne de PID prévue dans les départements cibles de l'Alibori et la Donga, Nord Bénin en 2017.

1.3.1. Contexte de l'étude

L'étude de la dynamique de la transmission du paludisme est un préalable indispensable non seulement pour comprendre l'épidémiologie de cette affection, mais aussi pour mettre en place un contrôle efficace et ciblé des moustiques vecteurs (Fontenille & Simard, 2004). Cependant, dans les pays africains en général, et au Bénin en particulier, la collecte de ces données en amont à toute intervention fait défaut, alors qu'elles sont nécessaires pour optimiser l'efficacité des outils de lutte dans la perspective de l'éradication du paludisme dans le pays à l'horizon 2030. C'est pour cela que des efforts ont été consentis dans la présente étude, afin que lesdites données soient collectées en prélude au redéploiement de la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide dans les départements de l'Alibori et de la Donga en 2017.

1.3.2. Objectifs de l'étude

La présente étude a été initiée en prélude à la campagne de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide, afin de disposer de données de base sur la composition des vecteurs, leur variation spatio-temporelle et le pic de transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et de la Donga. Ces données ont permis une meilleure planification de la stratégie et ont facilité l'évaluation de son impact sur les principaux indicateurs de la transmission du paludisme.

1.3.3. Méthodologie

L'étude a été réalisée dans quatre communes : Djougou, Copargo situées dans le département de la Donga ; Kandi et Gogounou dans le département de l'Alibori, au Nord du Bénin. L'échantillonnage des populations d'anophèles a été réalisé sur une base mensuelle de mai 2016 à février 2017 par capture sur des volontaires humains à l'intérieur et à l'extérieur des habitations afin d'évaluer le taux de piqure et, le comportement des vecteurs et par aspersion de bombe aérosol. Après chaque collecte, les moustiques récoltés sont dénombrés et identifiés morphologiquement grâce à la clé taxonomique de Gillies et de Meillon (1968). Les femelles de *An. gambiae* s.l. capturées sur appât humain sont ensuite disséquées pour évaluer leur âge physiologique grâce à l'observation du degré

d'enroulement des trachéoles (Detinova *et al.*, 1964). Chaque spécimen est enfin conservé dans un tube à eppendorf étiqueté contenant du silicagel pour des analyses de laboratoire. Les têtes et thorax des femelles de *An. gambiae* s.l. collectées sur chaque site ont été analysées par ELISA CSP (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) selon la méthode décrite par Wirtz *et al.* (1987). Cette dernière permet la détection de l'infection de *Plasmodium falciparum*) et le calcul des taux d'infectivité. Les paramètres entomologiques évalués dans la présente étude sont les suivants: 1) le taux de piqûre sur homme (ma) défini comme le nombre moyen de piqûres reçues/homme/nuit; 2) le taux d'infection qui est la proportion de moustiques trouvés positifs à l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum*; 3) Le taux de parité déterminé en divisant le nombre de moustiques pares sur le total disséqué x 100; 4) le taux d'inoculation entomologique (TIE), variable clé exprimant le niveau de transmission du paludisme qui se définit comme le nombre de piqûres infectantes reçues/homme/nuit. Il est le produit du taux de piqûre et du taux d'infectivité.

1.3.4. Résultats & et principaux points discutés

Le suivi entomologique que nous avons réalisé, a révélé que *Anopheles gambiae* s.l. et *An. funestus* sont les deux vecteurs du paludisme les plus fréquents dans l'Alibori et la Donga. Le taux de piqûre de *Anopheles gambiae* s.l, principal vecteur du paludisme variait significativement d'une région à l'autre. Il était plus élevé : en milieu rural qu'en milieu urbain, en saison pluvieuse qu'en saison sèche, à l'intérieur qu'à l'extérieur des maisons. L'indice sporozoïtique était globalement similaire entre les sites. Les TIE les plus élevés ont été observés dans la Donga (Djougou : 16,84 piqûres infectantes/homme/mois et Copargo : 17,64 piqûres infectantes/homme/mois) et les plus faibles dans l'Alibori (Kandi : 10,74 piqûres infectantes/homme/mois et, Gogounou : 11,04 piqûres infectantes/homme/mois).

1.3.5. Conclusion

Cette étude a montré le caractère hétérogène de l'épidémiologie du paludisme. Le profil épidémiologique de la transmission de la maladie dans l'Alibori et la Donga est fait d'une seule saison de transmission interrompue par une saison sèche. Cette période de transmission est relativement plus longue dans la Donga que dans l'Alibori. Ces informations pourront être utilisées pour guider l'extension de la PID dans les deux départements en ciblant d'abord les zones à transmission courte et aisément couvrable par la durée d'efficacité de l'insecticide choisi pour la PID.

RESEARCH

Open Access



Baseline entomologic data on malaria transmission in prelude to an indoor residual spraying intervention in the regions of Alibori and Donga, Northern Benin, West Africa

Albert S. Salako^{1,2*}, Idelphonse Ahogni^{1,2}, Casimir Kpanou^{1,2}, Arthur Sovi³, Roseric Azondekon^{1,4}, André A. Sominahouin^{1,5}, Filémon Tokponnon⁶, Virgile Gnanguenon⁷, Fortuné Dagnon⁸, Laurent Iyikirenga⁹ and Martin C. Akogbeto¹

Abstract

Background: Despite the success of indoor residual insecticide spraying (IRS) in Africa, particularly in Benin, some gaps of information need to be filled to optimize the effectiveness of this intervention in the perspective of the country's effort to eliminate malaria. In anticipation to the 2018 IRS campaign in two targeted regions of northern Benin, this study aimed, to collect baseline information on vector composition, spatio-temporal variation and peak malaria transmission in the Alibori and Donga, two targeted regions of northern Benin. Information collected will help to better plan the implementation and later on the impact assessment of this IRS campaign.

Methods: The study was carried out in four districts of the two IRS targeted regions of northern Benin. Human landing catches and pyrethrum spray catches protocols were used to assess the biting rate (HBR) and, biting/resting behaviour of malaria vector populations. After morphological identification of collected *Anopheles*, the heads and thoraxes of *Anopheles gambiae* sensu lato (s.l.) were analysed by the ELISA CSP tests to estimate the sporozoite index (SI). The entomological inoculation rate was calculated as the product of mosquito biting rate (HBR) and the SI.

Results: The biting rates of *An. gambiae* s.l., the major vector in this study sites, varied significantly from region to region. It was higher: in rural than in urban areas, in rainy season than in dry season, indoors than outdoors. Overall, SI was comparable between sites. The highest EIRs were observed in the Donga region (16.84 infectious bites/man/month in Djougou district and 17.64 infectious bites/man/month in Copargo district) and the lowest in the Alibori region (10.74 infectious bites/man/month at Kandi district and 11.04 infectious bites/man/month at Gogounou district).

Conclusion: This study showed the heterogeneous and various nature of malaria epidemiology in Northern Benin. Indeed, the epidemiological profile of malaria transmission in the Alibori and Donga regions is made of a single season of transmission interrupted by a dry season. This period of transmission is relatively longer in Donga region than in Alibori. This information can be used to guide the extension of IRS in the Alibori and in the Donga, by primarily targeting areas with short periods of transmission, and easy to cover.

Keywords: Malaria transmission, *Anopheles gambiae* s.l., IRS, Alibori, Donga, Benin

*Correspondence: albertsourousalako@ahoo.fr

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

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



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Indoor residual spraying (IRS) and insecticide-treated nets (ITNs) are two key and effective strategies designed to interrupt malaria transmission [1–3]. IRS has greatly contributed to reduce or eliminate malaria from many areas of the world, particularly in situations where mosquito vectors feed and rest indoors and where the transmission of malaria is seasonal [4–7]. In Benin, after 6 years of intervention, IRS has proved to be an effective vector control intervention [8]. Started in 2008 in the Oueme region (southern Benin), then relocated to the Atacora region (North Benin) from 2011 to 2015, the intervention was effective in reducing the level of malaria transmission [8–10]. The same trend has been observed in other sub-Saharan countries with this intervention: Swaziland, Botswana, South Africa, Zimbabwe and Mozambique [11], Madagascar [12], Equatorial Guinea (Bioko Island) [13–15], in Uganda [16], Kenya [17] and Tanzania [18]. Unfortunately, IRS effectiveness is being jeopardized by the spread and intensification of insecticide resistance, including to pyrethroids [19–24] and more recently to bendiocarb [25–27]. Density and distribution of *Anopheles*, vectors of malaria vary according to the region and the time of year, and these variations can modify malaria transmission levels [28–31]. Several studies have shown that malaria infection is influenced by environmental factors, such as temperature, precipitation, and relative humidity that vary from region to region [32]. However, in most parts of Africa, there are still gaps in information regarding the dynamics of malaria transmission resulting in the implementation of vector control interventions without sufficient decision-making basis [33–35].

This was the case of Benin where, from 2008 to 2009, a single round of IRS instead of two was implemented in the Oueme region to cover the period of malaria transmission [9]. In 2017, the IRS campaign, with pirimiphos methyl (Actellic 300CS), has targeted all eligible households in the Alibori and Donga regions. These two regions being located in two different eco-geographical areas despite their proximity, it was hypothesized that variations in vectors ecology may affect the micro-epidemiology of malaria. It is in this context that this study was initiated with the aim of obtaining useful information for a better planning and assessment of IRS intervention.

Methods

Study site

Entomological data were collected from two regions with two districts each: Alibori (Gogounou, Kandi) and Donga (Copargo, Djougou) (Fig. 1). The region of Alibori is characterized by a Sudanese climate and the Donga

by a Sudano-guinean climate, with a single dry season (December to May) and a single rainy season (June to November). The annual average rainfall varies between 700–1200 mm and 1200–1300 mm, respectively in Alibori and Donga regions. The average monthly temperature varies between 23 and 40 °C. The region of Donga has more rivers than the region of Alibori. The major economic activity is farming of cotton, maize and millet [36, 37].

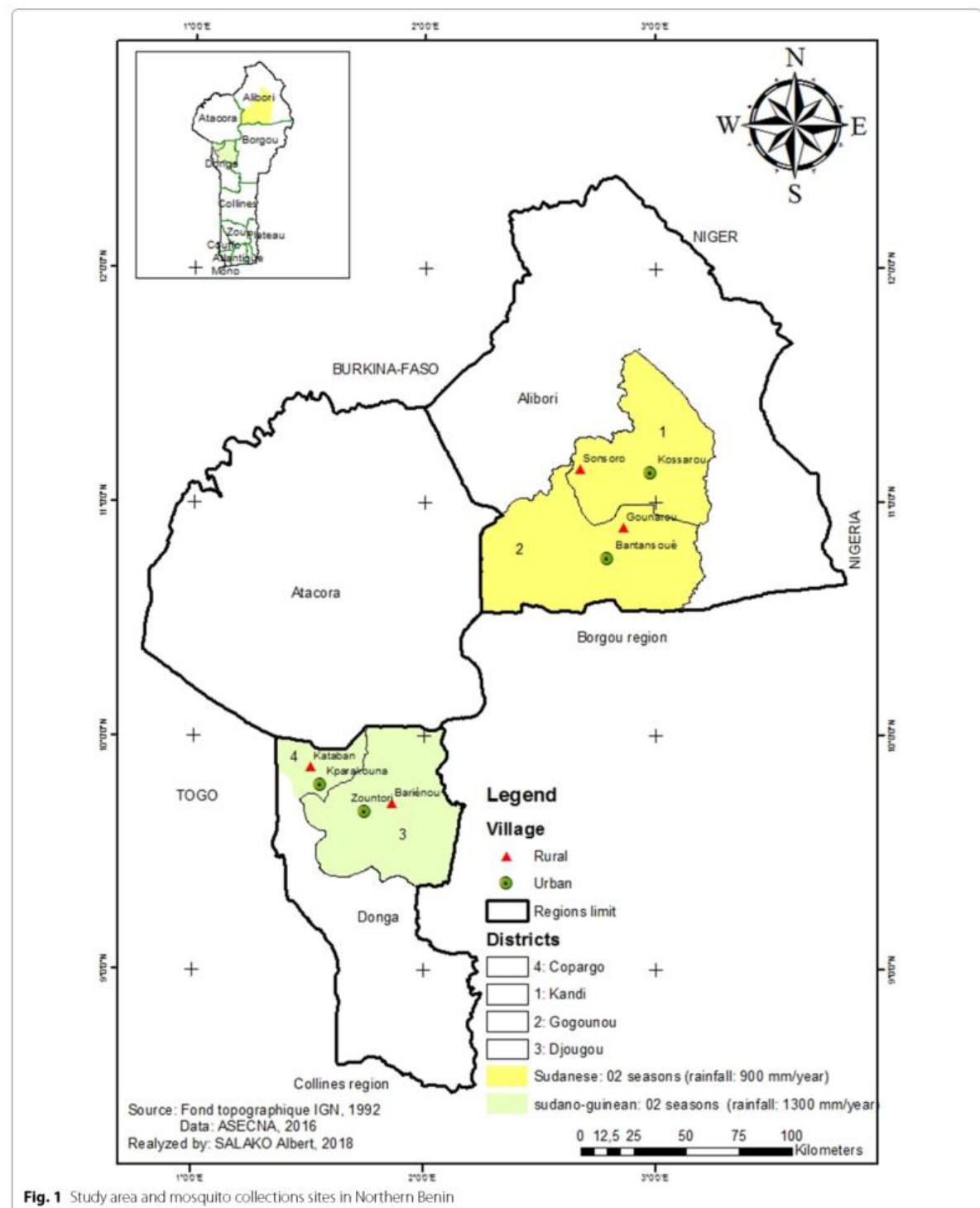
Malaria prevalence is generally higher in Donga region than in Alibori [38]. Long-lasting insecticide-treated mosquito nets (LLINs) distributed every 3 years throughout the mass campaign distribution are the main tools used to prevent human–vector contact in the four districts. In each district, two sites, one in urban and one in rural setting, were selected for mosquito collections. These sites are:

- In Djougou district:
Zountori: a urban area of Djougou (09°42′10.1″ N latitude and 01°40′55.4″ E longitude);
Barienou: a rural village of Djougou (09°42′58.4″ N latitude and 01°46′06.5″ E longitude) (Fig. 1).
- In Copargo district:
Parakounan: a urban area of Copargo (09°50′19.3″ N latitude and 01°32′39.5″ E longitude);
Kataban: a rural village of Copargo (09°54′34.3″ N latitude and 01°31′26.9″ E longitude);
- In Kandi district:
Kossarou: a urban area of Kandi (11°07′29.32″ N latitude and 2°56′9.57″ E longitude);
Sonsoro: a rural village of Kandi (11°4′58.91″ North latitude and 2°13′37.60″ East longitude);
- In Gogounou district:
Bantansoue: a urban area of Gogounou (10°50′30.6″ N latitude and 2°50′20.3″ E longitude);
Gounarou: a rural village of Gogounou (10°52′20.8″ N latitude and 2°50′51.2″ E longitude) (Fig. 1).

Sampling of *Anopheles* vectors of malaria was conducted from May 2016 to February 2017.

Ethical considerations

The protocol of this study has been reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of the Center for the Research in Entomology of Cotonou (IECC). Verbal consent was obtained from local mosquito collectors before being involved in the study. They subsequently received a vaccine against yellow fever as a prophylactic measure. An agreement with health facilities close to sites was also obtained for the free anti-malarial



treatment of mosquito collectors who would suffer from malaria.

Anopheles adult collection

Malaria transmission dynamics were assessed in the 08 identified and described sites in the study area. This is why two classical methods were used for the sampling of *Anopheles* mosquitoes. The first sampling method is termed as Human Landing Catch (HLC), and was carried out from 9:00 p.m. to 5:00 a.m. in 2 nights per month per district, enabled the evaluation of the frequency of human–vector contact (human biting rate). For this purpose, four volunteers (02 inside and 02 outside) captured mosquitoes in 02 randomly selected houses per site, making a total of eight collectors per district per night. The collectors are rotated in the different houses to avoid biases related to their ability or their individual attractiveness. The second sampling method is pyrethrum spray catch (PSC) which was carried out through two morning sessions (between 6 a.m. and 8:30 a.m.) per month in 40 houses per district. This method allowed the collection of resting mosquitoes inside houses.

Mosquito processing

These mosquitoes as well as those caught on human bait were examined for *Plasmodium falciparum* infectivity. After each collection, collected mosquitoes were counted and morphologically identified using the taxonomic key of Gillies and De Meillon [39]. Females of *An. gambiae* s.l. (referred to as *An. gambiae* thereafter in the text) caught on human bait were then dissected to assess their physiological age [40]. Each specimen was finally stored in a labelled Eppendorf tube containing silicagel for further laboratory analysis.

The heads and thorax of females of *An. gambiae* collected at each site were analysed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the method described by Wirtz et al. [41]. This allows the detection of *P. falciparum* infection and the calculation of infectivity rates.

Estimation of entomological parameters

The *human biting rate* (HBR) for identified vector species was calculated as the number of *An. gambiae* caught per person per night of sampling effort. The *sporozoite index* (SI) is the proportion of *An. gambiae* s.l. with circumsporozoite protein of *P. falciparum*: $SI = (\text{Thorax} + / \text{Thorax analysed}) \times 100$. The *parity rate* is a percentage of *An. gambiae* that have laid eggs at least once (parous) out of the total number of *An. gambiae* dissected for the examination of the physiological status of their ovaries. It indicates the proportion of older mosquitoes within the population during

the survey. The *entomological inoculation rate* (EIR), a key variable expressing the malaria transmission level and which is defined as the number of infective bites received/man/night. It is the product of *An. gambiae* biting rate and SI data acquired from HLCs and the ELISA tests, respectively.

Data analysis

Data were analysed with the R statistics software, version 2.8. The Poisson method was used to estimate the confidence intervals [42] of HBRs and EIRs of *An. gambiae*. The binomial method for calculation of confidence intervals [42] was used to estimate the confidence intervals of parity and infectivity rates of *An. gambiae*. The unconditional maximum likelihood estimation method Wald, or median unbiased estimation (mid-p) of the risk ratio (RR) followed by their confidence intervals obtained using the normal approximation or the exact method p-values obtained by Chi^2 or mid-p.exact [43] was used to compare EIR. Proportion comparison tests were used to compare SI and parity rates. A difference is considered as significant when the p-value is less than 0.05.

Results

Vector species composition

A total of 3876 specimens of *Anopheles* mosquitoes from six different species were collected in the regions of Alibori and Donga. The most abundant species was *An. gambiae*, which accounted for 97.72% (3788/3876) of the collected vectors, followed by *Anopheles funestus* (1.88%, 73/3876). The biting behaviour of these two vector species was generally higher in the Donga compared to the Alibori. It should be noted that *An. funestus* was mainly collected in the district of Djougou which provided about 82.2% (60/73) of the specimens (Table 1). Among *Anopheles* species which were collected, there were only 9 *Anopheles coustani* (0.23%), 3 *Anopheles pharoensis* (0.077%), 2 *Anopheles ziemanni* (0.05%) and 1 *Anopheles paludis* (0.025%) (Table 1).

Variability of human biting rates

The biting rate of *An. gambiae* varied significantly from region to region: 6.55–7.51 bites/man/night (b/m/n) in the Donga against 4.4–4.78 bites/man/night in the Alibori ($p < 0.05$) (Table 2). The HBR was four times higher in rural areas compared to urban areas ($RR = 4.27$; $p < 0.0001$). The data also show that the average biting rate of *An. gambiae* was higher indoors (6.37 bites/man/night) than outdoors (5.25 bites/man/night). In the dry season, it was 2.27 bites/man/night compared to 9.95 bites/man/night in the rainy season, an increase of more than four times ($RR = 4.38$; $p < 0.0001$) (Table 2). In both regions, the highest biting rates were observed between

Table 1 Vector species composition in all districts, May 2016–February 2017

Regions	Districts	<i>Anopheles gambiae</i> s.l.	<i>Anopheles funestus</i>	<i>Anopheles pharoensis</i>	<i>Anopheles ziemanni</i>	<i>Anopheles coustani</i>	<i>Anopheles paludis</i>
Donga	Djougou	1086	60	0	0	1	0
	Copargo	1188	8	2	1	8	1
	Sub-total	2274	68	2	1	9	1
Alibori	Kandi	869	4	0	1	0	0
	Gogounou	645	1	1	0	0	0
	Sub-total	1514	5	1	1	0	0
	Total	3788	73	3	2	9	1

Table 2 *An. gambiae* s.l. average monthly biting trends by district, settings and seasons (May 2016 to February 2017)

Variables	Modalities	May	June	July	August	October	January	February	HBR/night	CI-95%	RR and CI-95%	p (Wald)
Donga	Djougou	2	2.88	9.13	13.06	9.06	2.38	5.13	6.55 ^a	[6.07–7.06]	1	–
	Copargo	0.75	7.06	10.56	16.63	10.5	1.5	2.25	7.51 ^b	[7.00–8.06]	1.15 [1.03–1.27]	0.0089
Alibori	Kandi	0.13	4.19	6.75	8.75	10.81	0.25	0.31	4.78 ^c	[4.37–5.22]	0.73 [0.65–0.82]	< 0.001
	Gogounou	0.38	1.31	4.56	9	10.63	2	0.94	4.4 ^c	[4–4.83]	0.67 [0.59–0.76]	< 0.001
Settings	Urban area	0.13	0.63	2.78	5.09	4.28	0.72	0.78	2.18 ^a	[1.99–2.39]	1	–
	Rural area	1.50	7.09	12.72	18.63	16.22	2.34	3.53	9.42 ^b	[9.01–9.85]	4.27 [3.85–4.75]	< 0.0001
Location	Indoor	1.06	3.53	8.50	12.13	11.97	1.97	2.81	6.37 ^a	[6.03–6.72]	1	–
	Outdoor	0.56	4.19	7.00	11.59	8.53	1.09	1.50	5.25 ^b	[4.95–5.58]	0.83 [0.76–0.89]	< 0.001
Seasonality	Dry season	0.81	–	–	–	–	1.53	2.16	2.27 ^a	[2.07–2.47]	1	–
	Rainy season	–	3.86	7.75	11.86	10.25	–	–	9.95 ^b	[9.51–10.40]	4.38 [3.97–4.83]	< 0.0001

^{a,b,c} The values of the same variable with different letters are statistically different

June and October with a peak in October and August, respectively in Alibori and Donga (Table 2).

Sporozoite index of *Anopheles gambiae*

Overall, out of a total of 3788 head-thoraxes of *An. gambiae* assessed by ELISA, approximately 305 were found to be positive for the circumsporozoitic antigen of *P. falciparum*, which equates to a mean SI of 8.05% [7.20–8.96]. The SI were similar between urban (6.35% [4.63–8.46]) and rural (8.42% [7.6–9.45]) areas ($p=0.086$). The highest infection rates were observed in Gounarou (11.65% [8.48–15.46]) and Kossarou (11.36% [5.58–19.90]) and the lowest in Bantansoue (4.44% [2.38–7.46]) (Table 3).

Overall, mosquito infectivity was 7.48% [5.81–9.43], 8.37% [6.35–10.78], 8.56% [6.96–10.38] and 7.82% [6.36–9.50], respectively in the districts of Kandi, Gogounou, Djougou and Copargo (Table 3). By cumulating data by region, SI was also similar (7.86% [6.55–9.33] in the Alibori versus 8.18% [7.08–9.38] in the Donga, $p=0.769$) (Table 3).

Cumulative data from both regions show similar average of infectivity rates in the rainy season (8.07% [7.14–9.07]) and in the dry season (7.95% [5.95–10.34]) ($p=0.981$). In Kandi, Gogounou and Djougou, mosquito infectivity was respectively 8.89% [3.91–16.76], 4.38%

[1.43–9.93] and 11.26% [7.92–15.37] in the dry season versus 7.32% [5.58–9.37], 9.23% [6.90–12.01] and 7.53% [5.77–9.60] in the rainy season ($p>0.05$). Conversely, in Copargo, the SI was significantly higher in the rainy season (8.45% [6.84–10.28]) than in the dry season (2.44% [0.63–7.50]) ($p=0.0297$) (Table 3).

Entomological inoculation rate of *Anopheles gambiae*

Tables 4 and 5 show the spatio-temporal variation in entomological inoculation rates (EIR). A variation of the EIR across districts was significantly higher in the rainy season (June, July, August and October) than in the dry season (May, January and February) ($p<0.05$) (Table 4).

Overall, the lowest infectivity was observed in Kandi (10.74 infective bites/man/month) and Gogounou (11.04 infective bites/man/month) in Alibori region than in Djougou (16.84 infective bites/man/month) and Copargo (17.64 infectious bites/man/month) in Donga region (Table 4). In the four districts, the infectivity was higher in rural areas than in urban areas ($p<0.05$). Cumulative data revealed an average EIR of 23.79 infectious bites/man/month in rural areas versus 4.15 infectious bites/man/month in urban areas ($p<0.0001$) (Table 5). In Alibori's districts (Kandi and Gogounou), the period of malaria transmission was relatively shorter than in

Table 4 Entomological inoculation rates (EIR) per district according to the season

Districts	Parameters	Dry season (May–January– February)	Rainy season (June–October)	Total	RR (95% CI)	p (Wald)
Kandi	HBR/night	0.25	7.625	4.78	1	–
	SI	8.89	7.32	7.48		
	EIR/night	0.022	0.558	0.358		
	EIR/month	0.66 ^a	16.74 ^b	10.75		
Gogounou	HBR/night	1.25	6.375	4.4	1.03 [1.012–1.046]	0.0006
	SI	4.4	9.2	8.37		
	EIR/night	0.055	0.588	0.368		
	EIR/month	1.645 ^a	17.648 ^b	11.06		
Djoungou	HBR/night	3.4	8.53125	6.55	1.56 [1.54–1.58]	< 0.001
	SI	11.3	7.5	8.56		
	EIR/night	0.38	0.64	0.561		
	EIR/month	11.48 ^a	19.26 ^b	16.85		
Copargo	HBR/night	1.65	11.1875	7.5	1.64 [1.62–1.66]	< 0.001
	SI	2.44	8.45	7.82		
	EIR/night	0.04	0.945	0.588		
	EIR/month	1.21 ^a	28.36 ^b	17.66		

EIR: entomological inoculation rate; RR: rate ratio; CI: confidence interval; p-Wald: p-value of the significance of the ratio of entomological inoculation rate between districts

^{a,b} The EIR/season of the same district bearing different letters are statistically different

[47] in Kandi and Malanville, two districts of the region of Alibori. According to Akogbéto et al. [49], in Alibori and Donga regions, *An. gambiae* is composed of two sibling species (*An. gambiae* and *Anopheles coluzzii*) whose proportions vary depending on the region. In Alibori region, species composition showed *An. coluzzii* (62.2%) and *An. gambiae* (37.8%). In Donga, *An. gambiae* was the most abundant (64.7%). The two species were present throughout the transmission season [49]. *Anopheles gambiae* showed endophagic tendency. This behaviour of *An. gambiae* which feeds on man, preferentially inside houses, is justified by the fact that *An. gambiae* populations rest exclusively indoors during the rainy season, a period of vector abundance. However, this strong endophagy could also be facilitated by the alteration of the repulsive and lethal properties of the LLINs distributed in 2014 within the communities in both regions. In fact, according to Darriet [50], a new Olyset net reduces the entry rate of *An. gambiae* in the huts by 44% compared to an untreated net, whereas when it is 3 years old, its repellent effect is halved and this effect does no longer exist when it is washed. In addition, the dosage of the amount of insecticide carried out by Azondékon et al. [51] on LLINs fibers surface revealed a decrease in chemical efficacy only 6 months after the distribution of the LLINs. Furthermore, the endophagic nature of *An. gambiae* in the study area is an asset for a preventive control based on IRS.

Regarding *An. funestus*, it represents the secondary vector encountered in the study area as it was found in a very low density compared to *An. gambiae*. This very low density has already been reported by Aikpon et al. [48] in the region of Atacora and by Gnanguenon et al. [47] in the Alibori (particularly in Kandi). The low abundance of *An. funestus* in Kandi and Gogounou may be due to the absence of its typical larval habitat (permanent or semi-permanent shaded freshwater streams, swamps, ponds and lakes) in these areas in view of the length of the drought period.

However, Aikpon et al. [52] reported a marked seasonal trend of *An. funestus* in Copargo (Donga region) with high abundance in the dry season. Conversely, the relatively high density of *An. funestus* in Djougou district, compared to other districts, is due to the existence of a small semi-permanent river, with surrounding vegetation, located not far from one of the study sites (Bariénou).

The proportion of *An. gambiae* tested positive to circumsporozoitic antigen of *P. falciparum* was very high in the Alibori and in the Donga (SI = 8.05%), which stresses the need for the implementation of an effective malaria vectors control strategy in these two regions. A similar SI was previously reported in the Atacora, a northern region in Benin (SI = 6.63%) [48], in the Ouidah-Kpomasse-Tori region (southern Benin) (SI = 9.63%) [53] and in western Kenya (SI = 8.2%) [54]. This SI is lower than

Table 3 Sporozoite index of *Anopheles gambiae* s.l.

Districts	Sites	May (DS)	June (RS)	July (RS)	August (RS)	October (RS)	January (DS)	February (DS)	Mean (DS)	Mean (RS)	Mean (7 months)	CI 95%	p-value
Kandi	Sonsoro*												
	Thorax	38	119	175	166	244	10	29	77	704	781		0.212
	Tho-rax+	6	6	9	4	30	0	0	6	49	55		
	SI	15.79	5.04	5.14	2.41	12.30	0	0	7.79 ^a	6.96 ^a	7.042	[5.34–9.06]	
	Kossarou												
	Thorax	7	4	6	16	49	2	4	13	75	88		
	Tho-rax+	1	0	0	0	8	1	0	2	8	10		
	SI	14.29	0	0	0	16.33	50	0	15.38 ^a	10.67 ^a	11.36	[5.58–19.90]	
	Total												
	Thorax	45	123	181	182	293	12	33	90	779	869		
	Tho-rax+	7	6	9	4	38	1	0	8	57	65		
	SI	15.56	4.88	4.97	2.20	12.97	8.33	0	8.89 ^a	7.32 ^a	7.47	[5.81–9.43]	
Gogounou	Gounarou*												
	Thorax	7	8	33	93	167	22	22	51	301	352		0.0016
	Tho-rax+	0	1	2	10	27	0	1	1	40	41		
	SI	0	12.50	6.06	10.75	16.17	0	4.55	1.96 ^a	13.29 ^b	11.65	[8.48–15.46]	
	Bantansoue												
	Thorax	0	23	64	72	71	33	30	63	230	293		
	Tho-rax+	0	1	1	2	5	3	1	4	9	13		
	SI	–	4.35	1.56	2.78	7.04	9.09	3.33	6.35 ^a	3.91 ^a	4.44	[2.38–7.46]	
	Total												
	Thorax	7	31	97	165	238	55	52	114	531	645		
	Tho-rax+	0	2	3	12	32	3	2	5	49	54		
	SI	0	6.45	3.09	7.27	13.45	5.45	3.85	4.39 ^a	9.23 ^a	8.37	[6.35–10.78]	
Total (Alibori region)	Thorax	52	154	278	347	531	67	85	204	1310	1514		
	Thorax+	7	8	12	16	70	4	2	13	106	119		
	SI	13.46	5.19	4.32	4.61	13.18	5.97	2.35	6.37 ^a	8.09 ^a	7.86	[6.55–9.33]	
Djougou	Barienou*												
	Thorax	56	57	251	198	145	51	171	278	651	929		0.223
	Tho-rax+	15	4	6	25	16	3	15	33	51	84		
	SI	26.79	7.02	2.39	12.63	11.03	5.88	8.77	11.87 ^a	7.83 ^a	9.04	[7.27–11.07]	
	Zountori												
	Thorax	0	0	33	59	41	18	6	24	133	157		
	Tho-rax+	0	0	1	5	2	1	0	1	8	9		
	SI	–	–	3.03	8.47	4.88	5.56	0	4.17 ^a	6.02 ^a	5.73	[2.65–10.60]	
	Total												
	Thorax	56	57	284	257	186	69	177	302	784	1086		
	Tho-rax+	15	4	7	30	18	4	15	34	59	93		
	SI	26.79	7.02	2.46	11.67	9.68	5.80	8.47	11.26 ^a	7.53 ^a	8.56	[6.96–10.38]	

Table 3 (continued)

Districts	Sites	May (DS)	June (RS)	July (RS)	August (RS)	October (RS)	January (DS)	February (DS)	Mean (DS)	Mean (RS)	Mean (7 months)	CI 95%	p-value
Copargo	Kataban*												
	Thorax	13	189	274	284	198	35	56	104	945	1049		1
	Tho- rax+	0	8	16	34	21	3	0	3	79	82		
	SI	0	4.23	5.84	11.97	10.61	8.57	0	2.88 ^a	8.36 ^a	7.81	[6.26–9.61]	
	Kparakouna												
	Thorax	1	11	27	61	21	4	14	19	120	139		
	Tho- rax+	0	0	0	6	5	0	0	0	11	11		
	SI	0	0	0	9.84	23.81	0	0	0 ^a	9.16 ^a	7.91	[4.01–13.71]	
	Total												
	Thorax	14	200	301	345	219	39	70	123	1065	1188		
Total (Donga region)	Tho- rax+	0	8	16	40	26	3	0	3	90	93		
	SI	0	4	5.32	11.59	11.87	7.69	0	2.44 ^a	8.45 ^b	7.83	[6.36–9.50]	
	Thorax	70	257	585	602	405	108	247	425	1849	2274		
Total (rural areas)	Thorax+	15	12	23	70	44	7	15	37	149	186		
	SI	21.43	4.67	3.93	11.63	10.86	6.48	6.07	8.71 ^a	8.06 ^a	8.18	[7.08–9.38]	
	Thorax	114	373	733	741	754	118	278	510	2601	3111		0.086
Total (urban areas)	Thorax+	21	19	33	73	94	6	16	43	219	262		
	SI	18.42	5.09	4.50	9.85	12.47	5.08	5.76	8.43 ^a	8.42 ^a	8.42	[7.46–9.45]	
	Thorax	8	38	130	208	182	57	54	119	558	677		
Grand total	Thorax+	1	1	2	13	20	5	1	7	36	43		
	SI	12.50	2.63	1.54	6.25	10.99	8.77	1.85	5.88 ^a	6.45 ^a	6.35	[4.63–8.46]	
	Thorax	122	411	863	949	936	175	332	629	3159	3788		
	Thorax+	22	20	35	86	114	11	17	50	255	305		
	SI	18.03	4.87	4.06	9.06	12.18	6.29	5.12	7.95 ^a	8.07 ^a	8.05	[7.20–8.96]	

SI: sporozoite index; CI: confidence interval; *: rural area; DS: dry season; RS: rainy season

^{a,b} The SI/season of the same site bearing different letters are statistically different

Donga's districts where it extended from May to February at Djougou and, from June to January at Copargo (Fig. 2). In Alibori region, the peak of transmission was recorded in October at Kandi (42.06 infectious bites/man/month) and Gogounou (42.86 infectious bites/man/month). Conversely, in Donga region, it was observed in August at Djougou (45.6 infectious bites/man/month) and Copargo (57.6 infectious bites/man/month) (Fig. 2 and Table 5).

Seasonal variation of the parity of *Anopheles gambiae*

Ovaries dissection of 1640 females of *An. gambiae* collected through HLCs were performed to determine parity rates. 1185 (72.3%) were found parous. Vectors' parity rate was 81.90% [73.19–88.73], 91.38% [81.01–97.14] and 89.13% [76.43–96.37] during the dry season against 71.14% [66.39–75.56], 70.59% [65.90–74.96] and 68.58% [62.57–74.16] during the rainy season ($p < 0.05$), respectively in Djougou, Copargo and Gogounou. In Kandi, no significant difference was observed between parous rates

of both seasons, probably due to the low number of mosquitoes dissected in the dry season (Table 6). Overall, cumulative data showed an average parous rate estimated at 86.70% [81.45–90.90] in the dry season against 70.04% [67.58–72.41] in the rainy season ($p < 0.001$).

Discussion

The study of the dynamics of malaria transmission is a prerequisite to not only understand the epidemiology of this disease, but also to establish effective and targeted control of mosquito, vectors of diseases [44]. The entomological monitoring that we carried out revealed that *An. gambiae* and *An. funestus* were the main malaria vectors in Alibori and Donga regions, which confirms the results of previous studies conducted in West Africa, and specifically in Benin [45–47]. *Anopheles gambiae* appeared as the major vector (97.72%) in the two regions. This finding corroborates previous data published by Aikpon et al. [48] in Atacora and Gnanguenon et al.

Table 5 Monthly variation of EIR per site and per district

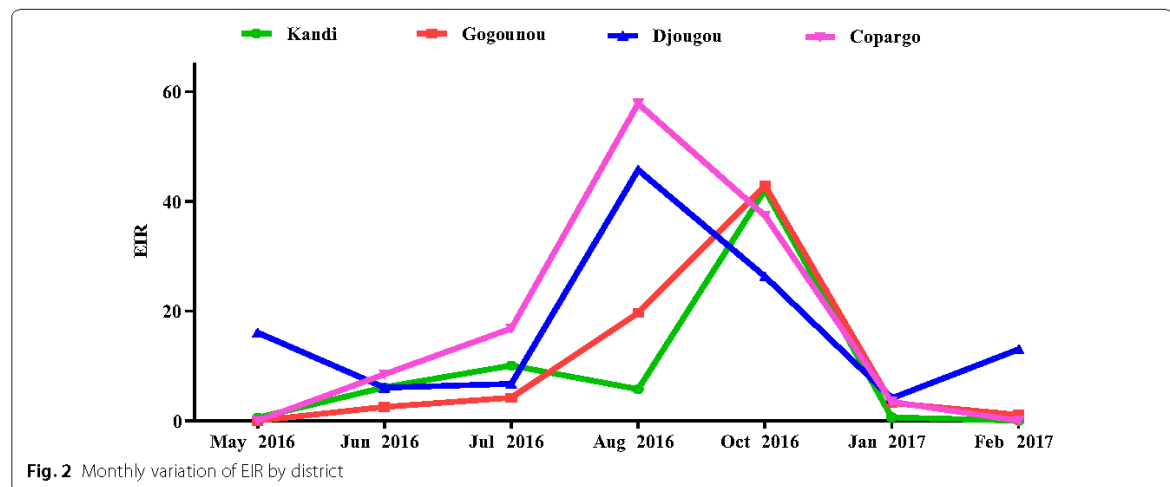
Districts	Sites	May	June	July	August	October	January	February	EIR/night	EIR/month	EIR/year	RR (95% IC)	P (Wald)
Kandi	Sonsor ^a												
	HBIR/night	0	8.25	13.25	15.75	17.63	0.38	0.38					<0.0001
	EIR/night	0	0.42	0.68	0.38	2.17	0	0	0.6	18.08	216.96	1	
	Kossarou												
	HBIR/night	0.25	0.13	0.25	1.75	4	0.13	0.25					
Gogounou	EIR/night	0.04	0	0	0	0.65	0.06	0	0.12	3.47	41.7	0.19 [0.17–0.21]	
	Total												
	HBIR/night	0.13	4.19	6.75	8.75	10.81	0.25	0.31					
	EIR/night	0.019	0.204	0.336	0.192	1.402	0.021	0	0.358	10.75	128.94		
	Goumarou ^a												
	HBIR/night	0.75	0.63	3	10.88	14.38	1.75	1					<0.0001
	EIR/night	0	0.08	0.18	1.17	2.32	0	0.05	0.57	17.2	206.43	1	
	Bartansoué												
	HBIR/night	0	2	6.13	7.13	6.88	2.25	0.88					
	EIR/night	0	0.09	0.1	0.2	0.48	0.2	0.03	0.17	5.17	62.05	0.30 [0.28–0.31]	
Djoungou	Total												
	HBIR/night	0.38	1.31	4.56	9	10.63	2	0.94					
	EIR/night	0	0.08	0.14	0.65	.43	0.11	0.04	0.369	11.06	132.73		
	Barlenou ^a												
	HBIR/night	4	5.75	15.88	20	14.38	4.38	9.75					<0.0001
	EIR/night	1.07	0.4	0.38	2.53	1.59	0.26	0.86	1.003	30.1	361.19	1	
	Zountori												
	HBIR/night	0	0	2.38	6.13	3.75	0.38	0.5					
	EIR/night	0	0	0.03	0.085	0.049	0.056	0	0.057	1.72	20.64	0.11 [0.10–0.12]	
	Total												
	HBIR/night	2	2.88	9.13	13.06	9.06	2.38	5.13					
	EIR/night	0.54	0.20	0.22	1.52	0.88	0.14	0.43	0.562	16.85	202.17		

Table 5 (continued)

Districts	Sites	May	June	July	August	October	January	February	EIR/night	EIR/month	EIR/year	RR (95% IC)	P (Wald)
Copargo	Kataban ^a												
	HBR/night	1.25	13.75	18.75	27.88	18.5	2.88	3					
	EIR/night	0	0.582	1.095	3.337	1.962	0.246	0	1.027	30.81	369.72	1	< 0.0001
	Kparakouna												
	HBR/night	0.25	0.38	2.38	5.38	2.5	0.13	1.5					
Urbanization	EIR/night	0	0	0	0.529	0.595	0	0	0.151	4.52	54.24	0.14 [0.13–0.15]	
	Total												
	HBR/night	0.75	7.06	10.56	16.63	10.50	1.50	2.25					
	EIR/night	0	0.28	0.56	1.92	1.24	0.11	0	0.589	17.66	211.91		
	Rural areas ^a												
Urban area	HBR/night	1.5	7.09	12.72	18.63	16.2	2.34	3.53					
	EIR/night	0.27	0.36	0.57	1.83	2.023	0.119	0.203	0.793	23.79	285.54	1	< 0.0001
	Urban area												
	HBR/night	0.13	0.63	2.78	5.09	4.28	0.72	0.78					
	EIR/night	0.016	0.017	0.043	0.318	0.470	0.063	0.014	0.138	4.15	49.83	0.176 [0.174–0.179]	

EIR: entomological inoculation rate; RR: rate ratio; CI: confidence interval of RR; p-Wald: p-value of the significance of the ratio of entomological inoculation rate between the rural and urban areas

^a Rural area

**Table 6** Parity rates of *Anopheles gambiae* s.l.

Districts	Dry season (May–January–February)			Rainy season (June–October)			p-value
	Number dissected	Parous	Parous rate (%)	Number dissected	Parous	Parous rate (%)	
Djougou	105	86	81.90	395	281	71.14	0.0361
Copargo	58	53	91.38	408	288	70.59	0.0014
Kandi	9	9	100	358	248	69.27	0.1055
Gogounou	46	41	89.13	261	179	68.58	0.0074
Total	218	189	86.70	1422	996	70.04	0.00042

those observed in Eastern Gambia (SI=17.73%) [55] and in Guinea-Bissau (SI=12%) [56, 57]. This relatively high infection rate could be due to an increase in human–vector contact facilitated by anthropogenic behaviours (late hours at which people go to bed, non-usage of LLINs and others) and some factors that affect physical integrity (usage of sharp objects and lighted candles) and chemical effectiveness (high washing frequency) of LLINs. Other environmental factors, including high ambient temperature, prompt people to sleep outside without any protection against mosquito bites. This observation underscores the need to support IRS campaign with appropriate information, education and communication campaigns to combat this sleeping misbehaviour in sprayed areas.

Although the infectivity rate was not the same in the four districts the highest rates were obtained in Djougou (16.84 infectious bites/man/month) and Copargo (17.64 infectious bites/man/month) and the lowest in Kandi (10.74 infectious bites/man/month) and Gogounou (11.04 infectious bites/man/month). These results suggest that the intensity of malaria transmission is higher

in Donga region than in Alibori. Considering that the entomological inoculation rate is calculated using human biting and SI and, on the other hand, the similarity of SI in the two regions, it is legitimate to infer that the biting rate of *An. gambiae* was the main factor causing the difference observed between malaria transmission levels of the two regions. This deduction confirms the findings of Garrett-Jones [58], who reported that vector abundance is an important determinant in the malaria transmission level. In the case of the present study, the highest biting frequency of *An. gambiae* was observed in Donga region compared to Alibori ($p < 0.0001$), which could be due to some environmental characteristics (rainfall and soil humidity higher in the Donga region than in that of Alibori, thus promoting vector proliferation). Variation in malaria transmission levels between the two investigated regions may also be related to differences in topographies. In Alibori region, Kandi and Gogounou districts are located in areas of sloping plateaus that favour the runoff of water towards the south of the country after the rains. This situation prevents the on-site formation of a large number of breeding sites, resulting in lower vector

abundance in Alibori region compared to Donga region. These results are consistent with findings of Omukunda et al. [59] who investigated similar bioecological areas in western Kenya.

The higher infection rates in rural areas compared to urban areas ($p=0$) in the four districts confirm the spatial polymorphism in malaria epidemiology as previously observed by Sovi et al. [60] in the region of the Plateau, southeast of Benin. High EIRs obtained in rural areas were likely due to a high biting rate of *An. gambiae* resulting from an exponential proliferation in breeding sites meeting optimum conditions for development, in contrast to urban areas where the larval habitats are generally quite polluted and, therefore, more conducive to the development of *Culicines* [61]. Similar results have been observed in Dar es Salaam, Tanzania [62], in Ouagadougou, Burkina Faso [63], in Tori-bossito, southern Benin [64], in Kandi, northeastern Benin [31] and in the north-south transect of Benin [47]. In the study area, the risk of malaria infection was very high during the rainy season, but too low during the dry season despite the high parity rate in *An. gambiae* during this period compared to the rainy season. The period of malaria transmission is relatively longer in Donga region than in Alibori with a peak, respectively in August and October. These results are typical of tropical facies to which belong the two regions and characterized by a seasonal transmission of malaria interrupted by a dry season covering a non-negligible time in a year. A similar epidemiological facies was found in Zimbabwe, Kenya, Tanzania, northern areas of Nigeria, Benin, Ghana, Côte d'Ivoire and Guinea [65]. This observation should be taken into account to schedule spraying operations for a better impact of the intervention. Indeed, it is more appropriate to start the IRS campaign before the transmission period. In the four district covered by this study, June appeared to be the best period to start the IRS intervention. Since the CS formulation of pirimiphos methyl to be used for the next IRS campaign has a 4-month persistence period in field conditions of Atacora region [8], the short duration of malaria transmission in the Alibori region could be considered as an advantage.

Conclusion

The Alibori and Donga regions are characterized by one transmission season relatively longer in Donga region than in Alibori. Spatio-temporal variation in entomological inoculation rates was also observed with higher rates in rural areas and during the rainy season. Given the duration of persistence of pirimiphos methyl selected for the IRS operations, the month of June would be the ideal period to start the implementation of the intervention. The

information collected in this study provides a reference for the monitoring and evaluation of the IRS intervention in four districts of the study area.

Abbreviations

EIR: entomological inoculation rate; HBR: human biting rate; HLC: human landing catch; SI: sporozoite index; IRS: indoor residual spraying; ITN: insecticide treated net; LLIN: long lasting insecticidal nets; PSC: pyrethrum spray catch; CS: micro-encapsulated formulation.

Authors' contributions

ASS, IA, CK, FT and MCA conceived the study. ASS and MCA have participated in the design of the study. ASS, IA, CK, AAS and VG carried out the field activities and the laboratory analysis. ASS and MCA drafted the manuscript. RA, AS, LI, FT, FD and MCA critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ³ PMI VectorLink Project, Abt Associates, Bamako, Mali. ⁴ University of Wisconsin Milwaukee, Milwaukee, WI, USA. ⁵ Faculté des Sciences Humaines et Sociales de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ⁶ Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme, Cotonou, Benin. ⁷ PMI VectorLink Project, Abt Associates, Bujumbura, Burundi. ⁸ US President's Malaria Initiative, US Agency for International Development, Cotonou, Benin. ⁹ PMI VectorLink Project, Abt Associates, Cotonou, Benin.

Acknowledgements

We are grateful to the President's Malaria Initiative which supported financially this study. We thank Bruno AKINRO for statistical analysis and also the populations of Sossoro, Kossarou, Gounarou, Bantansoué, Bariénou, Zountori, Kataban and Kparakouna centre for their collaboration. We acknowledge Monica Patton, Peter Thomas and Raymond Beach of US Centers for Disease Control and Prevention for providing technical assistance and proofreading the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The data used and/or analysed in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The protocol of this study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of CREC (IECC). Before mosquito collectors were involved in this study, they gave their consent to participate. They were vaccinated against yellow fever, regularly checked up by a medical doctor and taken care in case of confirmed malaria case.

Funding

This study was financially supported by the US President's Malaria Initiative (PMI) thru the United States Agency for International Development (USAID) Africa Indoor Residual Spraying Project (AIRS).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 20 May 2018 Accepted: 6 October 2018
Published online: 29 October 2018

References

- WHO. Global Malaria Programme. Indoor residual spraying: use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. Geneva: World Health Organization; 2006.
- WHO. Global Malaria Programme. Insecticide-treated mosquito nets: a position statement. Geneva: World Health Organization; 2007.
- Roll Back Malaria. The global malaria action plan 2012. 2013. <http://www.rollbackmalaria.org/gmap>. Accessed 26 Feb 2018.
- Schiff C. Integrated approach to malaria control. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:278–93.
- Lengeler C, Sharp B. Indoor residual spraying and insecticide-treated nets. In: Murphy C, Ringheim K, Woldehanna S, Volmink J, editors. Reducing malaria's burden: evidence of effectiveness for decision makers. Washington, DC: Global Health Council; 2003. p. 17–24.
- Roberts D, Curtis C, Tren R, Sharp B, Schiff C, Bate R. Malaria control and public health. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1170–1.
- WHO. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
- Akogbeto MC, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, Osse R, Agossa FR, et al. Six years of experience in entomological surveillance of indoor residual spraying against malaria transmission in Benin: lessons learned challenges and outlooks. *Malar J*. 2015;14:242.
- Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:586–93.
- Ossè R, Aikpon R, Padonou GG, Oussou O, Yadouléton A, Akogbeto M. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. *Parasit Vectors*. 2012;5:163.
- Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. *Trop Med Int Health*. 2004;9:846–56.
- Brutus L, Le Goff G, Rasolomaina LG, Rajaonarivelo V, Raveloson A, Cot M. Lutte contre le paludisme dans le moyen-ouest de Madagascar : Comparaison de l'efficacité de la lambda-cyhalothrine et du DDT en aspersions intradomiciliaires. I. Etude entomologique. *Parasite*. 2001;8:309–16.
- Kleinschmidt I, Sharp B, Benevente L, Schwabe C, Torrez M, Kuklinski J, et al. Reduction in infection with *Plasmodium falciparum* one year after the introduction of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:972–8.
- Sharp BL, Kleinschmidt I, Streat E, Maharaj R, Barnes KI, Durrheim DN, et al. Seven years of regional malaria control collaboration—Mozambique, South Africa and Swaziland. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:42–7.
- Overgaard HJ, Reddy VP, Abaga S, Matias A, Reddy MR, Kulkarni V, et al. Malaria transmission after five years of vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Parasit Vectors*. 2012;5:253.
- Kigozi R, Baxi SM, Gasasira A, Sserwanga A, Kakeeto S, Nasr S, et al. Indoor residual spraying of insecticide and malaria morbidity in a high transmission intensity area of Uganda. *PLoS ONE*. 2012;7:e42857.
- Gimnig JE, Otieno P, Were V, Marwanga D, Abong'o D, Wiegand R, et al. The effect of indoor residual spraying on the prevalence of malaria parasite infection, clinical malaria and anemia in an area of perennial transmission and moderate coverage of insecticide treated nets in Western Kenya. *PLoS ONE*. 2016;11:0145282.
- Protopopoff N, Wright A, West PA, Tigererwa R, Mosha FW, Kisinza W, et al. Combination of insecticide treated nets and indoor residual spraying in Northern Tanzania provides additional reduction in vector population density and malaria transmission rates compared to insecticide treated nets alone: a randomised control trial. *PLoS ONE*. 2015;10:e0142671.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. Current distribution of pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parassitologia*. 1999;41:319–22.
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*. 2007;101:207–16.
- Yadouléton A, Asidi A, Djouaka R, Braïma J, Agossou C, Akogbeto M. Development of vegetable farming. A cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J*. 2009;8:103.
- Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, et al. Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Trop*. 2010;114:116–22.
- Djegbe I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, et al. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J*. 2011;10:261.
- Sovi A, Djegbe I, Soumanou L, Tokponnon F, Nguenon V, Azondekon R, et al. Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of long lasting insecticidal nets (LLINs). *BMC Infect Dis*. 2014;14:103.
- Aizoun N, Aikpon R, Nguenon V, Oussou O, Agossa F, Padonou GG, et al. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato from the south and north Benin, West Africa. *Parasit Vectors*. 2013;6:274.
- Aikpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aizoun N, Oké-Agbo F, et al. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors*. 2013;6:192.
- Nguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, et al. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved. *Parasit Vectors*. 2015;8:223.
- Cox J, Craig MH, Le Sueur D, Sharp BL. Mapping malaria risk in the highlands of Africa. Technical report. London/Durban: MARA/HIMAL; 1999.
- Kleinschmidt I, Sharp B, Mueller I, Vounatsou P. Rise in malaria incidence rates in South Africa: small area spatial analysis of variation in time trends. *Am J Epidemiol*. 2002;155:257–64.
- Munga S, Yakob L, Mushinzimana E, Zhou G, Ouna T, Minakawa N, et al. Land use and land cover changes and spatiotemporal dynamics of *Anopheline* larval habitats during a four-year period in a highland community of Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:1079–84.
- Govoetchan R, Nguenon V, Azondekon R, Agossa RF, Sovi A, Oké-Agbo F, et al. Evidence for perennial malaria in rural and urban areas under the Sudanian climate of Kandi, Northeastern Benin. *Parasit Vectors*. 2014;7:79.
- Kazembe LN, Kleinschmidt I, Holtz TH. Spatial analysis and mapping of malaria risk in Malawi using point-referenced prevalence of infection data. *Int J Health Geograph*. 2006;5:41.
- Le Sueur D, Binka F, Lengeler C, de Savigny D, Snow B, Teuscher T, et al. An atlas of malaria in Africa. *Afr Health*. 1997;19:23–4.
- Carter R, Mendis KN, Roberts D. Spatial targeting of interventions against malaria. *Bull World Health Organ*. 2000;78:1401–11.
- Killeen GF, Okumu FO, N'Guessan R, Coosemans M, Adeogun A, Awolola S, et al. The importance of considering community-level effects when selecting insecticidal malaria vector products. *Parasit Vectors*. 2011;4:160.
- INSAE, RGPH4 2013. Cahiers des villages et quartiers de ville du département de l'Alibori; 2016. http://www.insae-bj.org/recensement-population.html/enquêtes-recensements/rgph/Cahier_village_2013/Alibori.pdf. Accessed 20 Apr 2018.
- INSAE, RGPH4 2013. Cahiers des villages et quartiers de ville du département de la Donga; 2016. http://www.insae-bj.org/recensement-population.html/enquêtes-recensements/rgph/Cahier_village_2013/Donga.pdf. Accessed 20 Apr 2018.
- Ministère de la Santé. Annuaire des statistiques sanitaires 2016. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2017.
- Gillies MT, De Meillon B. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. *South Afr Inst Med Res*. 1968;54:1–343.
- Detinova TS, Gillies MT. Observations on the determination of the Age composition and epidemiological importance of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. *Bull World Health Organ*. 1964;30:23–8.
- Wirtz R, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell G, Burkot T, Schneider I, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ*. 1987;65:39.
- Rothman KJ. Epidemiology: an introduction. Oxford: Oxford University Press; 2012.

43. Jewell NP. Statistics for epidemiology. Boca Raton: CRC Press; 2003.
44. Fontenille D, Simard F. Unraveling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vectors populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27:357–75.
45. Akogbeto M, Di Deco M. Distribution of members of the *Anopheles gambiae* complex and their chromosomal variants in Benin and Togo, West Africa. *Afr Zool*. 1995;109:443–54.
46. 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.
47. Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Osse R, Oke-Agbo F, Azondekon R, et al. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar J*. 2014;13:444.
48. Aikpon R, Osse R, Govoetchan R, Sovi A, Oke-Agbo F, Akogbeto MC. Entomological baseline data on malaria transmission and susceptibility of *Anopheles gambiae* to insecticides in preparation for indoor residual spraying (IRS) in Atacora, (Benin). *J Parasitol Vector Biol*. 2013;5:102–11.
49. Akogbeto MC, Salako SA, Dagnon F, Aikpon R, Kouletio M, Sovi A, et al. Blood feeding behaviour comparison and contribution of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*, two sibling species living in sympatry, to malaria transmission in Alibori and Donga region, northern Benin, West Africa. *Malar J*. 2018;17:307.
50. Darriet F. Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides. Paris: Éditions IRD; 2007.
51. Azondekon R, Gnanguenon V, Oke-Agbo F, Houeвоessa S, Green M, Akogbeto M. A tracking tool for long-lasting insecticidal (mosquito) net intervention following a 2011 national distribution in Benin. *Parasit Vectors*. 2014;7:6.
52. Aikpon R, Ossè R, Padonou G, Anagonou R, Salako A, Ahogni I, et al. Involvement of both *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in the perennial malaria transmission through a seasonal abundance in savannah area in Benin. *Int J Mosq Res*. 2017;4:107–12.
53. Djénontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, Chabi J, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): a preintervention study. *Parasit Vectors*. 2010;3:83.
54. Taylor KA, Koros JK, Nduati J, Copeland R, Collins FH, Brandling-Bennett AD. *Plasmodium falciparum* infection rates in *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, and *An. funestus* in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43:124–9.
55. 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;88:638–43.
56. Snounou G, Pinheiro L, Gonçalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, et al. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;87:649–53.
57. Jaenson TG, Gomes MJ, Barreto dos Santos RC, Petrarca V, Fortini D, Evora J, et al. Control of endophagic *Anopheles* mosquitoes and human malaria in Guinea Bissau, West Africa by permethrin-treated bed nets. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88:620–4.
58. Garrett-Jones C. Prognosis for interruption of malaria transmission through the assessment of mosquito vectorial capacity. *Nature*. 1964;204:1173–5.
59. Omukunda E, Githeko A, Ndong'a MF, Mushinzimana E, Atieli H, Wamae P. Malaria vector population dynamics in highland and lowland regions of western Kenya. *J Vector Borne Dis*. 2013;50:85–92.
60. Sovi A, Govoetchan R, Tokponnon F, Hounkonnou H, Aikpon R, Agossa F, et al. Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasit Vectors*. 2013;6:352.
61. Omumbo JA, Guerra CA, Hay SI, Snow RW. The influence of urbanization on measures of *Plasmodium falciparum* infection prevalence in East Africa. *Acta Trop*. 2005;93:11–21.
62. Wang SJ, Lengeler C, Mtasiwa D, Mshana T, Manane L, Maro G, et al. Rapid urban malaria appraisal (RUMA) II: epidemiology of urban malaria in Dar es Salaam (Tanzania). *Malar J*. 2006;5:29.
63. Wang SJ, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Diadie DA, Pritroipa X, et al. Rapid urban malaria appraisal (RUMA) I: epidemiology of urban malaria in Ouagadougou. *Malar J*. 2006;4:43.
64. Pierrat C. Des moustiques et des hommes: les territoires du paludisme à Tori-Bossito (sud du Bénin). Thèse de Doctorat de Géographie, Université Paris I Panthéon-Sorbonne; 2010.
65. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A, Robert V. Typologie du paludisme en Afrique. *Santé: Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones*. 1993;3(4):220–38.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



1.4. Comportement de gorgement et contribution de *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae* à la transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et la Donga.

Publié à Malaria journal

Cette étude dont l'article est joint à la fin de ce bref résumé vise à évaluer le degré de contribution de *An. gambiae* et *An. coluzzii* (deux espèces jumelles vivant en sympatrie) à la transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et de la Donga, Nord Bénin.

1.4.1. Contexte de l'étude

Plusieurs études ont montré que les espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l. contribuent différemment à la transmission du paludisme. Cette différence de leur implication dans la transmission de la maladie pourrait être due à leur bio-écologie très diversifiée. Les deux régions cibles de l'étude étant situées dans deux zones éco-géographiques différentes malgré leur proximité, il est possible que les variations de leur écologie affectent la distribution et la contribution des espèces du complexe *An. gambiae* à la transmission du paludisme (Mouchet *et al.*, 2004).

C'est pour cela que la présente étude a pour but d'évaluer la contribution de *Anopheles coluzzii* et *Anopheles gambiae* (2 espèces jumelles du complexe *An. gambiae* s.l.), à la transmission du paludisme dans les départements cibles.

1.4.2. Objectifs de l'étude

La présente étude a été menée pour évaluer le comportement de gorgement et la contribution à la transmission du paludisme de *An. coluzzii* et *An. gambiae*, 2 espèces jumelles vivant en sympatrie dans les régions de l'Alibori et de la Donga, Nord Bénin.

1.4.3. Méthodologie

L'étude a été menée dans 06 communes du nord du Bénin: Kandi, Gogounou et Segbana dans le département de l'Alibori et Djougou, Copargo et Ouaké dans le département de la Donga. Des captures de moustiques sur appât humain ont été effectuées à l'intérieur et à l'extérieur des habitations et par aspersions de bombe aérosol dans les chambres pour échantillonner les populations de vecteurs. Toutes les espèces d'anophèles capturés ont été identifiés selon la méthode décrite par Gilles et de Meillon (1968). Pour évaluer le taux d'infectivité (Is) de chaque espèce du complexe *An. gambiae* s.l., les thorax-tête ont été analysés à l'ELISA selon la méthode de Wirtz *et al.* (1987) pour la détection des moustiques positifs à l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum*. Des abdomens de femelles de *An. gambiae* s.l. ont été analysés à la PCR, afin d'identifier les espèces jumelles du complexe (*An. gambiae* & *An. coluzzii*) et, la présence des mutations L1014F (*Kdr*) et G119S (*Ace - 1*). Le taux de piqure (ma) à l'intérieur et à l'extérieur des

maisons a été calculé pour estimer le comportement de piqûre des 2 espèces. La transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et de la Donga est exprimée en termes de taux d'inoculation entomologique ($TIE = ma \times Is$) pour les deux espèces. La contribution de chaque espèce exprimée en pourcentage, consiste en un TIE calculé pour l'espèce en question divisé par celles des 2 espèces combinées $\times 100$.

1.4.4. Résultats & et principaux points discutés

Un taux de gorgement plus élevé a été observé chez *An. gambiae* (96,68%) (95% IC : [95,27-97,76]) comparé à celui de *An. coluzzii* (90,20%) (95% IC : [88,04- 92,09]) ($p < 0.0001$). Chez les deux espèces jumelles, le comportement de piqûre était plus marqué à l'intérieur des habitations. Elles ont également montré des taux anthropophilie et d'infectivité similaires. Cependant, nous notons une différence saisonnière dans la contribution de chaque espèce à la transmission du paludisme. Les femelles de *Anopheles coluzzii* représentaient la plupart des infections détectées: 86 % dans l'Alibori et 79 % dans le Donga, pendant la saison sèche, contre respectivement 14,4 % et 21,2 %, pour *An. gambiae* pendant la même période. La tendance contraire a été observée dans la Donga pendant la saison des pluies (66% pour *An. gambiae* contre 34% pour *An. coluzzii*). Les résultats ont également montré des fréquences *Kdr L1014F* et *Ace-1 G119S* plus faibles chez *An. coluzzii* par rapport à *An. gambiae*.

1.4.5. Conclusion

Malgré la similitude de certains paramètres liés à la transmission du paludisme chez les deux espèces étudiées, *An. coluzzii* est potentiellement le vecteur du paludisme le plus important en raison de sa forte densité dans les deux départements. Elle est caractérisée par une faible fréquence *Ace-1 G119S* comparée à *An. gambiae*. L'utilisation continue du pirimiphos-méthyl (organophosphoré) pour la PID devrait avoir un impact considérable sur ces deux espèces en raison des très faibles fréquences de la mutation *Ace-1* dans l'Alibori et la Donga.

RESEARCH

Open Access



Blood feeding behaviour comparison and contribution of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*, two sibling species living in sympatry, to malaria transmission in Alibori and Donga region, northern Benin, West Africa

Martin C. Akogbéto^{1,2}, Albert Sourou Salako^{1,2*}, Fortuné Dagnon³, Rock Aïkpon^{1,4}, Michelle Kouletio³, Arthur Sovi⁵ and Michel Sezonlin²

Abstract

Background: The main goal of this study was to assess the blood feeding behaviour and the contribution *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae*, 2 sibling species of *An. gambiae* sensu stricto, present and living in sympatry in 2 regions of northern Benin targeted for indoor residual spraying (IRS).

Methods: The study was carried out in 6 districts of 2 regions of Benin (Alibori and Donga). Human landing catches (HLC) performed inside and outside of the households and pyrethrum spray captures (PSC) carried out in bedrooms were used to sample vector populations (*An. gambiae* and *An. coluzzii*). Collected mosquitoes were analysed to estimate the human biting rate indoors and outdoors, the circumsporozoite antigen positivity, and the anthropophagic index using ELISA methodology. Polymerase chain reaction was used to estimate the frequency of the knockdown resistance (*kdr*) L1014F and the *ace-1* mutations, 2 markers associated respectively with pyrethroids and carbamate/organophosphate insecticide resistance.

Results: A higher blood feeding rate was observed in *An. gambiae* compared to *An. coluzzii* as well as, a non-pro-nounced outdoor biting behavior in both species. The latter showed similar anthropophagic and sporozoite rates. However the analysis indicates a seasonal difference in the contribution of each species to malaria transmission associated with shifts in resting behaviour. *Anopheles coluzzii* females accounted for most of the detected infections: 86% in Alibori and 79% in Donga, during the dry season versus 14.4% and 21.2%, respectively for *An. gambiae* during the same period. This relationship was reversed in Donga during the rainy season (66% for *An. gambiae* against 34% for *An. coluzzii*). Results also indicated lower frequencies of *kdr* L1014F and *ace-1* in *An. coluzzii* versus *An. gambiae*.

Conclusion: Despite similarity in some parameters related to malaria transmission in both surveyed species, *An. coluzzii* is potentially a more important malaria vector because of high density in the region. It is also characterized by lower frequencies of the *ace-1* mutation than is *An. gambiae*. The ongoing use of pirimiphos methyl

*Correspondence: albertsourousalako@yahoo.fr

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

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



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(organophosphate) for IRS should continue to show a good impact in Alibori and Donga because of the very low level of the *ace-1* mutation in both species.

Keywords: *Anopheles coluzzii*, *Anopheles gambiae*, Sporozoite index, Entomological Inoculation Rate, Alibori, Donga, Benin

Background

Anopheles gambiae sensu lato (s.l.) is a complex of 8 species, which contribute differently to malaria transmission. Within the complex, *An. gambiae* sensu stricto (s.s.), the nominotypical member, is comprised of 2 species based on molecular evidence: *Anopheles coluzzii* (the *An. gambiae* molecular 'M form') and *An. gambiae* (the 'S form') [1].

Heterogeneity in the vector capacity of each species is due to a highly diverse bio-ecology: feeding on humans or cattle, resting indoors or outdoors. According to Akogbéto [2] and Awolola et al. [3], what makes *An. gambiae* an efficient vector is that it is highly anthropomorphic and endophilic, thereby frequently coming into contact with humans. In addition to its possibility of adaptation to various environments due to its genetic variants [4, 5], *An. gambiae* s.s. is a very efficient vector of malaria, especially in tropical Africa. Nonetheless, other sibling species of *An. gambiae* complex play a role, albeit a lesser role, in malaria transmission, for example, *Anopheles melas* in West Africa [6–8]. Studies on bio-ecology of *An. gambiae* s.l. have shown statistical differences of sporozoite index between different populations sibling species of the complex [9, 10]. Moreover, the main factor of vector competence of a mosquito to a parasite is its ability to offer a suitable physicochemical environment for the development of the parasite during the sporogonic cycle.

The objective of this study was to assess the blood feeding behaviour and the contribution in malaria transmission of each of the 2 sibling species (*An. coluzzii* and *An. gambiae*) present and living in sympatry in 2 regions of Benin, targeted for indoor residual spraying (IRS) on malaria transmission prior to the implementation of IRS. Given that the density of each of the 2 sibling species varies from one season to another, the more abundant species during the 3–6 months period following spraying when IRS residual efficacy operates, should be more influenced by this intervention.

The study is also evaluating, before spraying, the frequency of mutations associated with organophosphates resistance in *An. coluzzii* and *An. gambiae*, two sibling vector species living in sympatry in the study area and which were likely exposed to the same selection pressure for resistance. Indeed, if low frequencies of resistance mechanisms are observed in a given species, this may be sign that IRS with an organophosphate product could

have a positive impact on the control of this species as previously observed by Aikpon et al. [11].

Detailed information on bio-ecology of vectors and their role in disease transmission are important for implementation of good vector control strategies or for their evaluation. In the study area (Alibori and Donga region, in the northern Benin) targeted for IRS campaign, where the 2 species are sympatric, the recorded data will be used as the comparison basis of the impact of IRS on each of the 2 *Anopheles* populations.

Study area

The study was conducted in 6 districts of the northern Benin: Kandi, Gogounou and Segbana in Alibori region, and Djougou, Copargo and Ouake in Donga region (Fig. 1). The 2 regions are characterized by one dry season (December to May) and one rainy season (June to November). The annual mean rainfall is 1300 mm and the mean monthly temperature varies between 23 and 40 °C. The Alibori region has more rivers than the Donga region. In Alibori, the soil is sandy type while in Donga, it is clayey type. In both regions the major economic activity is agriculture, including the production of cotton, maize and millet, where various classes of pesticides are used for pest control.

Mosquito sampling and laboratory analysis

HLC carried out indoors and outdoors from 21.00 to 06.00 h and PSC performed inside houses from 06.00 to 09.00 were used to sample vector populations during the rainy (June–October 2016) and dry (November–May 2016) seasons in the 6 districts targeted for IRS implementation.

Human landing catches (HLC) and mosquito analysis

In each district, mosquito sampling was performed in 2 villages: one village in the central part of the district and one village at the periphery. In each village, mosquitoes were collected by adult volunteers in 2 houses for 2 consecutive nights, every month for 5 months per season, with one adult volunteer placed indoors and another placed outdoors. All *Anopheles* mosquitoes caught during the night were identified to species using the method described by Gilles and de Meillon [12]. To assess the infection status of each species, the head-thoraxes were tested using enzyme-linked immunosorbent analysis



Fig. 1 Map of Benin showing the Alibori and Donga regions and the sites of mosquito collections

(ELISA) according to Wirtz et al. [13] to estimate circumsporozoite (CS) antigen of *Plasmodium falciparum*, the major malaria parasite occurring in the study area. Abdomens from females of the vector species were used for PCR analyses, to identify the sibling species of *An. gambiae* s.s. (*An. gambiae*, *An. coluzzii*). The indoor and outdoor human biting rate (HBR; also named *ma*) of each species was calculated to estimate the feeding behaviour of the 2 species.

In the study, malaria transmission in both the Alibori and Donga regions is expressed in terms of entomological inoculation rate ($EIR = ma \times s$) due to both of the 2 species. The contribution of each species is the

EIR calculated for the species divided by those of the 2 species $\times 100$.

Indoor pyrethrum spray catches and mosquito analysis

In each village, 20 houses were selected for mosquito collection using indoor pyrethrum spray catches (PSC). Selected houses were sprayed with pyrethrum (mixed with water) and a white canvas was placed on the floor to collect the mosquitoes that were killed. After 10 min, all of the fallen mosquitoes were collected from the floor and placed in petri dishes. Fed, unfed, gravid, and half-gravid females of *An. gambiae* were counted to estimate the endophagy behaviour, defined as the proportion of each

species resting in houses after blood feeding. Fed mosquitoes were also used to estimate the anthropophagic index in terms of the human blood meal rate using ELISA-blood-meal method. The anthropophagic index represents the proportion of blood meals derived from humans by mosquito vectors used to estimate human biting habit.

PCR detection of *kdr* L1014F and *ace-1* mutations

The abdomens of *An. coluzzii* and *An. gambiae* females were used to identify the presence of L1014F (*kdr*) and G119S (*ace-1*) mutations. This was performed using PCR-RFLP [14] to estimate the frequency of *kdr* L1014F mutation in the sodium channel, which is associated with resistance to pyrethroid insecticides, and that of the *ace-1* mutation, which is associated with carbamate and organophosphate insecticide resistance.

Statistical analysis

The human biting index (*ma*) (number of *Anopheles* per person and per night), room density (number of *Anopheles* collected in a room) and the circumsporozoite protein (CSP) positive rate were calculated for each species. The human blood-feeding rate was calculated using mosquitoes collected by PSC by dividing the number of fed and half-fed mosquitoes collected by the number of the total of mosquitoes collected. The CSP positive rate (% CS+) was calculated as the proportion of mosquitoes found to be positive for CSP. The EIR was defined as *Anopheles* density by the CSP and estimated as the number of infectious bites per human per night or per month. A Chi square test with the MINITAB statistical software (Version 12.2) was used to compare the proportions. The genotypic differentiation of *kdr* and *ace-1* loci was tested using the Fischer exact test implemented in GenePop software [15], and the Fisher test was used to compare these frequencies. An analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the entomological estimates (*ma*, EIR, CSP) among the 2 species.

Ethical consideration

Permission was sought from households to perform collections in their rooms. In addition, community consent had been obtained beforehand in all the villages. The volunteer mosquito collectors gave their consent before participating in the study. They were also subjected to regular medical check-ups with preventive malaria treatment. They were all vaccinated against yellow fever. This study received the approval of the Ethical Institutional Committee of the Centre for Entomological Research of Cotonou (CREC), Ministry of Health.

Results

Distribution of *Anopheles gambiae* complex in the two regions

All samples of *An. gambiae* s.l. collected by HLC and PSC were used for species identification. In total, 4182 *An. gambiae* s.l. were analysed by PCR for species identification. Two species of the *An. gambiae* s.s. were identified: *An. coluzzii* and *An. gambiae* (Fig. 2). After 1 year of mosquito collection throughout both dry and rainy seasons, *An. gambiae* represented 54.0% (n = 2260) of the overall *An. gambiae* s.s. population compared to 46.0% (n = 1922) for *An. coluzzii*. However, the predominant species differed from one region to another. In Alibori, *An. coluzzii* represented 62.2% (n = 1033) of the overall *An. gambiae* s.s. population compared to 37.8% (n = 625) for *An. gambiae*. In Donga, *An. gambiae* was the most abundant at 64.7% (n = 1631).

Both of the sibling species were present throughout the dry and rainy seasons in both regions (Fig. 2). During the dry season (January to June), *An. coluzzii* predominated in both the Alibori and Donga regions. However, during the rainy season, there were regional differences in the predominant species: during the rainy season in Donga, there was a high frequency (79.0%) of *An. gambiae* whereas during the rainy season in Alibori there was a relatively high frequency (53.0%) of *An. coluzzii* (Fig. 2).

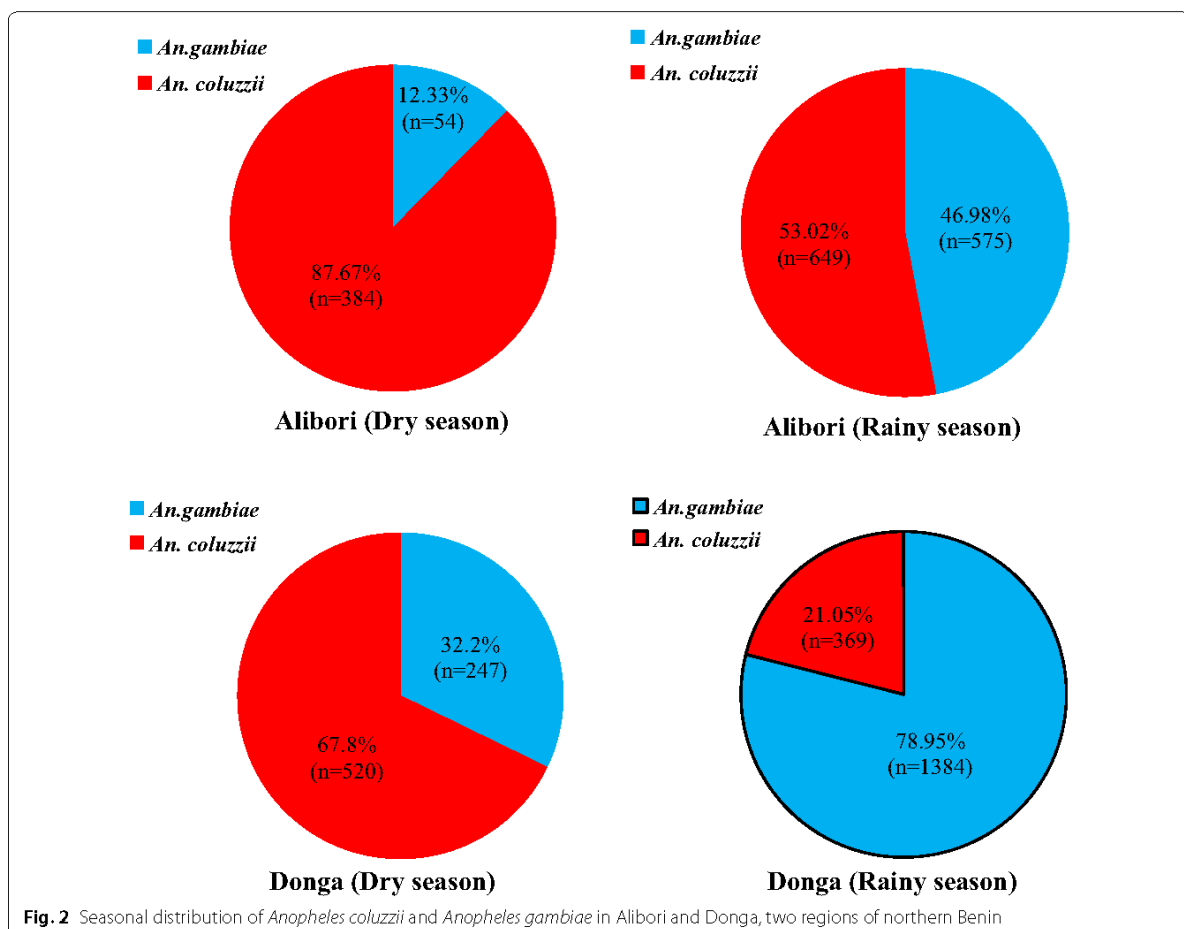
Comparison of (CS) antigen index for *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* during the dry and rainy seasons

More than 4000 head-thoraxes of *An. gambiae* and *An. coluzzii* were tested using ELISA [13] for the presence of CS of *P. falciparum*. Various samples of *An. gambiae* (from HLC and PSC collection) were analysed in order to obtain enough mosquitoes (4182 head-thoraxes) for comparison.

During the dry season, rates of *P. falciparum* CS+ were similar for *An. gambiae* (9.3%: 5 out of 54 thoraxes were CS+) and *An. coluzzii* (5.5%: 21 out of 384) (p = 0.426) in Alibori. Results were statistically different in Donga during the dry season with a higher rate of *P. falciparum* CS+ for *An. coluzzii* (9.6%: 50 out of 520) compared to *An. gambiae* (4.9%: 12 out of 247) (p = 0.002) (Table 1).

During the rainy season, rates of *P. falciparum* CS+ were similar for both species in Alibori (*An. gambiae*: 7.3%: 42 out of 575) thoraxes were CS+; *An. coluzzii*: 10.2%, 66 out of 649) (p = 0.096) and in Donga (*An. gambiae*: 9.5%, 132 out of 1384; *An. coluzzii*: 9.5%, 35 out of 369) (p = 1) (Table 1).

No differences in CS+ between species were observed in either region when data were cumulated over both seasons: 7.5%: 47 out of 629 thoraxes were CS+ for *An.*



gambiae and 8.4%: 87 out of 1033 for *An. coluzzii* in Alibori ($p=0.55$). In Donga, CS+ for *An. gambiae* and *An. coluzzii* were 8.8% (144 out of 1631) and 9.6% (85 out of 889), respectively ($p=0.59$) (Table 1).

In total, 191 (8.5%) of 2260 thoraces of *An. gambiae* analysed in the two regions by ELISA-CSP were positive for *P. falciparum* CS antigen ($Is=8.5\%$). For *An. coluzzii*, 172 (8.9%) of 1922 thoraces were positive for *P. falciparum* CS antigen ($p=0.60$) (Table 1).

Contribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* to malaria transmission expressed in terms of the EIR

The intensity of the malaria transmission due to each species is expressed in terms of EIR, which is equal to ma times the sporozoite rate. As the ma parameter depends on the season, the EIR due to each species was assessed for the dry season when ma is expected to be low and for the rainy season when ma is expected to be high.

In both the Alibori and Donga regions, *An. coluzzii* accounts for most malaria transmission during the dry

season. In Alibori, *An. coluzzii* accounts for 85.6% of malaria transmission during the dry season (EIR = 1.61 infected bite per man per month) compared to 14.3% (EIR = 0.27/month). In Donga, *An. coluzzii* and *An. gambiae* account for 78.8% (EIR = 3.20/month) and 20.2% (EIR = 0.81/month) of malaria transmission in the dry season, respectively (Fig. 3).

During the rainy season, *An. coluzzii* continues to account for most malaria transmission in the Alibori region as occurred during the dry season: *An. coluzzii* accounts for 64.8% (14.37 infected bites) of malaria transmission compared to 35.2% (7.81 infected bites) for *An. gambiae* (Table 2). However, in the Donga region, inverted results were observed showing a higher EIR due to *An. gambiae* (77.7%: EIR = 26.25 infected bites/month) as compared to *An. coluzzii* (Fig. 4). When cumulated data, which were registered during the 7 months of the study, the observed EIR trend during the dry season was confirmed due to the high ma of *An. coluzzii* during this period: the EIR of *An. coluzzii* was 2 times higher than

Table 1 Percentage of *P. falciparum* circumsporozoite antigen in *An. coluzzii* and *An. gambiae* during the dry and the rainy seasons

Regions	Species		Dry season (May–Jun–Jan–Feb)	p-value	Rainy season (Jul–Aug–Oct)	p-value	Total	p-value
Alibori	<i>An. gambiae</i>	Thorax	54	0.426	575	0.096	629	0.55
		Thorax+	5		42		47	
		Is (%)	9.26		7.30		7.47	
		IC-95% [IS %]	[3.07–20.30]		[5.31–9.75]		[5.54–9.81]	
	<i>An. coluzzii</i>	Thorax	384		649		1033	
		Thorax+	21		66		87	
Donga	<i>An. gambiae</i>	Is (%)	5.47	0.002	10.17	1	8.42	0.59
		IC-95% [IS %]	[3.41–8.24]		[7.95–12.76]		[6.80–10.28]	
		Thorax	247		1384		1631	
		Thorax+	12		132		144	
	<i>An. coluzzii</i>	Is (%)	4.86		9.54		8.83	
		IC-95% [IS %]	[2.53–8.33]		[8.04–11.21]		[7.49–10.31]	
Alibori-Donga	<i>An. gambiae</i>	Thorax	520	0.252	369	0.389	889	0.607
		Thorax+	50		35		85	
		Is (%)	9.62		9.49		9.56	
		IC-95% [IS %]	[7.22–12.48]		[6.69–12.94]		[7.7–11.69]	
	<i>An. coluzzii</i>	Thorax	301		1959		2260	
		Thorax+	17		174		191	
	<i>An. gambiae</i>	Is (%)	5.65	0.252	8.88	0.389	8.45	0.607
		IC-95% [IS %]	[3.32–8.89]		[7.65–10.23]		[7.33–9.67]	
	<i>An. coluzzii</i>	Thorax	904		1018		1922	
		Thorax+	71		101		172	
	<i>An. coluzzii</i>	Is (%)	7.85		9.92		8.94	
		IC-95% [IS %]	[6.18–9.80]		[8.15–11.92]		[7.71–10.31]	

p = p-value of comparison of CircumSporozoite (CS) antigen index for *Plasmodium falciparum* of *An. gambiae* and *An. coluzzii*

Jun June, Jul July, Aug August, Oct October, Jan January, Feb February

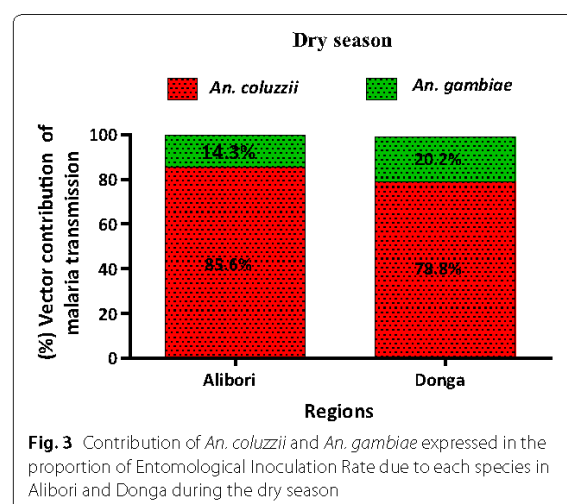


Fig. 3 Contribution of *An. coluzzii* and *An. gambiae* expressed in the proportion of Entomological Inoculation Rate due to each species in Alibori and Donga during the dry season

An. gambiae in Alibori ($p = 0.0043$) and 2 times lower in Donga ($p = 0.000084$) (Fig. 5).

Indoor and outdoor biting behaviour of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*

More than 2400 *An. gambiae* collected by HLC and analysed by PCR showed that, the biting behaviour of *An. gambiae* and *An. coluzzii* was variable according to the location (indoors or outdoors). Out of 1302 *An. gambiae* collected by HLC in Alibori and Donga, 57.7% (752/1302) were collected indoors compared to 42.3% (550/1302) outdoors ($p < 0.001$) (Table 3). As for *An. coluzzii*, a similar biting behaviour was observed indoors and outdoors with respectively: 51.6% (575/1114) and 48.4% (539/1114) of specimens ($p = 0.13$), after cumulating data of both regions (Table 3). During the dry season, the biting behaviour of *An. coluzzii* was higher indoors with 56.4% (216/383) of specimens as compared to outdoors (43.6%) ($p = 0.0004$). In the same season, the biting behavior was similar indoors and outdoors ($p = 0.25$) for *An. gambiae* (Table 3).

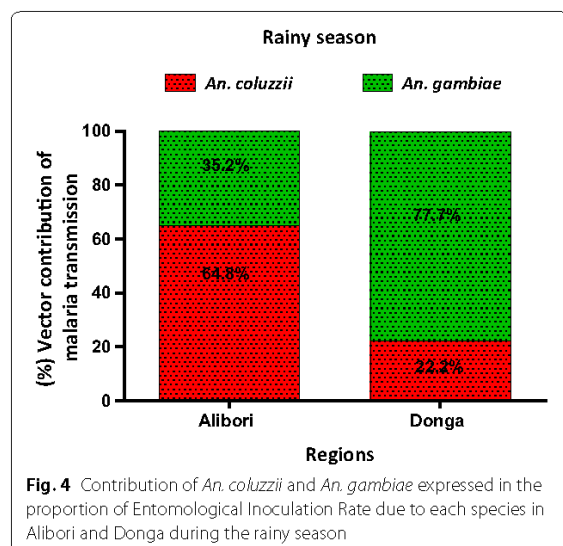
Table 2 Malaria transmission expressed in terms of Entomological Inoculation Rate (EIR) in *An. coluzzii* and *An. gambiae* in Alibori and Donga

Regions	Species		Dry season (May–Jun–Jan–Feb)	p-value	Rainy season (Jul–Aug–Oct)	p-value	Total	P-value
Alibori	<i>An. gambiae</i>	Thorax	12	0.125	362	0.016	374	0.0043
		Thorax+	1		25		26	
		Is (%)	8.33		6.91		6.95	
		ma/month	3.21		113.12		53.94	
		EIR/month	0.27		7.81		3.74	
	<i>An. coluzzii</i>	Thorax	135		446		581	
		Thorax+	6		46		52	
		Is (%)	4.44		10.31		8.95	
		ma/month	36.16		139.37		83.79	
		EIR/month	1.61		14.37		7.49	
Donga	<i>An. gambiae</i>	Thorax	147	0.03	846	0.000054	993	0.000084
		Thorax+	3		84		87	
		Is (%)	2.04		9.93		8.76	
		ma/month	1.31		264.37		143.22	
		EIR/month	0.810		26.25		12.54	
	<i>An. coluzzii</i>	Thorax	214		257		471	
		Thorax+	12		24		36	
		Is (%)	5.607		9.339		7.643	
		ma/month	57.32		80.31		67.93	
		EIR/month	3.20		7.50		5.19	

Italic values indicate significance of p value ($p < 0.05$)

p = p-value of comparison of *CircumSporozoite* (CS) antigen index for *Plasmodium falciparum* of *An. gambiae* and *An. coluzzii*

Jun June, Jul July, Aug August, Oct October, Jan January, Feb February



During the rainy season, the trend was reversed with a similar biting behaviour indoors and outdoors ($p = 0.5$) for *An. coluzzii* and, a higher indoor biting behaviour for *An. gambiae* (Table 3).

Blood feeding rate and anthropophagic index

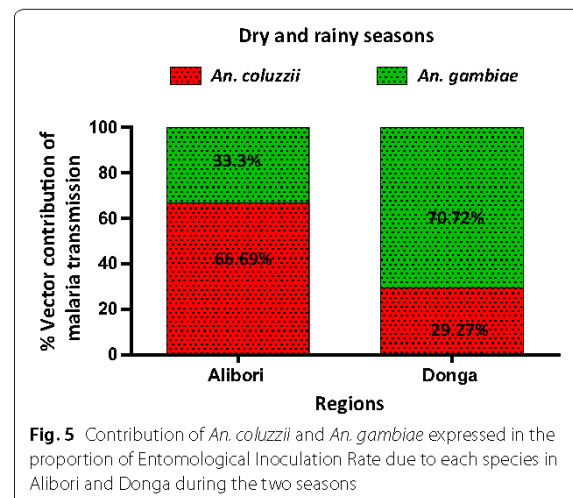
With PSC performed in bedrooms, a significant higher blood feeding rate [96.68% (846 of fed and half-gravid females out of 875 total females)] was observed in *An. gambiae* as compared to *An. coluzzii* [90.20% (792/878)] ($p < 0.0001$) (Table 4). A high and similar anthropophagic index (0.97) was observed for both species with 34/35 *An. gambiae* specimens and 33/34 *An. coluzzii* having fed on humans ($p = 0.98$).

Frequency of *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations

A total of 557 females of *An. gambiae* and 423 *An. coluzzii* were analysed for L1014F *kdr* mutation and G119S mutation (*ace-1* gene) using PCR–RFLP [14]. The frequency of the 2 mutations is higher in *An. gambiae* (0.82 for *kdr* and 0.03 for *ace-1*) than in *An. coluzzii* (0.73 for *kdr* and 0.01 for *ace-1*) (Table 5).

Discussion

In Africa, vector surveillance is an integral component to the planning, implementation, monitoring, and the evaluation of vector control interventions. To assist with this



goal, the current study was initiated in an area of Benin targeted for an IRS campaign to provide baseline data that could be used to help evaluate the impact and efficacy of IRS in the future.

Anopheles gambiae complex is the most important malaria vector in sub-Saharan Africa and has 4 species that occur in West Africa: *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. arabiensis* and *An. melas* [4–8]. In the area investigated by the current study only 2 species maintain malaria transmission: *An. gambiae* and *An. coluzzii*. Both species are present year-round with a strong predominance of *An. coluzzii* in dry season. Despite the 2 study areas having a similar climate, there was a disparity in the distribution of the 2 species during the rainy season with a strong

occurrence of *An. coluzzii* in the Alibori region compared with the Donga region. The low proportions of *An. gambiae* in the dry season may be due to temporary breeding sites that dry up, in addition to the presence of permanent and semi-permanent breeding sites more favourable to the development of *An. coluzzii* larvae.

Despite the large number of *An. gambiae* s.s. specimens (more than 4000) collected by HLC and PSC that were analysed by PCR, no *An. arabiensis* was found. Only one specimen of *Anopheles nili* was morphologically identified in Alibori and Donga. The absence of *An. arabiensis* in the study area could be due to the exophilic and zoophilic behaviour of this species and to its gradual disappearance in some environments in West Africa [4, 16], particularly in northern Benin [6]. Indeed, in 1992, Akogbeto [2] reported its presence in sympatry with *An. gambiae* s.s. in northern Benin, but in 2010, Aikpon et al. [17] reported its disappearance in the same region.

The overall biting rate of *An. gambiae* and *An. coluzzii* was not higher outdoors than indoors in both the rainy and dry seasons, which suggests an important role for ITNs in the effort to prevent malaria. However, despite the presence of ITNs in houses in the study area, *An. gambiae* s.s. maintained a high index of human-vector contact as indicated by high human biting rates, which could be a result of its resistance to the pyrethroid insecticides used to treat bed nets.

The significant higher blood feeding rate observed in *An. gambiae* as compared to *An. coluzzii* indoors ($p < 0.0001$) would be likely due to a higher ability of *An. gambiae* to bite and feed on humans inside houses. Indeed, the collected HLC data show an overall more pronounced indoor man-vector contact in *An. gambiae*

Table 3 Number of *An. gambiae* and *An. coluzzii* collected indoors and outdoors by HLC

	Seasons	Species	Indoors	Outdoors	p-value
Alibori	Dry season	<i>An. gambiae</i> (N)	7	7	–
		<i>An. coluzzii</i> (N)	59	74	–
	Rainy season	<i>An. gambiae</i> (N)	212	164	–
		<i>An. coluzzii</i> (N)	256	176	–
Donga	Dry season	<i>An. gambiae</i> (N)	60	51	–
		<i>An. coluzzii</i> (N)	157	93	–
	Rainy season	<i>An. gambiae</i> (N)	472	329	–
		<i>An. coluzzii</i> (N)	103	196	–
Both regions	Dry season	<i>An. gambiae</i> [% (N/T)]	53.6% (67/125)	46.4% (58/125)	0.25
		<i>An. coluzzii</i> [% (N/T)]	56.4% (216/383)	43.60% (167/383)	0.0004
	Rainy season	<i>An. gambiae</i> [% (N/T)]	58.11% (684/1177)	41.88% (493/1177)	< 0.001
		<i>An. coluzzii</i> [% (N/T)]	49.11% (359/731)	50.88% (372/731)	0.5
Both regions	Both seasons	<i>An. gambiae</i> [% (N/T)]	57.7% (751/1302)	42.3% (551/1302)	< 0.001
		<i>An. coluzzii</i> [% (N/T)]	51.6% (575/1114)	48.4% (539/1114)	0.13

Italic values indicate significance of p value ($p < 0.05$)

N number of species collected in one location (indoors or outdoors), *T* total number of species collected in both locations (indoors + outdoors)

Table 4 Blood feeding rate of *An. gambiae* and *An. coluzzii* collected by PSC method in Alibori and Donga

Regions	<i>An. gambiae</i>					<i>An. coluzzii</i>					p-value		
	Total collected	Unfed	Fed	Gravid	Half-gravid	Blood feeding rate (%)	Total collected	Unfed	Fed	Gravid		Half-gravid	Blood feeding rate (%)
Alibori	235	5	216	3	11	96.6	460	20	358	35	47	88.04	0.0003
Donga	640	13	604	8	15	96.72	418	11	347	20	40	92.58	0.003
Both regions	875	18	820	11	26	96.68	878	31	705	55	87	90.20	<0.0001

Italic values indicate significance of p value (p<0.05)

p-value: p-value of comparison of the feeding rate of *An. gambiae* to that of *An. coluzzii* by region

Table 5 Distribution of Knock-down resistance (*Kdr*) and *Ace-1R* frequencies in *An. gambiae* and *An. coluzzii* in Alibori and Donga

Regions	Species	Number tested	Mutation <i>Kdr</i> L1014F					Mutation <i>Ace 1R</i>				
			RR	RS	SS	F (<i>Kdr</i>)	p-value	RR	RS	SS	F (<i>Ace 1</i>)	p-value
Alibori	<i>An. gambiae</i>	170	123	34	13	0.82	0.0024	0	10	160	0.03	0.1381
	<i>An. coluzzii</i>	271	143	90	38	0.69		0	7	264	0.01	
Donga	<i>An. gambiae</i>	387	272	93	22	0.82	0.153	0	20	367	0.03	0.2981
	<i>An. coluzzii</i>	152	102	34	16	0.78		0	4	148	0.01	
Total	<i>An. gambiae</i>	557	395	127	35	0.82	0.0032	0	30	527	0.03	0.0483
	<i>An. coluzzii</i>	423	245	124	54	0.73		0	11	412	0.01	

Italic values indicate significance of p value ($p < 0.05$)

p = p-value of comparison of the frequencies *Kdr* and *Ace-1* between *An. gambiae* and *An. coluzzii*

(56.6%: 751/1326) as compared to *An. coluzzii* (43.4%: 575/1326) ($p < 0.0001$). This result is similar to that obtained in Ghana by Tuno et al. [18] who showed that *An. gambiae* bit people inside dwellings more than did *An. melas*.

The fact that, the majority ($\geq 90\%$) of *An. coluzzii* and *An. gambiae* collected indoors were blood-fed with a high and similar anthropophagic index (0.97), mirrors results from similar studies [17, 19–23]. As a result of both species having similar attractions to humans, *An. gambiae* and *An. coluzzii* had similar sporozoitic indexes at 8.5 and 8.9%, respectively ($p = 0.60$). This result is reminiscent of that of Carnevale et al. [24] who showed the same infection rate in *An. coluzzii* and *An. gambiae* in Lobito, Angola. Given the similar affinity for humans and the large number of specimens (more than 4000) examined through ELISA-CSP, it is likely that *An. gambiae* and *An. coluzzii* have the same ability to offer a physicochemical environment suitable for the development of the parasite during the sporogonic cycle.

By taking into account the fact that vector capacity of a population of *Anopheles* depends on several factors, in particular, the ability to foster the development of the sporogonic cycle, the contribution of *An. coluzzii* and *An. gambiae* to malaria transmission was expressed in terms of the sporozoitic index (*s*) and the frequency of human-vector contacts (*ma*). Based on the calculated EIRs, *An. coluzzii* is involved in 85.6% of malaria transmission in Alibori and 78.8% of transmission in the Donga during the dry season, compared to only 14.4 and 21.2% for *An. gambiae* in Alibori and Donga, respectively. Further, during the rainy season *An. coluzzii* continues to account for most malaria transmission in Alibori (64.8% compared to 35.2% for *An. gambiae*), but the role is reversed in Donga during the rainy season with a higher contribution toward

malaria transmission from *An. gambiae* (65.7% compared to 34.3% for *An. coluzzii*). The variation in abundance of each vector species from one season to another could explain this. Indeed, Alibori and Donga regions are crossed by several rivers and water dams that create throughout the year (rainy and dry seasons), permanent and semi-permanent breeding sites suitable for the development of *An. coluzzii* larvae. In addition, the Donga region is characterized by a clayey type soil, which retains water, allowing then the formation of numerous temporary breeding sites favourable to the emergence of *An. gambiae* as leading vector of malaria transmission in the rainy season. By against, in Alibori, the sandy type soil causes the quick infiltration of water and as a result, fewer temporary larval habitats are formed, which justifies that *An. coluzzii* coming from permanent and semi-permanent breeding sites continues to play the major role in malaria transmission during the rainy season in this region. As observed in Donga from dry to rainy season, the switch of the mosquito species that leads malaria transmission has also been reported in Lobito, Angola from 2005 to 2006 and, the suspected causes were environmental anthropic modifications (installation of water cisterns that disrepair over time and are used as dumps, reduction of some artificial larval habitats types favourable to *An. gambiae*) [24].

There have been numerous reports of resistance to pyrethroid throughout Africa [25–30]. In Benin, the resistance of malaria vectors to pyrethroids observed first in Cotonou spread not only to central and southern regions of the country, but also to the northern parts [31–38]. The lower frequency of *kdr* L1014F mutation in *An. coluzzii* in Alibori could favour the impact of ITNs and result in better control of malaria in Alibori compared to Donga. However, if pirimiphos methyl (organophosphate) is used again for IRS in the

study area as it was in previous years, a positive impact could be expected because of the very low level (0.01–0.03) of the *ace-1* mutation in both species.

Conclusion

Anopheles coluzzii and *An. gambiae* have been observed to have the same anthropophagic and sporozoite rates in the 2 regions. However, *An. coluzzii* is highly involved in malaria transmission in Alibori and Donga during the dry season as compared to *An. gambiae*. During the rainy season *An. coluzzii* was still playing the leading role in Alibori whereas, in Donga, this role is reversed with a stronger participation of *An. gambiae*. Overall, the blood feeding rate was higher in *An. gambiae* than in *An. coluzzii*. Moreover, data collected reveal *An. coluzzii* is characterized by lower frequencies of the *ace-1* mutation than is *An. gambiae*. But, a good impact on malaria control in Alibori and Donga is expected if pirimiphos methyl (organophosphate) is used again for IRS in Benin as in previous years, because of the very low level of the *ace-1* mutation in both species.

Authors' contributions

MCA, ASS, FD and RA designed the study. AS, ASS and RA carried out the experiments. MCA drafted the manuscript. FD, MS, MK and AS critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ³ US President's Malaria Initiative, US Agency for International Development, Cotonou, Benin. ⁴ Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques, Abomey, Benin. ⁵ PMI VectorLink Project, Abt associates, Bamako, Mali.

Acknowledgements

The research leading to these results was financially supported by The President's Malaria Initiative of the US Government. We acknowledge The President's Malaria Initiative through USAID Cotonou, Benin. We also thank Monica Patton, Peter Thomas and Raymond Beach of the US Centers of Disease Control and Prevention for providing technical support and proofreading the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The data used and/or analysed in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The protocol of this study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of CREC (IECC). Before mosquito collectors were involved in this study, they gave their consent to participate. They were vaccinated against yellow fever, regularly checked up by a medical doctor and taken care in case of confirmed malaria case.

Funding

This study was financially supported by the US President's Malaria Initiative (PMI) thru the United States Agency for International Development (USAID) Africa Indoor Residual Spraying Project (AIRS) Project.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 20 May 2018 Accepted: 9 August 2018

Published online: 22 August 2018

References

- Coetzee M, Hunt H, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibali MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*. 2013;3619:246–74.
- Akogbéto M. Etude des aspects épidémiologiques sur la transmission du paludisme côtier lagunaire au Bénin, Afrique de l'Ouest. Thèse de doctorat ès-sciences, Université de Paris XI, Centre d'Orsay; 1992.
- Awolola T, Oyewole I, Koekemoer L, Coetzee M. Identification of three members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group and their role in malaria transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005;99:525–31.
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptations to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73:483–97.
- Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bollettino di Zoologia*. 1985;52:45–63.
- Akogbéto M, Di Deco MA. Répartition des membres du complexe *Anopheles gambiae* et leurs variants chromosomiques au Bénin et au Togo, Afrique occidentale. *J Afr Zool*. 1995;109:443–54.
- Akogbéto M, Laugé G, Di Deco MA. Observation sur la bioécologie de *Anopheles melas* dans un milieu côtier lagunaire, Bénin, Afrique occidentale. *J Afr Zool*. 1995;109:399–406.
- Fontenille D, Traoré-Lamizana M, Cornet JP, Adam F, Lochouart L. Activités du laboratoire ORSTOM de Zoologie Médicale. Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Dakar; 1993.
- Faye O, Gaye O, Fontenille D, Sy N, Konaté L, Bebrard G, et al. Comparaison de la transmission du paludisme dans deux faciès épidémiologiques au Sénégal: la zone côtière sahélienne et la zone méridionale soudanienne. *Dakar Médical*. 1995;40:201–7.
- Salako SA, Aikpon R, Akogbeton MC. Surveillance entomologique en prélude à la mise en œuvre de la pulvérisation intradomestique dans l'Alibori et la Donga. USAID/CREC; Rapport Final; 2016.
- Aikpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Oké M, Oussou O, Oké-Agbo F, et al. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC Indoor Residual Spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasit Vectors*. 2014;7:256.
- Gillies MT, de Meillon B. The anophelinae of Africa, south of the Sahara. Johannesburg: The South African Institute for Medical Research; 1968. p. 343.
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ*. 1967;65:39–45.
- 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.
- Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity*. 1995;86:248–9.
- Touré TY. Génétique écologique et capacité vectorielle des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Mali. Thèse de doctorat d'Etat ès-sciences, Université Ex-Marseille, France; 1985.
- Aikpon R, Ossè R, Govoétchan R, Sovi A, Oké-Agbo F, Akogbéto M. Entomological baseline data on malaria transmission and susceptibility of *Anopheles gambiae* to insecticides in preparation for Indoor Residual Spraying (IRS) in Atacora, (Benin). *J Parasitol Vector Biol*. 2013;5:102–11.
- Tuno N, Kjaerandsen J, Badu K, Kruppa T. Blood-Feeding Behavior of *Anopheles gambiae* and *Anopheles melas* in Ghana, Western Africa. *J Med Entomol*. 2010;47:28–31.
- Padonou GG, Gbedjissi G, Yadouleton A, Azondekon R, Razack O, Oussou O, et al. Decreased proportions of indoor feeding and endophily in

- Anopheles gambiae* s.l. populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa). *Parasit Vectors*. 2012;5:262.
20. Ototo EN, Mbigi JP, Wanjala CL, Zhou G, Githeko AK, Yan G. Surveillance of malaria vector population density and biting behavior in Western Kenya. *Malar J*. 2015;14:244.
 21. Padonou GG, Sezonlin M, Gbedjissi GL, Ayi I, Azondekon R, Djenontin A, et al. Biology of *Anopheles gambiae* and insecticide resistance: entomological study for a large scale of indoor residual spraying in south east Benin. *J Parasitol Vector Biol*. 2012;4:59–68.
 22. Aikpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aizoun N, Oké-Agbo F, et al. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors*. 2013;6:192.
 23. Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Ossè R, Oke-Agbo F, Azondekon R, et al. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar J*. 2014;13:444.
 24. Carnevale P, Toto JC, Besnard P, Dos Santos MA, Fortes F, Allan R, et al. Spatio-temporal variations of *Anopheles coluzzii* and *An gambiae* and their *Plasmodium* infectivity rates in Lobito. Angola. *J Vect Ecol*. 2015;40:172–9.
 25. Nwane P, Etang J, Chouaibou M, Toto JC, Kera-hinzoumbe C, Mimp-foundi R, et al. 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.
 26. Camara S, Koffi AA, Ahoua Alou LP, Koffi K, Kabran JK, Koné A, et al. Mapping insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. from Côte d'Ivoire. Mapping insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. from Côte d'Ivoire. *Parasit Vectors*. 2018;11:19.
 27. Mathias DK, Ochomo E, Atieli F, Ombok M, Nabie Bayoh M, Olang G, et al. Spatial and temporal variation in the *kdr* allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in western Kenya. *Malar J*. 2011;10:10.
 28. Hien AS, Soma DD, Hema O, Bayili B, Namountougou M, Gnankiné O, et al. Evidence that agricultural use of pesticides selects pyrethroid resistance within *Anopheles gambiae* s.l. populations from cotton growing areas in Burkina Faso, West Africa. *PLoS ONE*. 2017;12:e0173098.
 29. Olé Sangba ML, Sidick A, Govoetchan R, Dide-Agossou C, Ossè RA, Akogbeto M, et al. Evidence of multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* populations in Bangui, Central African Republic. *Parasit Vectors*. 2017;13(10):23.
 30. Djègbè I, Akoton R, Tchigossou G, Ahadji-Dabla KM, Atoyebi SM, Adéoti R, et al. First report of the presence of L1014S Knockdown-resistance mutation in *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles coluzzii* from Togo. West Africa. *Wellcome Open Res*. 2018;3:30.
 31. Sovi A, Govoetchan R, Tokponnon F, Hounkonnou H, Aikpon R, Agossa F, et al. Impact of land-use on malaria transmission in the Plateau region, southeastern Benin. *Parasit Vectors*. 2013;6:352.
 32. Gnanguenon V, Agossa FR, Badiou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, et al. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved. *Parasit Vectors*. 2015;8:223.
 33. Yahouédo GA, Cornélius S, Djègbè I, Ahlonsou J, Aboubakar S, Soares C, Akogbéto M, Corbel V. Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasit Vectors*. 2016;9:385.
 34. Akogbeto MC, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, Osse R, Agossa FR, et al. Six years of experience in entomological surveillance of indoor residual spraying against malaria transmission in Benin: lessons learned, challenges and outlooks. *Malar J*. 2015;14:242.
 35. Akogbéto M, Yakoubou S. Résistance des vecteurs du paludisme vis-à-vis des pyrèthrinoides utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires au Bénin, Afrique de l'Ouest. *Bull Soc Path Exot*. 1999;92:123–30.
 36. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou-Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia*. 1999;41:319–22.
 37. Corbel V, N'guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*. 2007;101:207–16.
 38. Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J*. 2009;8:103.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Chapitre 2. Statut de résistance aux insecticides chez *Anopheles gambiae* s.l. dans l'Alibori et la Donga.

2.1. Présentation de l'étude

La large expansion de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes (Akogbéto & Yakoubou, 1999) et aux carbamates (Djogbénou *et al.*, 2011 ; Aïkpon *et al.*, 2013a) constitue une grande menace pour le succès des programmes de lutte anti - vectorielle à base d'insecticide contre le paludisme. En 2007, N'Guessan *et al.* (2007a) ont fait état de la baisse de l'efficacité des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes en cases expérimentales à Ladjì, zone à forte résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes située au Sud du Bénin. Des études portant sur la résistance aux insecticides conduites dans certaines régions du Bénin (Akogbéto & Yakoubou, 1999 ; Yadouleton *et al.*, 2010; Djogbénou *et al.*, 2011; Djègbè *et al.*, 2011 ; Gnanguenon *et al.*, 2015) ont confirmé la présence du phénomène et son évolution dans le temps et dans l'espace. Dans ce contexte de recherche d'alternatives pour pallier à la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes en Afrique, deux mécanismes font depuis un bon moment l'objet d'une recherche soutenue. Il s'agit de la résistance métabolique qui s'exprime par une augmentation de l'activité des enzymes de détoxification (Oxydases, Estérases et Glutathion-s-transférases) (Etang *et al.*, 2003; Corbel *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2012) et de la résistance liée au gène *Kdr L1014F* fréquemment retrouvée dans les populations de *An. gambiae* s.l. au Bénin (Martinez- Torres *et al.*, 1998; Chandre *et al.*, 1999 ; Ranson *et al.*, 2000 ; Awolola *et al.*, 2005 ; Djogbenou *et al.*, 2011) et qui est due à la substitution de la leucine par la phénylalanine à la position 1014. Cette présence du gène *Kdr* associée à la surproduction des enzymes métaboliques, et l'apparition récente des populations d'anophèles résistantes aux carbamates imposent la nécessité de mener des études sur les mécanismes de résistance et les facteurs de sélection impliqués avant la mise en œuvre d'une quelconque stratégie de lutte anti-vectorielle.

Au Bénin, le programme de pulvérisation intradomiciliaire a prévu en 2017, un traitement de toutes les maisons des départements de l'Alibori et de la Donga avec un insecticide de la famille des organophosphorés ou des carbamates en raison de la résistance généralisée aux pyréthrinoïdes. La même année, le pays a connu une distribution à grande échelle des MIILDs organisée par le PNLP et ses partenaires (USAID, Fonds Mondial, OMS). Très peu d'informations récentes sont disponibles sur les bases génétiques de la résistance (notamment les mécanismes métaboliques) chez *An. gambiae* s.l. dans ces deux régions du Bénin. En prélude à la mise en œuvre de ces deux campagnes de lutte, la présente étude a été initiée afin de collecter des données sur la dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides dans les deux départements ciblés. Ces données de base ont permis d'opérer le choix de l'insecticide, candidat potentiel pour la PID et aussi de définir les stratégies à mettre en œuvre pour une gestion efficace de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides.

2.2. Statut de résistance aux insecticides chez *Anopheles gambiae* s.l. dans l'Alibori et la Donga

Publié à Parasites & vectors

Cette étude a pour but de rechercher les différents mécanismes impliqués dans la résistance des moustiques aux insecticides. Une brève synthèse de l'étude est donnée ici et, les détails publiés dans l'article peuvent être consultés à la fin de la synthèse.

2.2.1. Contexte de l'étude

La surveillance de la résistance des vecteurs aux insecticides constitue une composante majeure de la gestion de la résistance. Elle permet la prise de décisions éclairées sur le choix des insecticides pour la stratégie de lutte à adopter. Cette étude a pour but d'apporter des informations sur la dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides dans les départements de l'Alibori et de la Donga où une campagne de pulvérisation intradomiciliaire est programmée.

2.2.2. Objectifs de l'étude

Cette étude vise à fournir des données de base sur le statut de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides, la fréquence des mutations impliquées et l'impact des synergistes piperonyl butoxide (PBO) sur les populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. dans les départements de l'Alibori et de la Donga, au nord du Bénin, avant la campagne de pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide et d'introduction des MILDs de la nouvelle génération.

2.2.3. Méthodologie

Les adultes de *Anopheles gambiae* s.l. issus des larves collectées dans deux départements : Kandi-Gogounou-Segbana dans le département de l'Alibori et Djougou-Copargo-Ouaké dans le département de la Donga ont été testés avec papiers imprégnés suivants : bendiocarb (0,1%), pirimiphos-méthyle (0,25%), perméthrine (0,75%) et deltaméthrine (0,05%). Le synergiste PBO a été utilisé pour évaluer l'implication des enzymes de détoxification dans la résistance des populations vectrices aux pyréthrinoïdes. Des analyses moléculaires ont été effectuées pour l'identification des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l. et la présence des mutations *kdr L1014F* et *G119S Ace-1*. Des tests biochimiques ont évalué l'activité des enzymes de détoxification.

2.2.4. Résultats & et principaux points discutés

Anopheles gambiae s.l. était résistant aux pyréthrinoïdes, avec une mortalité comprise entre 25 et 83% pour la deltaméthrine et entre 6 et 55 % pour la perméthrine. Une augmentation significative de la mortalité a été observée après une pré-exposition au PBO aussi bien pour la deltaméthrine (63-99%) que pour la perméthrine (56-99%). Avec le bendiocarb, les populations de *An. gambiae* s.l. de

Kandi étaient sensibles (99%) mais une suspicion de résistance a été observée (92-95%) à Djougou, Copargo, Gogounou, Ouake et Segbana. Toutes les populations de moustiques testées étaient pleinement sensibles au pirimiphos-méthyl. Les fréquences des mutations de résistance variaient suivant les espèces et les sites: 67 – 88% pour la mutation *kdr L1014F* et 0 – 6% pour la mutation *Ace-1 G119S*. La surexpression des oxydases a été observée sur trois sites (Djougou, Gogounou et Kandi) alors que quatre sites (Djougou, Ouake, Copargo et Kandi) ont montré une activité plus élevée des estérases.

2.2.5. Conclusion

Cette étude confirme la résistance aux pyréthrinoïdes et suggère l'émergence de la résistance au bendiocarb dans les populations de *An. gambiae* s.l. au nord du Bénin. Cependant, la restauration de la sensibilité des vecteurs aux pyréthrinoïdes après l'exposition aux synergistes PBO et leur sensibilité aux organophosphorés indiquent que les MILDs de la nouvelle génération incorporant le synergiste PBO associées, à des campagnes de pulvérisation intradomiciliaire à base d'insecticides de la classe des organophosphorés pourraient être efficace dans le contrôle des vecteurs une stratégie efficace.

RESEARCH

Open Access



Insecticide resistance status, frequency of L1014F *Kdr* and G119S *Ace-1* mutations, and expression of detoxification enzymes in *Anopheles gambiae* (s.l.) in two regions of northern Benin in preparation for indoor residual spraying

Albert Sourou Salako^{1,2*}, Idelphonse Ahogni^{1,2}, Rock Aikpon^{1,3}, Aboubakar Sidick¹, Fortune Dagnon⁴, Arthur Sovi⁵, André Aimé Sominahouin^{1,6}, Fiacre Agossa¹, Laurent Iyikirenga⁷ and Martin C. Akogbeto¹

Abstract

Background: This study aims to provide baseline data on the resistance status to insecticides, the frequency of mechanisms involved and the impact of the association with the synergist piperonyl butoxide (PBO) on resistant *Anopheles gambiae* (s.l.) populations in two regions of northern Benin, prior to an indoor residual spraying campaign and introduction of next generation long-lasting insecticidal nets (LLINs) incorporating PBO.

Methods: Adult *Anopheles gambiae* (s.l.) originating from larvae collected in two study regions (Alibori within the Kandi-Gogounou-Segbana districts and Donga within the Djougou-Copargo-Ouake districts) were tested with impregnated papers (bendiocarb 0.1%, pirimiphos-methyl 0.25%, permethrin 0.75% and deltamethrin 0.05%). The synergist PBO was used to check for the involvement of detoxification enzymes in pyrethroid resistant populations. Molecular analyses were performed for the identification of species within the *Anopheles gambiae* (s.l.) complex and *kdr* L1014F and G119S *Ace-1* mutations. Biochemical assays assessed the activity of detoxification enzymes.

Results: *Anopheles gambiae* (s.l.) was resistant to pyrethroids, with a mortality range of 25–83% with deltamethrin and 6–55% with permethrin. A significant increase in mortality was observed after pre-exposure to PBO for both deltamethrin (63–99%) and permethrin (56–99%). With bendiocarb, *An. gambiae* (s.l.) were susceptible in Kandi (99% mortality), with possible resistance (92–95%) recorded in Djougou, Copargo, Gogounou, Ouake and Segbana. All study populations were fully susceptible to pirimiphos-methyl. The frequencies of resistant mutations varied according to species and sites: 0.67–0.88 for L1014F *kdr* and 0–0.06 for G119S *Ace-1*. Three study locations (Djougou, Gogounou and Kandi) showed high oxidase activity and four sites (Djougou, Ouake, Copargo and Kandi) showed elevated esterase activity.

(Continued on next page)

* Correspondence: albertsourousalako@yahoo.fr

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

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

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



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: This study confirms resistance to pyrethroids and suggests emerging bendiocarb resistance in *An. gambiae* (s.l.) populations in northern Benin. However, recovery of susceptibility to pyrethroids after PBO exposure, and susceptibility to organophosphates in the *An. gambiae* (s.l.) populations indicate that next generation LLINs incorporating PBO synergist combined with an indoor residual spraying (IRS) campaign with organophosphate insecticides may be regarded as alternative control tools.

Keywords: Resistance, *Anopheles gambiae* (s.l.), IRS, Benin

Background

Vector control is an essential component in malaria prevention strategies [1]. In Africa, it relies primarily on two effective and complementary tools: long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS) [2–4]. Several studies have demonstrated the effectiveness of both tools in reducing the incidence of malaria [5, 6] morbidity and mortality in Africa [7–10]. In Benin, malaria vector control relies mainly on the mass distribution of LLINs, and on IRS operations. From 2008 to 2015, IRS with bendiocarb (a carbamate) in southern Benin and with pirimiphos-methyl (an organophosphate) in the northern region, showed a significant reduction in malaria transmission [11, 12]. Although LLINs and IRS have been shown to be effective, they have performed below expectations in some settings, including several locations in Benin [13–15]. One of the reasons is the emergence and expansion of resistance of *Anopheles* vectors to insecticides, especially pyrethroids [16–23] and more recently bendiocarb [24–26]. The main insecticide resistance mechanisms involve an increase in the activity of detoxification enzymes (oxidases, esterases and glutathione-S-transferases) [18, 19, 27, 28] and the *kdr* L1014F and G119S *Ace-1* target site mutations frequently found in *An. gambiae* (s.l.) populations [16, 29–31]. Studies suggest that the use of the same classes of insecticides in public health as well as in agriculture, especially in cotton cultivation, may have led to the increase in the allelic frequencies of the *kdr* L1014F and G119S *Ace-1* in Benin [22, 23, 25, 26, 32, 33]. In Benin, the IRS program implemented in 2017 targeted all houses in the regions of Alibori and Donga with pirimiphos-methyl. In the same year, the Benin national malaria control program (NMCP), supported by USAID, Global Fund and the WHO, undertook large-scale distribution of Yorkool LLINs impregnated with deltamethrin. In preparation for the implementation of these two control campaigns, the present study was initiated to collect data on the resistance of vectors to insecticides in the two targeted regions. These baseline data inform selection of insecticide candidates for IRS and help to define strategies for effective insecticide resistance management in the study area.

Methods

Study regions and mosquito sampling sites

The study was conducted during the rainy season (June to October 2016) in six districts of northern Benin. These six districts are grouped into two healthcare facility's catchment areas: the Kandi-Gogounou-Segbana health zone (KGS) located in the Alibori region and the Djougou-Copargo-Ouake health zone (DCO) in the Donga region. The general census of the population and housing carried out in May 2013 revealed estimated populations of 867,463 and 543,130 inhabitants in Alibori and Donga, respectively [34]. These two regions are located in a dry savanna area and in a dry and wet savanna area, respectively (Fig. 1). The Alibori region is crossed by several rivers and water dams and the soil is sandy. In the Donga region, the soil is clay.

Study areas

Kandi-Gogounou-Segbana (KGS) health zone

This area covers approximately 12,943 km² and is the largest health zone in Benin. It is composed of three districts: Kandi (11°07' to 29.32'N, 2°56' to 9.57'E), Gogounou (10°33' to 10°57'N, 2°15' to 3°15'E) and Segbana (10°32' to 11°23'N, 3°08' to 3°50'E) (Fig. 1). It is recognized as the cotton cultivation area of northern Benin, with large quantities of insecticides used to control cotton pests [35]. Its climate is Sudanese with two seasons a year: a single rainy season from May to October and a dry season from November to April. The mean temperature and relative humidity are about 28 °C and 70%, respectively. Rainfall varies between 700–1200 mm with heavy rainfall recorded between July and September [36].

Djougou-Copargo-Ouake (DCO) health zone

This health zone covers an area of 5465 km² and is composed of three districts: Djougou (09°42' to 10°1'N, 01°40' to 55°4'E), Copargo (09°50' to 19°3'N, 01°32' to 39°5"E) and Ouake (09°40' to 45.3'N, 01°22' to 51°7'E) (Fig. 1). In this zone, Djougou is the district where cotton cultivation is highly developed with a high use of insecticide [35]. It has a Sudano-Guinean climate with two seasons. The rainy season extends over 6 months (from mid-April to mid-October). The average rainfall is

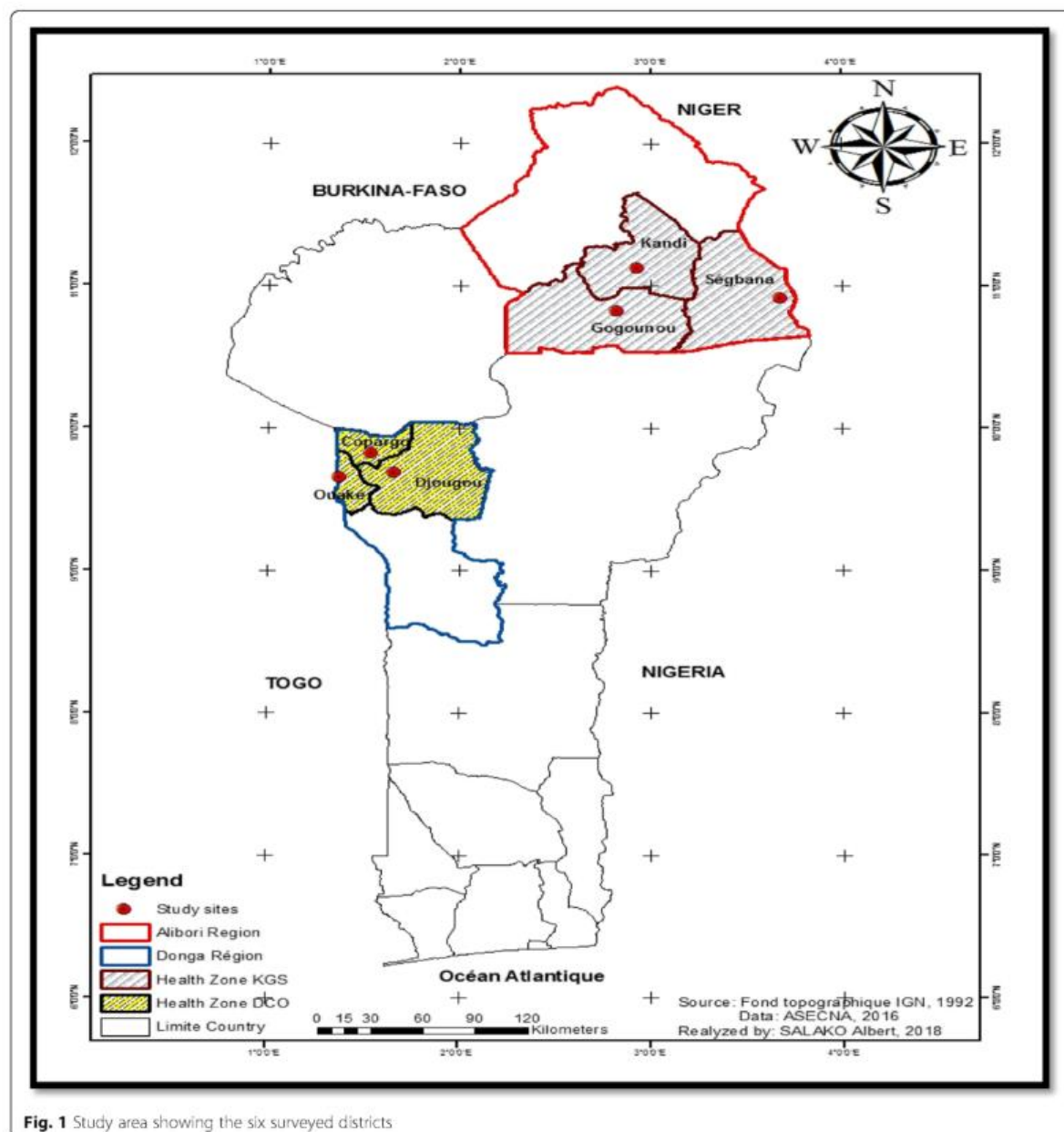


Fig. 1 Study area showing the six surveyed districts

between 1200–1300 mm. The mean temperature is around 27 °C. The main crops are yam, cereal and cotton [37].

Mosquito collections

Larvae of *Anopheles* mosquitoes were collected in breeding sites using the dipping technique. Larvae and pupae were collected from various breeding sites (e.g. rain water collection, irrigation channels, river beds, wells, etc.), so that the mosquitoes tested were fully representative of the vector population in the area.

Insufficient numbers of larvae were collected at Segbana and Ouake to perform all of the susceptibility bioassay tests. Species were identified using a morphological key [38].

Insecticide susceptibility tests

Susceptibility tests were performed using the WHO tube bioassay test [39]. The following insecticides and synergist were tested: deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), deltamethrin (0.05%) + PBO (4%), permethrin

(0.75%) + PBO (4%), bendiocarb (0.1%), and pirimiphos-methyl (0.25%).

The PBO synergist was used to evaluate the involvement of detoxification enzymes (oxidases and esterases) [40] in the phenotypic resistance of the populations of *An. gambiae* (*s.l.*) of each district.

About 100 adult female mosquitoes were exposed to each insecticide, tested in 4 replicates each of *c.*25 mosquitoes. In addition, 50 mosquitoes served as controls in 2 replicates of *c.*25 mosquitoes. Knockdown was recorded at 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 min. All tests were conducted at 25 °C and 80% humidity.

Mortality after 24 h was determined and interpreted according to the WHO protocol [39]. At the end of the tests, live and dead specimens from each district were used for species identification and determination of resistance mechanisms (*kdr* L1014F, *kdr* L1014S and *G119S Ace-1*) using PCR methods.

According to the site, 72–270 individuals randomly selected from live and dead mosquitoes from susceptibility tests were analyzed according to the protocol of Santolamazza et al. [41] to determine species within the *An. gambiae* (*s.l.*) complex. The same mosquitoes were genotyped for the *kdr* L1014F, *kdr* L1014S and *G119S Ace-1* mutations, according to the protocols of Martinez-Torres et al. [29], Ranson et al. [30] and Weill et al. [42], respectively.

Biochemical analyses

Thirty females of *An. gambiae* (*s.l.*) from each district of the KGS and DCO health zones, aged 2–5 days and which were not previously used for any insecticidal test, were used for biochemical analyses. Biochemical assays were performed to compare the level of activities of mixed function oxidases (MFOs), non-specific esterases (α and β -esterases) and glutathione S-transferases (GSTs) [43] of the different field mosquito populations to the Kisumu susceptible strain. All mosquitoes were tested according to the protocol described by Hemingway et al. [44]. Oxidase activity was assessed with the heme-peroxidase test which allowed detection of the increase in the quantity of heme. Alpha-Naphthol acetate (α Naph) (Sigma N-1000, Saint Louis, Missouri, USA) and Beta-Naphthol acetate (β Naph) (Sigma N-185507) were used to evaluate the non-specific esterase activity. GST activity was determined by measuring in time the formation of the Glutathione-S-CDNB at 340 nm after a catalysis reaction between the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and reduced glutathione (GSH).

Data analysis

Any mosquito population with a mortality rate between 98–100% was considered susceptible. When mortality was between 90–97%, the population was suspected of

resistance. Below a 90% mortality rate, the population was considered resistant. The mortality rates of populations of *An. gambiae* (*s.l.*) were compared using a Chi-square test of comparison of proportions. The allelic frequencies of *kdr* L1014F and *G119S Ace-1* were calculated as follows: $F(R) = [2n.RR + n.RS] / [2(n.RR + n.RS + n.SS)]$ [45] (*n.* is the number of mosquitoes of a given genotype), to assess their variability across populations. A linear regression with variance analysis was used to assess the variation of enzymatic activity in each locality. Mann-Whitney U-test was used to compare enzyme activity between field- and laboratory-susceptible mosquitoes (Kisumu). Statistical analyses were performed with software R 3.3.2 [46].

Results

Mortality rates of *An. gambiae* (*s.l.*)

With pirimiphos-methyl, the mortality rates observed in all tested populations were 100%, thus showing full susceptibility (Fig. 2a).

The mortality rate observed with bendiocarb in Kandi was 98.88% (Fig. 2b), which shows susceptibility of this mosquito population. In the other five districts, possible resistance was observed with mortality rates varying from 92.63% in Ouake to 95.23% in Djougou (Fig. 2b).

All populations of *An. gambiae* (*s.l.*) from the surveyed districts, were found to be resistant to permethrin with mortality rates ranging from 6.06% in Djougou to 55.1% in Copargo (Fig. 3a). In Djougou, Kandi, Gogounou and Copargo, the mortality rates increased from 6.06, 9.09, 44.21 and 55.1%, respectively, with permethrin alone to 93.93% ($\chi^2 = 149.41$, $df = 1$, $P < 0.0001$), 57.57% ($\chi^2 = 50.205$, $df = 1$, $P < 0.0001$), 82.52% ($\chi^2 = 53.269$, $df = 1$, $P < 0.0001$) and 99.02% ($\chi^2 = 53.269$, $df = 1$, $P < 0.0001$) with permethrin + PBO (Fig. 3a).

All populations tested were resistant to deltamethrin with mortality rates ranging from 25.27% (Djougou) to 83.14% (Gogounou) (Fig. 3b). With pre-exposure to PBO, an increase in susceptibility to deltamethrin was noted. At Copargo, Gogounou, Djougou, Kandi and Segbana, mortality rates increased from 79.2, 83.14, 25.27, 41.41 and 60%, respectively, with deltamethrin alone to 99.06% ($\chi^2 = 19.613$, $df = 1$, $P = 0.0009$), 98.03% ($\chi^2 = 11.23$, $df = 1$, $P = 0.0008$), 93.20% ($\chi^2 = 109.04$, $df = 1$, $P < 0.0001$), 63.10% ($\chi^2 = 8.675$, $df = 1$, $P = 0.0322$) and 85.71% ($\chi^2 = 15.967$, $df = 1$, $P = 0.0064$) with deltamethrin + PBO (Fig. 3b).

Distribution of sibling species of the *Anopheles gambiae* complex by site and in dead and live mosquitoes

Out of the 1163 specimens of *An. gambiae* (*s.l.*) analyzed by PCR in the two investigated health zones, 55.46% were *An. gambiae* and 44.54% *An. coluzzii*. Overall, *An. coluzzii* was predominant in Kandi and Ségbana with a mean of 61.6% in the KGS health zone as compared to

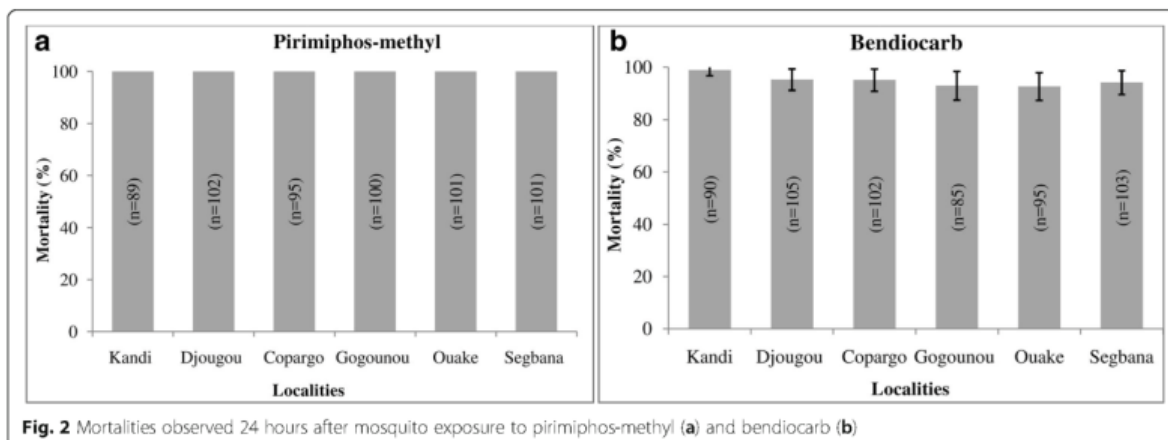


Fig. 2 Mortalities observed 24 hours after mosquito exposure to pirimiphos-methyl (a) and bendiocarb (b)

An. gambiae (38.4%). In the DCO health zone, *An. gambiae* was in majority in all three districts (Djoungou, Copargo and Ouaké) with a mean of 68.92% compared to *An. coluzzii* (31.08%) (Table 1).

Overall, in Kandi, Gogounou and Segbana, mortality occurred mostly in *An. coluzzii* as compared to *An. gambiae* ($\chi^2 = 13.357$, $df = 1$, $P = 0.0003$ and $\chi^2 = 13.837$, $df = 1$, $P = 0.0002$, for bendiocarb and deltamethrin, respectively) in the KGS health zone (Table 2). By contrast, in the DCO health zone, mortality occurred similarly in *An. gambiae* and *An. coluzzii* ($\chi^2 = 1.456$, $df = 1$, $P = 0.227$ for bendiocarb; $\chi^2 = 0.482$, $df = 1$, $P = 0.487$ for permethrin; and $\chi^2 = 0.0359$, $df = 1$, $P = 0.849$ for deltamethrin) (Table 2).

Distribution of L1014F *kdr* and G119S *Ace-1* mutations in *An. gambiae* and *An. coluzzii*

Tables 3 and 4 show the distribution of the frequency of the *kdr* L1014F and G119S *Ace-1* mutations in *An. gambiae*

and *An. coluzzii* in the six surveyed districts. Overall, the mean frequency of the *kdr* L1014F gene at all districts was 0.77. These frequencies were higher in *An. gambiae* than in *An. coluzzii* at all sites with a significant difference between the frequencies of the two sibling species at Kandi and Gogounou (Table 3). The *kdr* L1014S resistant allele was not detected in our samples.

The G119S *Ace-1* mutation was identified in all districts at very low frequency (between 1–6%) (Table 4). It varied from 2 to 6% in *An. gambiae* and from 0 to 2% in *An. coluzzii* (Table 4) with a significant difference between both species when all sites were combined.

Expression of oxidases, esterases and GSTs in *An. gambiae* (s.l.)

Figures 4 and 5 display the mean levels of enzymatic activities in field mosquito populations and the Kisumu reference susceptible strain. In all investigated districts,

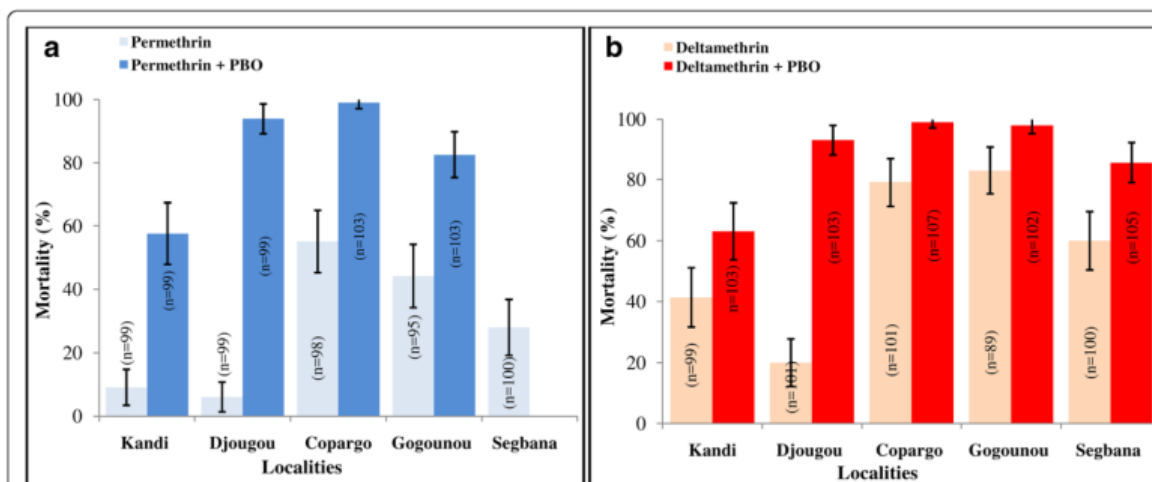


Fig. 3 Mortality rates of *An. gambiae* (s.l.) with permethrin alone and permethrin + PBO (a), deltamethrin alone and deltamethrin + PBO (b) in the surveyed districts, 24 hours after exposure

Table 1 Distribution of *An. coluzzii* and *An. gambiae* in the KGS and DCO health zones

Health zone	District	Total no. tested	<i>An. coluzzii</i>		<i>An. gambiae</i>		χ^2 -value	df	P-value ^a
			n	%	n	%			
KGS	Kandi	266	180	67.67	86	32.33	65.03	1	<0.001
	Gogounou	175	91	52	84	48	0.4114	1	0.5212
	Segbana	72	45	62.5	27	37.5	8.027	1	0.004
	Total (KGS)	513	316	61.60	197	38.40	54.28	1	<0.001
DCO	Djouougou	269	101	37.55	168	62.45	32.38	1	<0.001
	Copargo	270	51	18.89	219	81.11	206.59	1	<0.001
	Ouake	111	50	45.05	61	54.95	1.801	1	0.179
	Total (DCO)	650	202	31.08	448	68.92	184.69	1	<0.001
Grand total		1163	518	44.54	645	55.46	27.302	1	<0.001

^a% *An. coluzzii* vs % *An. gambiae*

at least one class of detoxification enzyme revealed elevated activity relative to the Kisumu strain. Oxidase activity was significantly elevated in the districts of Djougou (Mann-Whitney U-test, $U = 48.50$, $P < 0.0001$), Gogounou ($U = 149.5$, $P < 0.0001$) and Kandi ($U = 280.5$, $P < 0.0001$) compared to the Kisumu strain (Fig. 4a). The highest glutathione-S-transferase (GST) activities were observed in the Copargo and Gogounou populations with a significant difference compared to the Kisumu strain ($U = 312$, $P = 0.0009$ and $U = 151.1$, $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 4b).

The activity of α esterases was higher in the populations of Djougou ($U = 369$, $P = 0.009$), Ouake ($U = 190$, $P = 0.0014$) and Kandi ($U = 322$, $P = 0.0005$) compared to the Kisumu strain (Fig. 5a). Significantly elevated β esterase activities were observed in Djougou ($U = 265.5$, $P = 0.0001$), Ouake ($U = 157$, $P = 0.0002$), Copargo ($U = 357$, $P = 0.0055$) and Kandi ($U = 144$, $P < 0.0001$) compared to the Kisumu strain (Fig. 5b).

Discussion

Monitoring is an integral part of any resistance management strategy which allows informed decisions about the choice of insecticides [47]. The present study shows confirmed resistance of malaria vectors to deltamethrin and permethrin (pyrethroids), increased susceptibility to pyrethroids through the use of PBO, decreased susceptibility to bendiocarb in some districts and full susceptibility to pirimiphos-methyl.

The predominance of *An. coluzzii* in Alibori could be due to the presence of rivers and water dams that create numerous permanent and semi-permanent larval habitats conducive to the emergence of this mosquito species. In addition, the sandy soil of the region may cause a fast infiltration of water after rainfall, which would favor the formation of only very few temporary breeding sites. By contrast, the clay soil in Donga retains water after rainfall and, as a result, several temporary larval habitats could be

formed, thus allowing the development of *An. gambiae* which was in majority in this region.

In the present study, levels of resistance to permethrin and deltamethrin observed after recording the 24-h mortality rates varied between districts. Pyrethroid resistance in *An. gambiae* (s.l.) observed in the present study confirms findings of previous studies carried out in Benin [22, 23, 25]. The lowest mortality rates to pyrethroids were observed in the districts of Kandi, Djougou and Segbana. This could be due to the strong selection pressure exerted by the large-scale cotton production [35]. The wide distribution and high level of malaria vectors' resistance to pyrethroids might be due to the expansion of agriculture [48, 49] and the mass use of pyrethroid-treated mosquito nets, distributed at the national level over past years [50, 51]. As mortality occurred mostly in the predominant species (*An. coluzzii*) in the KGS health zone but was similar in each species in the DCO health zone, no conclusion can be drawn on a higher susceptibility to insecticides between the species.

Overall, *An. gambiae* (s.l.) was resistant to pyrethroids and displayed high frequencies of the *kdr* L1014F mutation in all surveyed districts. The *kdr* L1014F frequency was higher in *An. gambiae* than in *An. coluzzii* in most localities, which confirms the recent findings of Gnanguenon et al. [26] and Yahouédo et al. [52] in some sites located on the north-south axis of Benin. Several previous studies have also shown that frequencies of *kdr* L1014F are higher in *An. gambiae* in west and central Africa compared to *An. coluzzii* [41, 53], except for some urban and peri-urban coastal areas [54]. In addition to *kdr* L1014F that could compromise the effectiveness of vector control tools such as LLINs and IRS [55], the involvement of mono-oxygenases in pyrethroids resistance in our study sites has also been noted since the level of vector resistance to deltamethrin and permethrin was significantly reduced by the use of PBO. These oxidases are involved in the detoxification of pyrethroids in *Anopheles gambiae*

Table 2 Number of *An. coluzzii* and *An. gambiae* in dead and live mosquitoes from the KGS and DCO health zones

Health Zone	District	Total no. tested	Bendiocarb		Permethrin		Deltamethrin		Pirimiphos-methyl	
			<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. gambiae</i>
			Dead (n)	Live (n)	Dead (n)	Live (n)	Dead (n)	Live (n)	Dead (n)	Live (n)
KGS	Kandi	266	53	0	8	58	34	27	7	31
	Gogounou	175	28	2	16	15	24	6	20	8
	Segbana	72	15	0	5	9	15	1	2	6
	Total (KGS)	513	96	2	29	82	73	34	29	45
	Proportion (%)		97.9	2.1	26.1	73.9	68.2	31.8	39.2	60.8
DCO	Djouguou	269	35	0	4	28	13	21	8	46
	Copargo	270	18	1	14	4	13	1	59	18
	Ouale	111	41	2	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	Total (DCO)	650	94	3	18	32	26	22	67	64
	Proportion (%)		96.9	3.1	36.0	64.0	54.2	45.8	100	100

Abbreviation: nt, no mosquitoes tested by PCR to identify species

Table 3 Frequencies of the *kdr* L1014F mutation observed in *An. gambiae* and *An. coluzzii*

District	Species	No. tested	Genotype			Freq. 1014F	χ^2 -value	df	P-value
			1014F/F	1014L/F	1014L/L				
Kandi	<i>An. gambiae</i>	86	57	19	10	0.773	7.043	1	0.0079
	<i>An. coluzzii</i>	180	86	64	30	0.656			
Gogounou	<i>An. gambiae</i>	84	66	15	3	0.875	5.924	1	0.0149
	<i>An. coluzzii</i>	91	57	26	8	0.769			
Segbana	<i>An. gambiae</i>	27	15	9	3	0.722	0.260	1	0.609
	<i>An. coluzzii</i>	45	22	16	7	0.667			
Djougou	<i>An. gambiae</i>	168	114	41	13	0.801	2.534	1	0.111
	<i>An. coluzzii</i>	101	63	23	15	0.738			
Copargo	<i>An. gambiae</i>	219	158	52	9	0.840	0.440	1	0.506
	<i>An. coluzzii</i>	51	39	11	1	0.873			
Ouake	<i>An. gambiae</i>	61	44	11	6	0.811	3.770	1	0.0521
	<i>An. coluzzii</i>	50	27	15	8	0.690			
Total	<i>An. gambiae</i>	645	454	147	44	0.818	32.599	1	<0.0001
	<i>An. coluzzii</i>	518	294	155	69	0.717			

Abbreviation: Freq., frequency

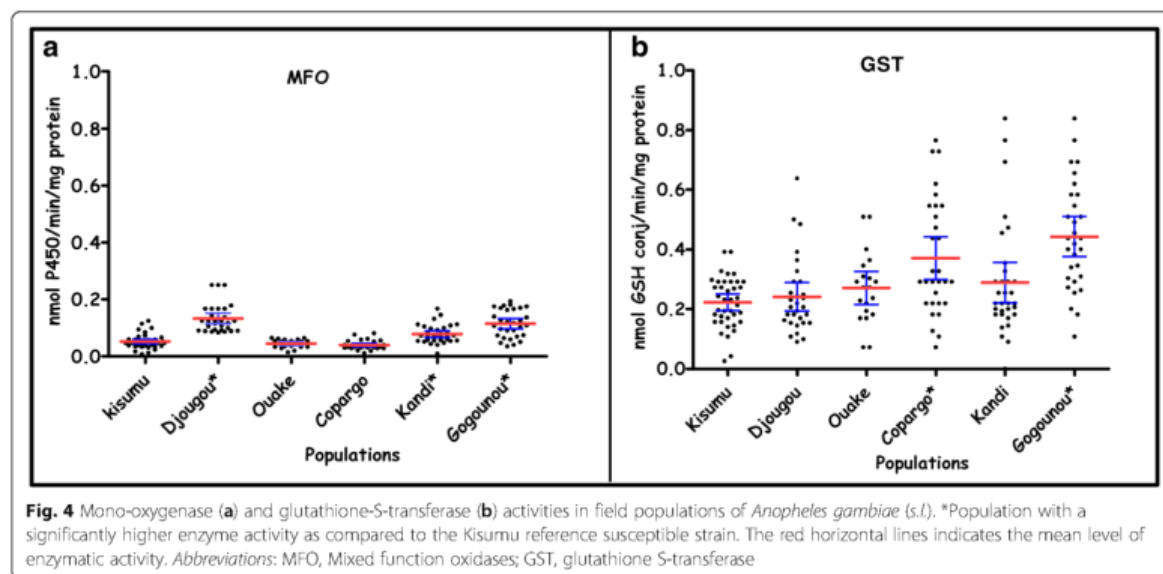
(*s.l.*) [56, 57]. Moreover, our biochemical data have revealed their overexpression in *An. gambiae* (*s.l.*) in Djougou, Gogounou and Kandi. This result is similar to that obtained by Djouaka et al. [27] in natural populations of *An. funestus* (*s.l.*) in Pahou and confirms the works of Djègbè et al. [22] and Aizoun et al. [24] at Kandi and Malanville, respectively, two sites of northern Benin near our study area. The simultaneous presence of *kdr* L1014F and elevated oxidase activity could confer higher resistance in mosquitoes. In these conditions, the use of PBO

LLINs (Permanet 3.0 nets and Olyset Plus mosquito nets) associated with a pirimiphos-methyl-based IRS could be implemented for effective malaria vector control in Alibori and Donga, two regions selected to receive both interventions. Indeed, a recent study carried out by Protopopoff et al. [58] in Tanzania reported a better performance of the strategy combining PBO LLINs and IRS with pirimiphos-methyl on malaria transmission as compared to standard LLINs, in pyrethroids resistance areas. The high activity of glutathione-S-transferases in the wild

Table 4 Frequencies of the *Ace1* G119S mutation observed in *An. gambiae* and *An. coluzzii*

District	Species	No. tested	Genotype			Freq. 119S	χ^2 -value	df	P-value
			119S/S	119G/S	119G/G				
Kandi	<i>An. gambiae</i>	86	0	4	82	0.0233	0.179	1	0.671
	<i>An. coluzzii</i>	180	0	5	175	0.0139			
Gogounou	<i>An. gambiae</i>	84	0	6	78	0.0357	1.412	1	0.234
	<i>An. coluzzii</i>	91	0	2	89	0.011			
Segbana	<i>An. gambiae</i>	27	0	3	24	0.0556	2.746	1	0.0974
	<i>An. coluzzii</i>	45	0	0	45	0			
Djougou	<i>An. gambiae</i>	168	0	10	158	0.0298	0.178	1	0.672
	<i>An. coluzzii</i>	101	0	4	97	0.0198			
Copargo	<i>An. gambiae</i>	219	0	10	209	0.0228	1.282	1	0.257
	<i>An. coluzzii</i>	51	0	0	51	0			
Ouake	<i>An. gambiae</i>	61	0	2	59	0.0164	<0.0001	1	1
	<i>An. coluzzii</i>	50	0	1	49	0.01			
Total	<i>An. gambiae</i>	645	0	35	610	0.0271	6.252	1	0.0124
	<i>An. coluzzii</i>	518	0	12	506	0.0116			

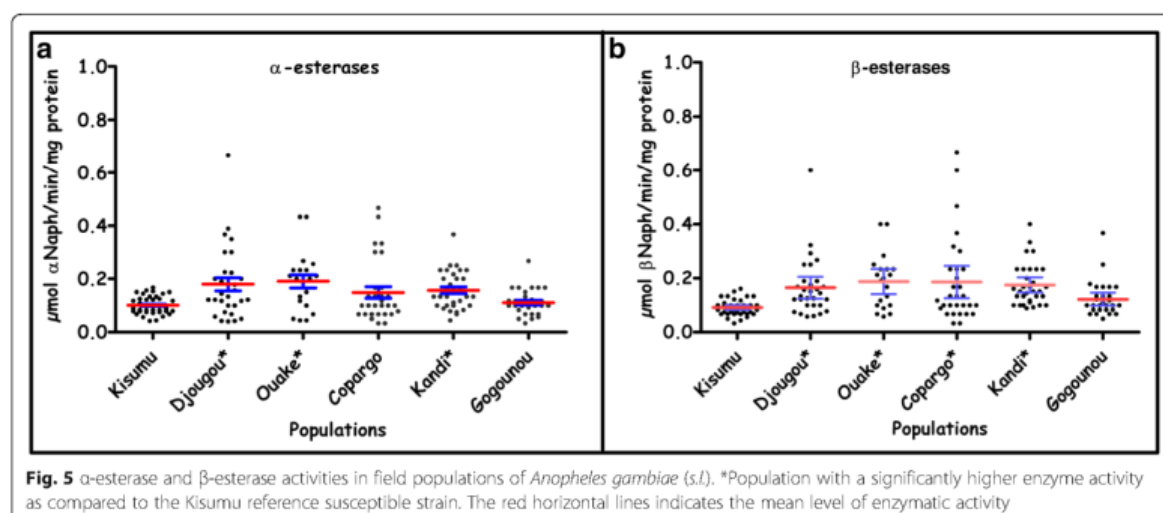
Abbreviation: Freq., frequency



populations of *An. gambiae* (s.l.) in the districts of Copargo and Gogounou could play a minor role in the resistance to pyrethroids due to the oxidative stress [59]. Other studies attribute this overexpression of GSTs to the resistance of *An. gambiae* (s.l.) to DDT [19]. In such case, in the presence of *kdr* L1014F, GSTs could increase phenotypic resistance to pyrethroids and DDT and broaden the spectrum of resistance to independent compounds [60].

The possible resistance to bendiocarb (carbamate) and the low frequencies of the G119S *Ace-1* observed in our study sites was also previously reported by Djenontin et al. [61]. This start of resistance to bendiocarb and the observed presence of some heterozygous (RS) individual mosquitoes for the G119S *Ace-1R* mutation is worrying

given several studies have shown that this insecticide represents a potential alternative to pyrethroids for the management of resistance [62, 63]. The highest frequencies of G119S *Ace-1R* were found in *An. gambiae* (2–6%) and the lowest in *An. coluzzii* (0–2%). These results corroborate those obtained by Aikpon et al. [25] and Gnanguenon et al. [26] in the Atacora and Kandi districts of Benin, respectively. However, even though the G119S *Ace-1* mutation is often incriminated in vectors resistant to carbamates and organophosphates, it does not fully explain the observed possible resistance to bendiocarb, because some susceptible homozygous individuals survive after exposure to this carbamate [54]. Susceptibility of *An. gambiae* (s.l.) to pirimiphos-methyl observed in our study



area confirms the findings of Asidi et al. [64] which showed that the presence of G119S *Ace-1* does not confer a systematic resistance to organophosphates.

Conclusions

With high pyrethroid resistance, overexpression of some metabolic enzymes (MFO, GST) and the high *kdr* L1014F allelic frequencies observed in *An. gambiae* (s.l.) in the KGS and DCO health zones, IRS with pirimiphos-methyl - for which full susceptibility was detected - is recommended for control. Furthermore, the increased susceptibility level of vectors to pyrethroids after pre-exposure to PBO suggests that implementation of PBO-treated LLINs (Permanet 3.0 and OlysetPlus) could be a productive strategy to replace conventional LLINs in the two targeted regions.

Abbreviations

IRS: indoor residual spraying; USAID: United States agency for international development; WHO: world health organization; LLIN: long lasting insecticidal nets; NMCP: national malaria control program; MFO: mixed function oxidases; GST: glutathione S-transferase; PBO: piperonyl butoxide

Acknowledgements

We are grateful to the President's Malaria Initiative which financially supported this study. We thank Bruno Akinro for statistical analysis. We would also like to acknowledge Monica Patton, Peter Thomas and Raymond Beach of CDC who provided technical support to the study and critically revised the manuscript.

Funding

This study was financially supported by the US President's Malaria Initiative (PMI) through the United States Agency for International Development (USAID) Africa Indoor Residual Spraying Project (AIRS).

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included within the article. The raw data used and/or analyzed in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

ASS, LI, FA, RA and MCA conceived the study. ASS, LI, FA and MCA participated in the design of the study. ASS, IA, SA, FA and AAS collected entomological data. ASS, SA, FA and AAS carried out bioassays and laboratory analysis. ASS and MCA drafted the manuscript. FA, AS, RA, LI, FD and MCA critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin.

²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi,

Abomey-Calavi, Benin. ³Technologies, Ingénierie et Mathématiques,

Université Nationale des Sciences, Abomey, Bénin. ⁴US Agency for

International Development, US President's Malaria Initiative, Cotonou, Benin.

⁵PMI VectorLink project, Abt associates, Bamako, Mali. ⁶Faculté des Sciences

Humaines et Sociales de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ⁷PMI VectorLink project, Abt associates, Cotonou, Benin.

Received: 14 May 2018 Accepted: 30 October 2018

Published online: 04 December 2018

References

1. WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management. Geneva: World Health Organization; 2012.
2. Chavasse DC, Yap HH, World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization; 1997.
3. Curtis CF, Minzava AE, Misra S, Rowland M. Malaria control: bednets or spraying? Summary of the presentations and the discussion. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93:460.
4. Okumu FO, Moore SJ. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malar J.* 2011;10:208.
5. Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2:CD000363.
6. Pless B, Tanser FC, Lengeler C, Sharp BL. Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;4:CD006657.
7. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong JR, Conteh M, Hill AG, David PH, et al. The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. *Lancet.* 1991;337:1499–02.
8. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong Schellenberg JR, Keita K, Gomez P, Shenton FC, et al. A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, West Africa. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;2:37–44.
9. D'Alessandro U, Olaleye BO, McGuire W, Langerock P, Bennett S, Aikins MK, et al. Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet.* 1995;345:479–83.
10. Binka FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengeler C, Maude GH, et al. Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial *Trop Med Int Health.* 1996;1:147–54.
11. Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:586–93.
12. Akogbeto MC, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, Osse R, Agossa FR, et al. Six years of experience in entomological surveillance of indoor residual spraying against malaria transmission in Benin: lessons learned, challenges and outlooks. *Malar J.* 2015;14:242.
13. 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;13:199–06.
14. Kelly-Hope L, Ranson H, Hemingway J. Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:387–9.
15. 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;27:91–8.
16. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. Current distribution of pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parassitologia.* 1999;41:319–22.
17. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol.* 2000;14:181–9.
18. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpoundi R, et al. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera:Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J Med Entomol.* 2003;40:491–7.
19. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin. *West Africa. Acta Trop.* 2007;101:207–16.
20. Yadouleton A, Asidi A, Djouaka R, Braima J, Agossou C, Akogbeto M. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J.* 2009;8:103.

21. Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, et al. Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Trop*. 2010;114:116–22.
22. Djegbe I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, et al. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J*. 2011;10:261.
23. Sovi A, Djegbe I, Soumanou L, Tokponnon F, Gnanguenon V, Azondekon R, et al. Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltamethrin in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs). *BMC Infect Dis*. 2014;14:103.
24. Aizoun N, Aikpon R, Gnanguenon V, Oussou O, Agossa F, Padonou GG, et al. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae sensu lato* from the south and north Benin, West Africa. *Parasit Vectors*. 2013;6:274.
25. Aikpon R, Agossa F, Ossé R, Oussou O, Aizoun N, Oké-Agbo F, et al. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors*. 2013;6:192.
26. Gnanguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, et al. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved. *Parasit Vectors*. 2015;8:223.
27. Djouaka R, Irving H, Tukur Z, Wondji CS. Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *PLoS One*. 2011;6:e27760.
28. Mitchell SN, Stevenson BJ, Müller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG, et al. Identification and validation of a gene causing cross resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:6147–52.
29. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroids knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.s.* *Insect Mol Biol*. 1998;7:179–84.
30. Ranson H, Jensen B, Vulule J, Wang X, Hemingway J, Collins F. 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;9:491–7.
31. Awolola TS, Oyewole IO, Amajoh CN, Idowu ET, Ajayi MB, Oduola A, et al. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Trop*. 2005;95:204–5.
32. Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, et al. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroids resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit Vectors*. 2011;4:60.
33. Djogbenou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol*. 2011;25:256–67.
34. INSAE. RGPH4 : Que retenir des effectifs de population en 2013 au Bénin? <https://www.insae-bj.org/images/docs/insae-statistiques/demographiques/population/Resultats%20definitifs%20RGPH4.pdf>. Accessed 21 Oct 2018.
35. Ton P. La production du coton au Bénin. 2004. http://www.slire.net/download/1889/la_production_du_coton_au_b_nin.pdf. Accessed 13 Oct 2018.
36. Ministère de la santé du Bénin. Annuaire des statistiques sanitaires 2013, zone sanitaire de Kandi-Gogounou-Segbana; 2014.
37. Ministère de la santé du Bénin. Annuaire des statistiques sanitaires 2014 des départements de l'Atacora et de la Donga; 2015.
38. Gillies MT, Coetzee MA. Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical region). *Pub South Afr Inst Med Res*. 1987;55:141–3.
39. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: World Health Organization; 2013.
40. Khot AC, Bingham G, Field LM, Moores GD. A novel assay reveals the blockade of esterases by piperonyl butoxide. *Pest Manag Sci*. 2008;64:1139–42.
41. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of *SINE200* retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J*. 2008;7:163.
42. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*. 2004;13:1–7.
43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
44. Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardena KGI, Ranson H. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998;353:1695–9.
45. Philip N. Support de cours de génétique des populations. Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Département de génétique médicale, Marseille, 2010–2011, page 6. http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique_2/site/html/cours.pdf. Accessed 22 August 2018.
46. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2011.
47. WHO. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance. Preserving the effectiveness of modern malaria vector control, meeting report, 4–6 May 2010. Geneva: World Health Organization; 2011.
48. Curtis CF, Maxwell CA, Finch RJ, Njunwa KJ. A comparison of use of pyrethroids either for house spraying or for bed net treatment against malaria vectors. *Trop Med Int Health*. 1998;3:619–31.
49. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemde TR, Darriet F, et al. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:617–22.
50. Czeher C, Labbo R, Arzika J, Duchemin J-B. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J*. 2008;7:189.
51. Protopopoff N, Van Bortel W, Marcotty T, Van Herp M, Maes P, Baza D, et al. Spatial targeted vector control is able to reduce malaria prevalence in the highlands of Burundi. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:12–8.
52. Yahouédo GA, Comelie S, Djégbé I, Ahlonsou J, Aboubakar S, Soares C, et al. Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large-scale implementation of vector control interventions. *Parasit Vectors*. 2016;9:385.
53. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*. 1999;67:231–4.
54. Tia E, Akogbeto M, Koffi A, Toure M, Adja AM, Moussa K, et al. Situation de la résistance d'*Anopheles gambiae s.s.* aux pyréthrinoides et aux DDT dans cinq écosystèmes agricoles de Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*. 2006;99:278–82.
55. Chouaibou M, Etang J, Brévault T, Nwane P, Pinzoumbé CK, Mimpfoundi R, et al. 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;4:476–86.
56. Miller TA. Mechanism of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today*. 1988;4:58–12.
57. Berge JB, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998;353:1701–5.
58. Protopopoff N, Mosha JF, Lukole E, Charlwood JD, Wright A, Mwalimu CD, et al. Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquitoes: a cluster, randomised controlled, two-by-two factorial design trial. *Lancet*. 2018;391:1577–88.
59. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34:653–65.
60. Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroids resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*. 2001;357:65–72.
61. Djénontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry M-C, Bousari O, Chabi J, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Quidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): a pre-intervention study. *Parasit Vectors*. 2010;3:83.
62. 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;15:105–12.
63. Djénontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Penetier C, Hougard J-M, et al. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J*. 2009;8:233.
64. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, et al. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J*. 2005;4:25.

Partie 2 : Données de mise en œuvre

Chapitre 3. Impact entomologique de la pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori et la Donga, au nord du Bénin.

3.1. Présentation de l'étude

Les interventions ciblant les vecteurs du paludisme sont considérées comme l'un des moyens les plus efficaces de prévention pouvant permettre l'élimination du paludisme à l'horizon 2030 selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2015). En Afrique, les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme mettent généralement en œuvre de bonnes stratégies de lutte antivectorielle. Malheureusement, malgré des réductions impressionnantes de la transmission du paludisme observées, il est reconnu que le manque d'évaluation et de surveillance systématique des vecteurs constituent une faiblesse pour de nombreux de ces programmes de lutte. La surveillance des vecteurs devrait avoir une importance accrue dans la planification, la mise en œuvre, le suivi et l'évaluation des interventions de lutte antivectorielle dans les zones caractérisées par de différents niveaux de transmission du paludisme.

Au Bénin, le plan stratégique national de lutte contre le paludisme prévoit une extension de la PID dans plusieurs autres régions du pays. Il est donc nécessaire de documenter l'impact épidémiologique et entomologique de l'intervention, afin d'orienter la prise de décisions sur la mise en œuvre future du programme.

En effet, plusieurs facteurs peuvent affecter l'efficacité de la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à savoir: la résistance des vecteurs aux insecticides, la qualité du traitement, l'activité résiduelle de l'insecticide, ainsi que le comportement des vecteurs (endophagie/exophagie, endophilie/exophilie, évitement comportemental des vecteurs) (WHO, 2015). De même, des études réalisées pour le choix des insecticides ayant une bonne efficacité résiduelle à utiliser pour la PID à grande échelle sont souvent menées soit au laboratoire, soit en cases expérimentales, ou dans des conditions de terrains bien contrôlées (N'Guessan *et al.*, 2010 ; Raeisi *et al.*, 2010 ; Sibanda *et al.*, 2011 ; Okumu *et al.*, 2012). Dans ces études pilotes, les opérateurs chargés de la pulvérisation sont souvent bien formés pour la cause. Les résultats de ces études peuvent ne pas refléter ce qui se passe lors d'une mise en œuvre à grande échelle où de grands groupes d'opérateurs de pulvérisation sont déployés avec une supervision non individuelle qui ne permet pas de faire un contrôle fin de l'opération.

Entre 2017 et 2018, le Bénin a connu deux tours de campagnes de PID dans les départements de l'Alibori et de la Donga avec Actellic 300 CS (organophosphoré). Dans un premier temps, nous avons étudié la biodisponibilité de cet insecticide utilisé pour le traitement des murs dans ces deux régions. A cet effet, des bio-essais ont été réalisés sur les murs traités pour évaluer non seulement la qualité du traitement mais aussi pour suivre l'effet résiduel de Actellic 300 CS sur les murs traités. Dans un second temps, en considérant la période d'efficacité résiduelle de l'insecticide, l'impact de cette intervention sur les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme a été mesuré.

3.2. Efficacité de Actellic 300 CS en pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori et la Donga

Publié à *Malaria journal*

Cette étude dont l'article est joint à la fin de cette brève synthèse a permis d'évaluer l'impact de la PID réalisée à grande échelle à base d'un insecticide organophosphoré (Actellic 300 CS) sur les indicateurs entomologique clés de la transmission du paludisme dans les deux départements cibles du Nord Bénin.

3.2.1. Contexte de l'étude

Avec l'appui du programme USAID/PMI, le Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) du Bénin a procédé à l'extension de la Pulvérisation Intradomiciliaire d'insecticide dans les départements de l'Alibori et la Donga au nord du Bénin depuis 2017. L'étude de l'impact épidémiologique et entomologique du programme de PID est importante pour apporter des éléments nécessaires à la prise de décision et, guider la mise en œuvre future du programme. La présente étude montre les résultats de deux ans de suivi entomologique de cette campagne dans les deux départements.

3.2.2. Objectifs de l'étude

Cette étude évalue l'impact entomologique de la PID suite à son utilisation à grande échelle pour protéger les populations des deux départements cibles au Bénin. Cette évaluation s'est concentrée sur la durée d'efficacité (rémanence) de l'insecticide sur les murs traités, la dynamique des populations de *Anopheles gambiae* s.l. et, le taux d'inoculation entomologique (TIE) dans les zones d'intervention par rapport aux zones témoin.

3.2.3. Méthodologie

Des collectes de moustiques ont été effectuées sur une base mensuelle par capture sur appât humain et après aspersion de bombes aérosols à l'intérieur des maisons (PSC) dans six communes dont quatre traitées avec Actellic 300CS (Kandi, Gogounou, Djougou et Copargo) et, deux non traitées (Bembèrèkè et Kouandé) qui ont servi de témoins. Ensuite, la densité de *Anopheles gambiae* s.l., son taux de gorgement, son infectivité au *Plasmodium falciparum*, sa longévité ainsi que son taux d'inoculation entomologique (TIE) ont été déterminés. L'activité résiduelle de Actellic 300 CS sur les murs traités a été évaluée à l'aide des tests en cônes OMS. La comparaison des indicateurs entre les zones PID et la zone témoin a été faite pendant la période de rémanence de l'insecticide afin de s'assurer que toute différence entre les deux zones peut être imputable à la présence de l'insecticide dans les cases traités.

3.2.4. Résultats & et principaux points discutés

La durée d'efficacité résiduelle de Actellic 300 CS estimée pour les deux campagnes de PID réalisée en 2017 & 2018 est d'environ 4 à 5 mois (Mai à Septembre) dans l'Alibori et la Donga. Pendant cette période, les taux de parturité et d'infectivité de *An. gambiae* s.l. au *Plasmodium falciparum* étaient respectivement de 36,62% et 0,71% après le premier tour de la PID dans la zone traitée contre 57,24% et 3,7% dans la zone témoin et, respectivement 48,36% et 0,6% après le deuxième tour de la PID contre 62,96% et 3% dans la zone témoin ($p < 0,0001$). Similairement, chaque personne recevait dans la zone traitée 1,6 piqûres infectantes/mois et 1,5 piqûres infectantes/mois contre 12,11 piqûres infectantes/mois et 9,75 piqûres infectantes/mois dans la zone témoin respectivement après le premier et deuxième tour de la PID, soit une réduction significative du TIE de 86,78% en 2017 et 84,61% en 2018. Une comparaison de ces indicateurs avant (juin-octobre 2016) et après le premier tour de la PID (juin-octobre 2017) a révélé une réduction du taux de parturité de *An. gambiae* s.l. de 46,26%, de l'indice sporozoitique de 85,75% et du TIE de 87,27%. Par ailleurs, la densité moyenne de *An. gambiae* s.l. se reposant par chambre traitée était comprise entre 0,38 et 0,48 contre 1,53 et 1,76 par chambre non traitée respectivement après le premier et le deuxième tour de PID.

3.2.5. Conclusion

Cette étude a montré l'impact positif de la PID dans la réduction des principaux paramètres entomologiques de la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga. Toutefois, le taux de gorgement et d'infectivité non négligeable de *An. gambiae* s.l. dans les zones de PID soulignent la nécessité pour la population de dormir sous les MIILDS dans les zones pulvérisées afin de réduire d'avantage le contact homme-vecteur.

RESEARCH

Open Access



Efficacy of Actellic 300 CS-based indoor residual spraying on key entomological indicators of malaria transmission in Alibori and Donga, two regions of northern Benin

Albert Sourou Salako^{1,2*}, Fortune Dagnon³, Arthur Sovi^{1,4,5}, Gil Germain Padonou^{1,2}, Rock Aikpon^{1,6}, Idelphonse Ahogni^{1,2}, Thomas Syme⁵, Renaud Govoétchan^{1,4}, Herman Sagbohan^{1,2}, André Aimé Sominahouin^{1,7}, Bruno Akinro¹, Laurent Iyikirenga⁸, Fiacre Agossa^{1,9} and Martin Codjo Akogbeto¹

Abstract

Background: The current study shows the results of three years of IRS entomological monitoring (2016, before intervention; 2017 and 2018, after intervention) performed in Alibori and Donga, northern Benin.

Methods: Mosquito collections were performed on a monthly basis using human landing catches and pyrethrum spray catches in six districts including four treated with Actellic 300 CS (Kandi, Gogounou, Djougou and Copargo) and two untreated (Bembèrèkè and Kouandé) which served as control sites. Key transmission indicators of *Anopheles gambiae* (s.l.) as well as the residual activity of Actellic 300 CS assessed through WHO cone tests, were determined.

Results: The residual efficacy duration of Actellic 300 CS after the two IRS campaigns (2017 and 2018) was 4–5 months (May–September). The parity rate and the sporozoite index of *An. gambiae* (s.l.) were 36.62% and 0.71%, respectively, after the first spray round in treated areas compared to 57.24% and 3.7%, respectively, in the control areas ($P < 0.0001$). The same trend was observed after the second spray round. After the first spray round, each person received 1.6 infective bites/month (ib/m) in the treated areas against 12.11 ib/m in the control areas, resulting in a reduction rate of 86.78%. Similarly, the entomological inoculation rate was 1.5 ib/m after the second spray round in the treated areas vs 9.75 ib/m in the control areas, corresponding to a reduction of 84.61%. A decrease in the parity rate (46.26%), sporozoite index (85.75%) and EIR (87.27%) was observed for *An. gambiae* (s.l.) after the first round of IRS (June–October 2017) compared to the pre-intervention period (June–October 2016). The density of *An. gambiae* (s.l.) ranged between 0.38–0.48 per house in treated areas vs 1.53–1.76 *An. gambiae* (s.l.) per house respectively after the first and second IRS rounds.

Conclusions: This study showed the positive impact of IRS in reducing key entomological parameters of malaria transmission in Alibori and Donga. However, the considerable blood-feeding rate of *An. gambiae* (s.l.) in spray areas, stress the need for the population to sleep under long-lasting insecticidal nets (LLINs) in addition, to prevent from mosquito bites which did not succeed in resting on sprayed walls.

Keywords: IRS, Efficacy, Actellic 300CS, Malaria transmission, Benin

*Correspondence: albertsourousalako@yahoo.fr

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

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



©The Author(s) 2019. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Over the past decade, progress has been made in malaria control, through the promotion of indoor residual spraying (IRS) and long-lasting insecticidal nets (LLINs) [1–5]. Indeed, the proportion of the population with access to LLINs or having benefited from IRS in sub-Saharan Africa increased significantly from 2% in 2000 to 59% in 2014 [5]. According to the World Health Organization (WHO), of the 663 million malaria cases prevented in sub-Saharan Africa between 2001 and 2015 through vector control interventions, 79% were through LLINs and IRS [5]. This historic progress in the fight against malaria is partly due to the efforts of the USA Government through the President's Malaria Initiative (PMI) [6].

In Benin, IRS to control malaria vectors was introduced due to the expansion of pyrethroids resistance [7–10] which was the only insecticide class approved for the impregnation of LLINs. The strategy first implemented with bendiocarb (2008–2010) in the Oueme region (south Benin) and then, transferred to the Atacora region (north Benin) with the use of the same product (2011–2013) later replaced by pirimiphos-methyl (2014–2016), was very successful [11–13]. Indeed, Atacora region offers a good cost-effectiveness ratio insofar as a single IRS round is sufficient to cover its short transmission period, which favored the relocation of the intervention to that region. In addition, the decrease in susceptibility of mosquitoes to bendiocarb in the same region [14] has favored the switch from this insecticide to pirimiphos-methyl, which showed good performance in experimental huts trials [15].

After six years of IRS implementation in the Atacora region, the National Malaria Control Programme (NMCP), in agreement with various partners, decided to partially withdraw the intervention from some districts of this region and relocate it to two other regions (Alibori and Donga). This decision not only falls within the framework of the implementation of the national insecticide resistance management plan, but provides opportunity for coverage in two high burden regions [16] which have never benefitted from this intervention. In preparation for this relocation, prior studies have shown that *An. gambiae* (s.l.), the main malaria vector in the two target regions [17, 18], was susceptible to pirimiphos-methyl [19, 20], an organophosphate insecticide and potential candidate for the IRS campaigns in Alibori and Donga.

In 2017 and 2018, all houses in Djougou, Copargo and Ouake (Donga region) and Kandi, Gogounou and Segbana districts in the Alibori region were treated with Actellic 300CS (pirimiphos-methyl). The present study shows the results of the IRS entomological monitoring conducted in both regions. Thus, the impact of the strategy on key entomological indicators of malaria

transmission as well as, the residual efficacy duration of Actellic 300CS on the different type of sprayed walls were evaluated.

Methods

Study area

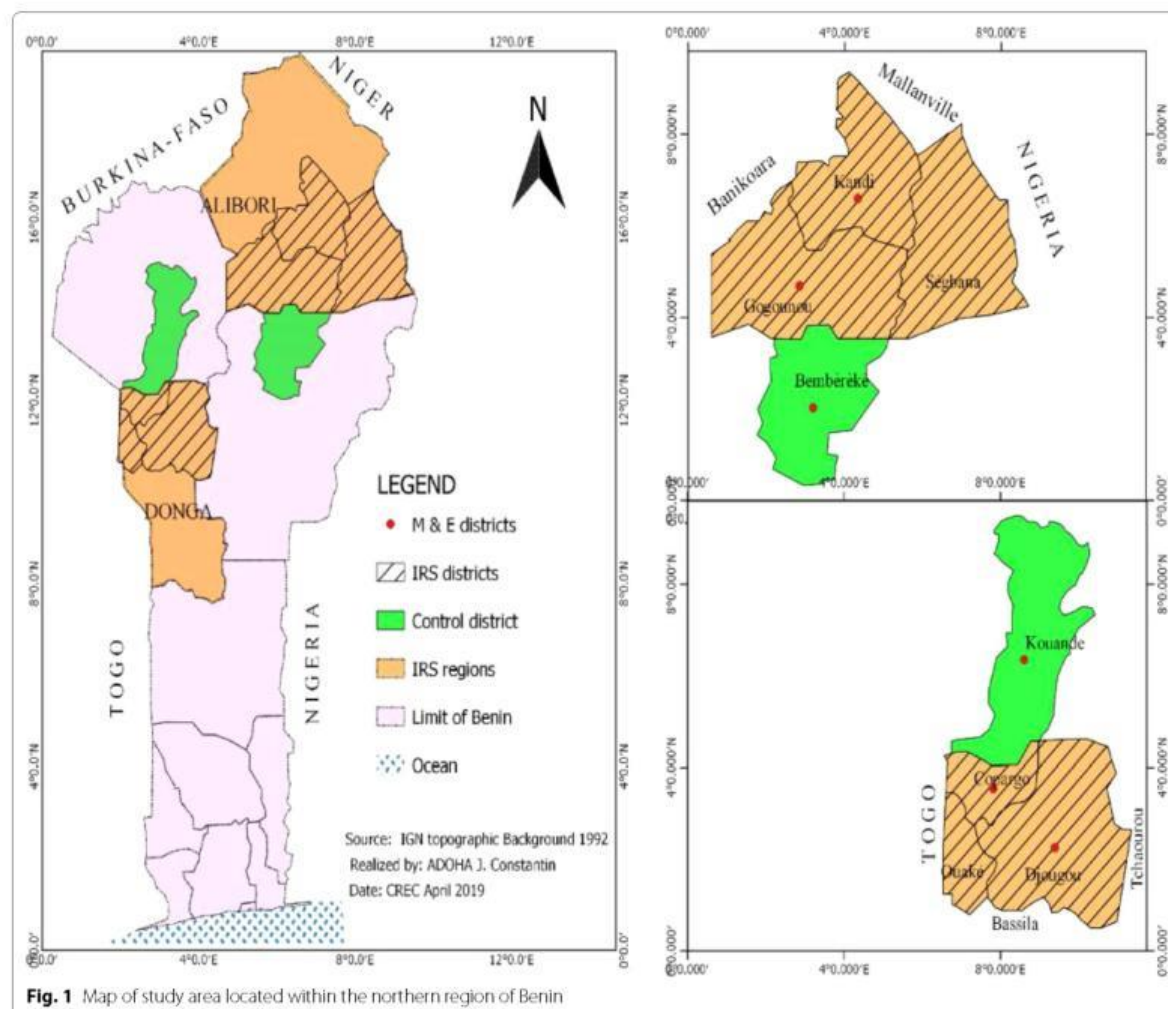
In 2017, Benin's NMCP relocated IRS to six districts of northern Benin, including three districts (Kandi, Gogounou and Segbana) in the Alibori region and three other (Djougou, Copargo, Ouake) in the Donga region (Fig. 1). A total of 1,226,161 and 1,287,469 persons were protected with Actellic 300 CS (pirimiphos-methyl) respectively in 2017 and 2018. For the entomological monitoring of the intervention, 4 districts were surveyed including Djougou (09°42'10"N, 01°40'55"W) and Copargo (09°50'19"N, 01°32'39"W) in northwest of Benin and, Kandi (11°07'29"N, 2°56'9"W) and Gogounou (10°50'30"N, 2°50'20"W) in northeast of the country (Fig. 1). Adjacent districts served as controls including Kouande (10°19'54"N, 1°41'29"W) which is close to the IRS districts of Djougou and Copargo and, Bembereke (10°13'30"N, 02°40'05"W) that is next to the IRS districts of Kandi and, Gogounou (Fig. 1).

The climate is Sudano-Guinean in the Donga region and Sudanese in the Alibori region. These two regions are dry savannah areas, with six months rainy season (mid-April to mid-October) and a dry season which spans the remainder of the year. Overall, average annual rainfall ranges between 700–1200 mm and 1200–1300 in Alibori and Donga, respectively.

The incidence of simple and severe malaria in 2016 was 26.4% in Donga region and 13.3% in Alibori [16].

Adult mosquito collections

In each evaluation district, a central site and a peripheral site were selected. On each site, human landing catches (HLC) were conducted from 21:00 h to 5:00 h in 2 houses randomly selected at each field visit, with one collector sitting indoor and a second outdoor, amounting to a total of 4 collectors/hour/site and 8 collectors/hour/district over each sampling night. On each site, the 4 persons who collected the mosquitoes from 21:00 h to 1:00 h were replaced by 4 other collectors from 1:00 h to 5:00 h. They were rotated between the different houses to avoid bias related to their ability to capture mosquitoes or, their individual attractiveness. This sampling method allowed to evaluate the human-biting rate (HBR) of the *Anopheles* vectors, which were then analyzed by ELISA circumsporozoite protein (CSP) to determine their sporozoite index (SI). The morning collection (from 6:00 h to 7:00 h) of indoor resting mosquitoes using pyrethrum spray catch (PSC) was carried out in 20 houses per district (10 selected



from each central and peripheral site). This sampling technique allowed us to estimate the mean indoor vector density.

Mosquito identification and processing

Morphological identification of vectors species

After each collection, mosquitoes were counted and morphologically identified using the taxonomic key of Gillies & Meillon [21]. About 40–50% of the *Anopheles* vectors captured through HLC were dissected to assess their physiological age [22]. Those collected by PSC were classified according to the physiological state (unfed, feed, half-gravid and gravid) of their abdomen. Each specimen was then stored in a labeled Eppendorf tube containing silica gel and cotton for further molecular analyses.

Molecular analyses

To detect the presence of *P. falciparum*, heads and thoraces of all females *An. gambiae* (s.l.) were analyzed by ELISA CSP according to the protocol described by Wirtz et al. [23]. The abdomens, legs and wings of 20 to 50 specimens of *An. gambiae* (s.l.), randomly selected in each district each month, were analyzed by PCR according to the protocol of Santolamazza et al. [24], for molecular species identification.

WHO cone bioassays

The residual activity of Actellic 300 CS on treated walls was evaluated after each IRS campaign using WHO cone bioassays [25]. These bioassays were carried out with females of *An. gambiae* Kisumu, a laboratory

susceptible strain reared and maintained at the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC).

Cone bioassay procedure

From 2017 to 2018, monthly cone bioassays [T0 (May), T1 (June), T2 (July), T2 (July), T3 (August), T4 (September), T5 (October) and T6 (November)] were conducted on treated walls of 20 houses randomly selected in the Donga and Alibori regions. The surfaces of the untreated walls were used as a control. These bioassays aimed not only to evaluate the quality of the treatment applications but also to monitor the residual effect of Actellic 300 CS on the treated walls. The bioassays were performed on the cement and mud walls encountered in the study area. Using a mouth aspirator, 15 females *An. gambiae* Kisumu aged 2–5 days-old were carefully introduced into each cone, fixed at three different heights (0.5 m, 1 m and 1.5 m) of the treated walls. Mosquitoes were exposed to the sprayed walls for 30 min; then removed from the cones and transferred to labeled sterile cups and provided with 10% sugar solution. After 24 h of observation at a temperature of 27 ± 2 °C and a relative humidity of $80 \pm 10\%$, the mortality rate was determined. When the control mortality was between 5–20%, corrected mortality was performed accordingly using Abbott's formula [26]; when the control mortality was higher than 20%, the bioassay was considered invalid and repeated.

Estimation of entomological parameters

In this study, entomological parameters measured before (May 2016–April 2017) and after IRS (June 2017–August 2018) include: (i) human-biting rate (HBR), number of bites of *An. gambiae* (s.l.) per unit of time ($HBR = \text{No. of specimens of } An. gambiae (s.l.) \text{ collected} / \text{No. of collectors} / \text{No. of nights of sampling}$); (ii) sporozoite index (SI), proportion of *An. gambiae* (s.l.) with circumsporozoite protein of *P. falciparum* ($SI = (\text{No. of positive thoraces} / \text{Total no. of analyzed thoraces}) \times 100$); (iii) parity rate (PR), percentage of parous *An. gambiae* (s.l.) ($PR = (\text{No. of parous mosquitoes} / \text{Total no. of dissected mosquitoes}) \times 100$); (iv) indoor vector density (IVD), mean number of *An. gambiae* (s.l.) collected per house ($\text{Total no. of } An. gambiae (s.l.) \text{ collected indoors by PSC} / \text{Total no. of surveyed houses}$); (v) blood-feeding rate, proportion of *An. gambiae* (s.l.) having blood-fed [$BFR = (\text{No. of blood-fed and half-gravid vectors collected by PSC} / \text{Total no. of vectors collected by the same method}) \times 100$]; (vi) entomological inoculation rate (EIR), level of malaria transmission by *An. gambiae* (s.l.) ($EIR = HBR \times SI$).

Data analysis

Data were analyzed with the statistical R software, version 2.8. using the *stats* package [27]. The Poisson method

was used to estimate and compare the confidence intervals of indoor vector density and EIRs of *An. gambiae* (s.l.) [28]. The Chi-square test of comparison of proportions was used to compare blood-feeding rate, sporozoite index, and parity rate of *An. gambiae* (s.l.). These different parameters were compared before and after IRS and then between the treated and control areas.

Results

Residual effect of Actellic 300 CS on treated walls from 2017 and 2018

Figure 2 shows the monthly variation of mortality rates in 2017 (Fig. 2a) and 2018 (Fig. 2b), after exposure of *An. gambiae* Kisumu to cement and mud walls sprayed with Actellic 300CS in the districts of Djougou and Copargo. In 2017 and 2018, cone bioassays revealed full susceptibility (100% mortality) of *An. gambiae* Kisumu to all sprayed walls (cement and mud), one-week post-IRS intervention (Fig. 2a, b). Overall, monthly data collected in 2017 and 2018 showed mortality rates of $\geq 80\%$ (WHO efficacy threshold) between May and September/October regardless the district or the type of tested wall, giving an efficacy duration of 4–5 months (Fig. 2a, b).

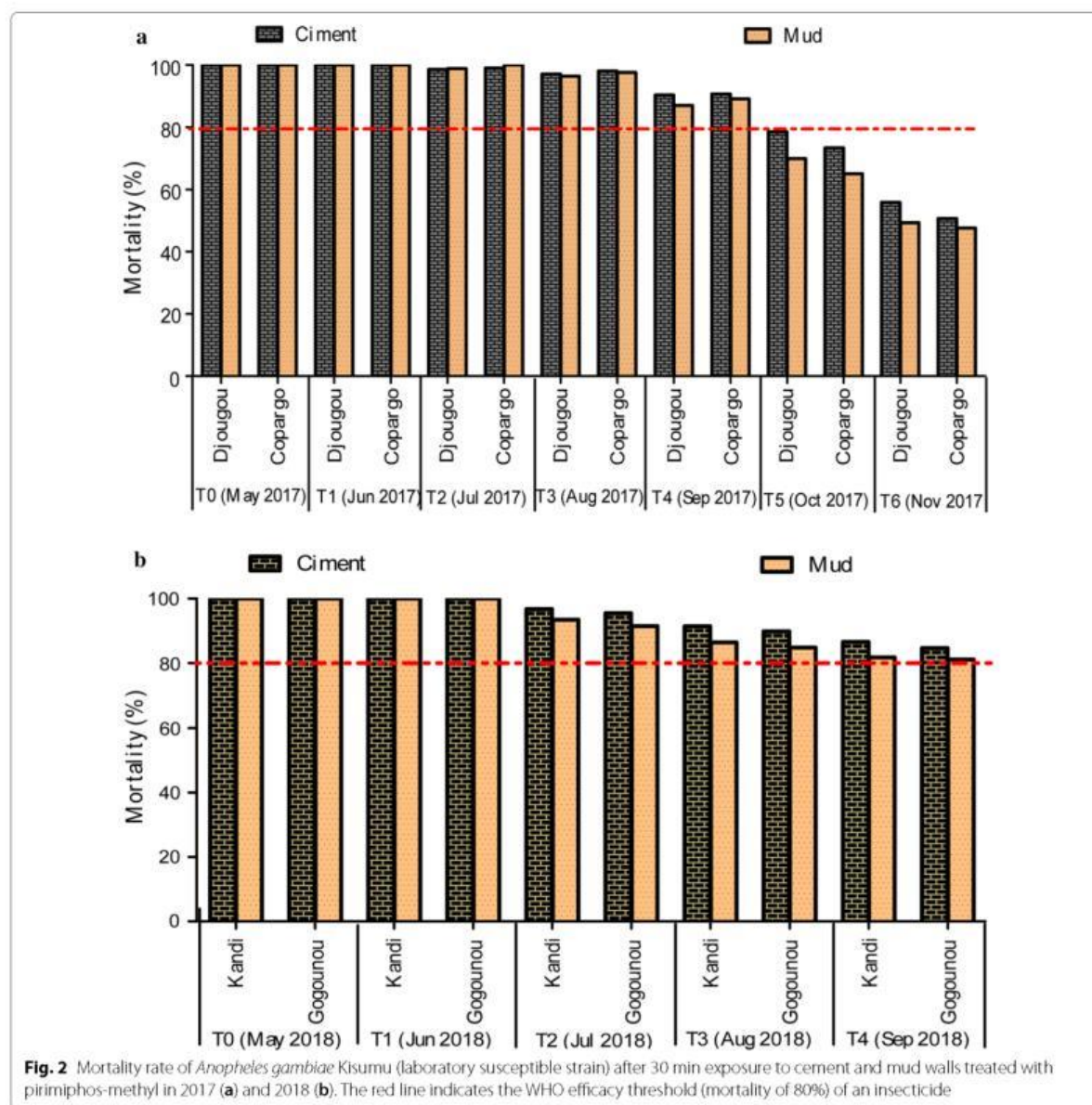
Vector species composition

A total of 8776 *Anopheles* specimens belonging to seven species were collected through HLC over the study period in Alibori and Donga (treated areas from 2017), as well as in Bembereke and Kouande (control areas). *Anopheles gambiae* (s.l.) (98.05%, 8605/8776) was the most abundant species found, followed by *An. funestus* (1.59%, 140/8776). Only 15 *An. pharoensis* (0.17%), 9 *An. coustani* (0.10%), 5 *An. ziemanni* (0.05%), 1 *An. paludis* and 1 *An. nili* (0.01%) were collected (Table 1).

Of the 2774 specimens of *An. gambiae* (s.l.) analyzed by PCR over the whole study period, three sibling species [*An. gambiae* (65.60%, $n=1820$), *An. coluzzii* (33.42%, $n=927$) and *An. arabiensis* (0.98%, $n=27$)] were detected (Table 2). Overall, the same trend (predominance of *An. gambiae*) was observed before and post-IRS in all localities (treated and control) (Table 2). Seasonal variation in the frequency of *An. gambiae* and *An. coluzzii* was observed during the study (Fig. 3). Overall, out of a total of 628 mosquito specimens analyzed in the dry season, 77.7% ($n=488$) of *An. coluzzii* were detected vs 22.3% ($n=140$) of *An. gambiae*. In contrast, in the rainy season, *An. gambiae* was predominant (79.28%, 1680/2119) compared to *An. coluzzii* (20.72%, 439/2119) (Fig. 3).

Impact of IRS on the longevity of *An. gambiae* (s.l.)

Overall, Table 3 and Fig. 4 show the impact of IRS on the longevity of *An. gambiae* (s.l.) The parity rate of *An. gambiae* (s.l.) was 70.04% (996/1422) before IRS and 37.64%



(457/1214) after the first round of IRS in Alibori and Donga, equating to a 46.25% reduction in vector longevity ($P < 0.0001$) (Table 3).

The trend was the same when comparing the parity rates obtained in the treated and control areas during the efficacy period of Actellic 300 CS. Indeed, between June and September, the parity rates of *An. gambiae* (s.l.) in the treated areas (Alibori and Donga) were 36.62% (364/994) in 2017 and 48.36% (353/730) in 2018 against 57.24% (257/449) and 62.96% (289/459) in the control

areas ($\chi^2 = 52.798$, $df = 1$, $P < 0.0001$ for 2017; $\chi^2 = 23.621$, $df = 1$, $P < 0.0001$ for 2018) (Fig. 4).

Impact of IRS on the biting location of *An. gambiae* (s.l.)

Before IRS, the biting rate of *An. gambiae* (s.l.) was higher indoors [9.03 bites per person per night (b/p/n)] than outdoors (7.83 b/p/n) ($P = 0.00098$, $RR = 1.153$ (95% CI: 1.06–1.26). Similarly, the biting activity of *An. gambiae* (s.l.) was more pronounced indoors than outdoors in the control areas after both the first (13.04 b/p/n indoors vs

Table 1 *Anopheles* species composition in surveyed areas before and after IRS

Species	Before IRS (May 2016–April 2017)	After 1st round of IRS (June 2017–March 2018)	Control (Bembereke, Kouande)	After 2nd round of IRS (June 2018–November 2018)	Control (Bembereke–Kouande)	Total
<i>An. gambiae</i> (s.l.)	2465	2379	1546	1286	929	8605
<i>An. funestus</i>	54	54	16	9	7	140
<i>An. coustani</i>	9	0	0	0	0	9
<i>An. pharoensis</i>	3	2	5	2	3	15
<i>An. paludis</i>	1	0	0	0	0	1
<i>An. nili</i>	0	0	0	1	0	1
<i>An. ziemanni</i>	2	2	0	1	0	5
Total	2534	2437	1567	1299	939	8776

8.58 outdoors; $RR=1.52$ (95% CI: 1.35–1.72), $P<0.0001$) and the second IRS rounds (14.2 b/p/n indoors vs 7.83 outdoors; $RR=1.81$ (95% CI: 1.58–2.09), $P<0.0001$) (Table 4). However, the opposite trend was observed after the first (4.86 b/p/n indoors vs 10.27 outdoors; $RR=2.11$ (95% CI: 1.91–2.34), $P<0.0001$) and the second (7.49 b/p/n indoors vs 8.03 outdoors; $RR=1.07$ (95% CI: 0.96–1.2), $P=0.233$) rounds of IRS in the areas targeted by the strategy (Table 4).

Impact of IRS on SI and EIR of *An. gambiae* (s.l.)

A total of 8603 head-thoraces of *An. gambiae* (s.l.) were analyzed by ELISA CSP over the study period. After the ELISA CSP tests, a mean SI of 8.4% (95% CI: 7.25–9.63%; 181 positive samples out of 2158 tested) was obtained before IRS (June–October 2016) compared to 1.2% (95% CI: 0.8–1.8%; 26 positive samples out of 2122 tested) after the first round of IRS (June–October 2017), corresponding to a reduction rate of 85.71% ($\chi^2=117.69$, $df=1$, $P<0.0001$). Similarly, an 87.27% reduction in EIR was observed after the first round of IRS (2.7 infective bites/person/month) as compared to the pre-intervention period (21.21 ib/p/month) in Alibori and Donga ($RR=7.83$ (95% CI: 5.17–12.31), $P<0.0001$) (Table 5).

This reduction in the SI and EIR of *An. gambiae* (s.l.) was also observed in the treated areas as compared to the control ones during the efficacy period of Actellic 300 CS in 2017 and 2018. Indeed, after the first round of IRS (June–September 2017), a mean SI of 0.7% (95% CI: 0.36–1.2%; 12 positive samples out of the 1697 tested) was obtained in the treated areas compared to 3.7% (95% CI: 2.7–5.01%; 42 positive samples out of 1124 tested) in the control areas ($\chi^2=31.45$, $df=1$, $P<0.0001$) (Table 6). During the same period, a person received a mean 12.11 ib/month in control areas against 1.6 ib/month in the treated areas ($RR=7.53$ (95% CI: 3.89–12.73), $P<0.0001$), which equals to an 86.78% reduction in malaria transmission. Moreover, the mosquitoes tested after the second

IRS round (June–August 2018) showed a mean SI of 0.64% (95% CI: 0.27–1.2%; 8 positive samples out of 1241 tested) in the treated areas against 3% (95% CI: 1.9–4.2%; 26 positive samples out of 881 tested) in the control areas ($\chi^2=15.954$, $df=1$, $P<0.0001$) (Table 6). During the same period a significant reduction (84.61%) in the EIR in the treated areas (1.5 ib/p/month) was observed compared to the control areas (9.37 ib/p/month) ($RR=6.25$ (95% CI: 2.73–16.03), $P<0.0001$) (Table 6).

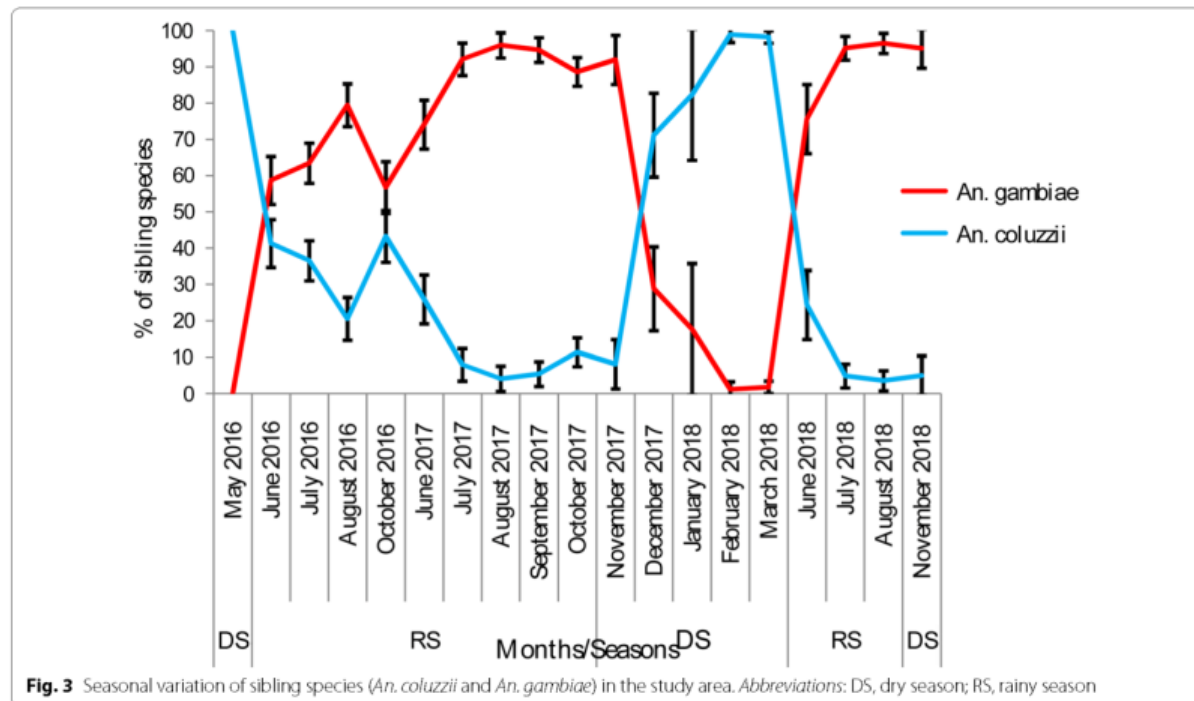
Figure 5 shows the dynamics of EIR from May 2016 to November 2018. The lowest EIRs were observed during the dry periods (January 2017 to April 2017 and November 2017 to March 2018) in both treated and control areas. After IRS implementation, lower monthly EIRs were observed in the treated areas compared to the control areas between June and October 2017 and 2018, which equals to 4 months of impact each year (Fig. 5).

Impact of IRS on IVD in treated and control areas

Table 7 shows the mean indoor density of *An. gambiae* (s.l.) before IRS and during Actellic 300 CS efficacy periods. Mean densities of 1.64 *An. gambiae* (s.l.) and 0.41 *An. gambiae* (s.l.) per room were recorded before (June–October 2016) and after (June–October 2017) IRS in Alibori and Donga, respectively, equating to a 75% reduction ($RR=4.04$ (95% CI: 3.53–4.64), $P<0.0001$) (Table 7). In addition, after the first IRS campaign (June–September 2017), 1.53 *An. gambiae* (s.l.) per room was recorded in control areas compared to 0.38 *An. gambiae* (s.l.) in treated areas, equating to a reduction of 75.16% ($RR=4.03$ (95% CI: 3.34–4.88), $P<0.0001$) (Table 7). The trend was the same after the second round of IRS (June–August 2018) where a significant reduction of 72.72% in mean indoor density of *An. gambiae* (s.l.) in the treated areas (0.48 *An. gambiae* (s.l.) per room) compared to the control areas (1.76 *An. gambiae* (s.l.) per room) was observed ($RR=3.64$ (95% CI: 2.84–4.67), $P<0.0001$) (Table 7).

Table 2 Frequency of sibling species of the *An. gambiae* (s.l.) complex in IRS and control areas

Period	No. of analysed samples in IRS areas	Allbori (IRS Area 1)			Donga (IRS Area 2)			Total (IRS Areas)			Bembereke (Control area)		
		<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>An. coluzzii</i>	<i>An. arabiensis</i>
Before IRS (May 2016–October 2016)	980	170	271	0	387	152	0	557	423	0	–	–	–
After IRS (June 2017–November 2018)	1794	466	176	17	520	147	5	986	323	22	277	181	5
Proportion (%)	–	70.71	26.70	2.57	77.38	21.87	0.74	74.07	24.26	1.65	59.82	39.09	1.07
Total (Before + after IRS)	2774	636	447	17	907	299	5	1543	746	22	277	181	5
Proportion (%)	–	57.81	40.63	1.54	74.89	24.69	0.41	66.76	32.28	0.95	59.82	39.09	1.07

**Table 3** Parity rates of *Anopheles gambiae* (s.l.) collected before and after the first round IRS

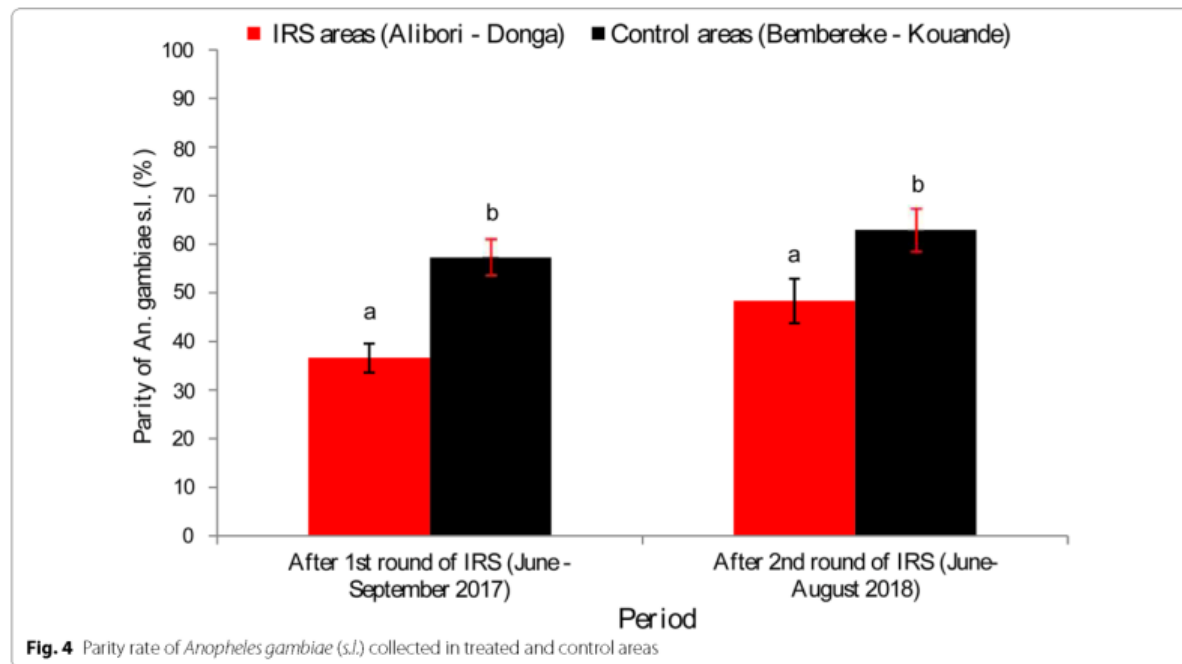
IRS area	Variable	Before IRS (June–October 2016)	After 1st round of IRS (June–October 2017)	χ^2 -value	P-value
Alibori-Donga	No. dissected	1422	1214	–	–
	No. parous	996	457	–	–
	Parous (%)	70.04	37.64	276.57	< 0.0001

Impact of IRS on blood-feeding rate of *An. gambiae* (s.l.) in treated districts

Overall, blood-feeding decreased significantly after IRS intervention in the study regions. Prior to the intervention (June–October 2016), the blood-feeding rate of *An. gambiae* (s.l.) was 96.20%. After the first round of IRS (June–October 2017), this rate decreased to 63.37% in the treated areas, representing a reduction rate of 34.12% ($\chi^2 = 236.03$, $df = 1$, $P < 0.0001$) (Table 8). Similarly, a 22.6% reduction in the blood-feeding rate of *An. gambiae* (s.l.) was also observed in the treated areas (62.5%) compared to the control areas (80.74%) during the Actellic 300 CS persistence period (June–September 2017) ($\chi^2 = 17.76$, $df = 1$, $P < 0.0001$) (Table 8).

Discussion

The persistence of an insecticide applied to walls is one of the key indicators for determining the effectiveness of IRS [29, 30]. In the Alibori and Donga regions, the persistence of Actellic 300 CS used for the two IRS campaigns was 4–5 months (May–September/October). These results corroborate those obtained by Chanda et al. [31] in Zambia and Tchicaya et al. [32] in Mbe (Côte d'Ivoire) who observed a residual efficacy of Actellic 300 CS of 4–5 months on mud and cement walls. However, persistence of Actellic 300 CS observed in this study is lower than that observed in Zanzibar (8 months) by Haji et al. [33] for the same product. These differences in community persistence of Actellic 300CS from one country to another could be due to the influence of several variable

**Table 4** Biting location of *An. gambiae* (s.l.) in IRS and control areas

Period	Area	Location	No. collected	Person/night	HBR (b/p/n)	P-value
Before IRS (June–October 2016)	Future IRS	Indoor	1156	128	9.03	0.00098
		Outdoor	1002	128	7.83	
After 1st IRS round (June–September 2017)	IRS	Indoor	544	112	4.86	< 0.0001
		Outdoor	1150	112	10.27	
	Control	Indoor	678	52	13.04	< 0.0001
		Outdoor	446	52	8.58	
After 2nd IRS round (June–August 2018)	IRS	Indoor	599	80	7.49	0.233
		Outdoor	642	80	8.03	
	Control	Indoor	568	40	14.2	< 0.0001
		Outdoor	313	40	7.83	

Abbreviations: HBR, human biting rate; b/p/n, bite/person/night

Table 5 Human-biting rate, sporozoite index and entomological inoculation rate in Alibori and Donga regions (IRS areas) before and after the first round of IRS 2017

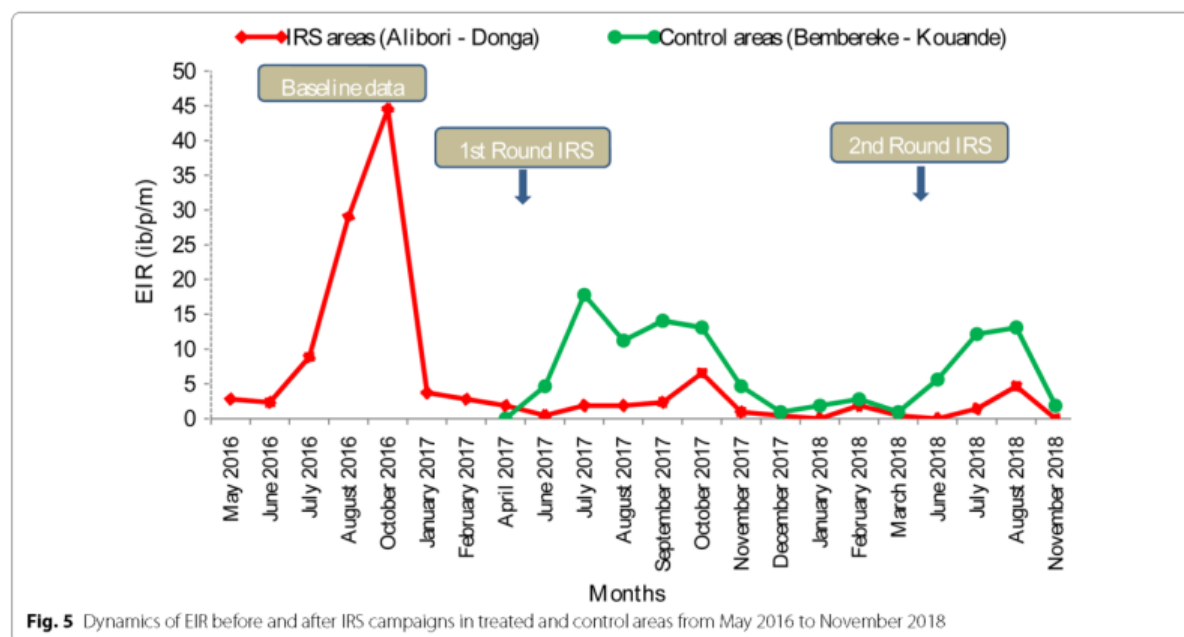
Region	Variable	Before IRS (June–October 2016)	After 1st round of IRS (June–October 2017)	Reduction (%)
IRS areas (Alibori, Donga)	HBR/night	8.43	7.37	–
	SI (%)	8.4	1.2	85.71
	EIR (ib/person/night)	0.707	0.09	–
	EIR (ib/person/month)	21.21	2.7	87.27

Abbreviations: SI, sporozoite index; HBR, human-biting rate; EIR, entomological inoculating rate; ib, infected bite

Table 6 Human-biting rate, sporozoite index and entomological inoculation rate in IRS and control areas

Variable	After 1st IRS campaign (June–September 2017)			After 2nd IRS campaign (June–August 2018)		
	IRS areas (Alibori–Donga)	Control areas (Bembereke–Kouande)	Reduction (%)	IRS areas (Alibori–Donga)	Control areas (Bembereke–Kouande)	Reduction (%)
HBR/night	7.56	10.81	–	7.76	11.01	–
SI (%)	0.71	3.7	80.81	0.6	3	80
EIR (ib/person/night)	0.053	0.403	–	0.05	0.325	–
EIR (ib/person/month)	1.6	12.11	86.78	1.5	9.75	84.61

Abbreviations: SI, sporozoite index; HBR, human-biting rate; EIR, entomological inoculation rate; ib, infective bite

**Fig. 5** Dynamics of EIR before and after IRS campaigns in treated and control areas from May 2016 to November 2018**Table 7** Indoor density of *An. gambiae* (s.l.) in IRS and control areas

Period	Area	No. of rooms	No. collected	Density/room	P-value
Before IRS (June–October 2016)	Baseline	610	1001	1.64	< 0.0001
After 1st round of IRS (June–October 2017)	After IRS areas	673	273	0.41	
After 1st round of IRS (June–September 2017)	After IRS areas	551	208	0.38	< 0.0001
	Control areas	160	244	1.53	
After 2nd round of IRS (June–August 2018)	After IRS areas	242	117	0.48	< 0.0001
	Control areas	88	155	1.76	

factors such as, the environmental conditions (temperature, relative humidity, exposure to ultraviolet rays) [34–38], the composition and characteristics (porosity and pH) of treated walls [39–41] and/or the human interferences with treated surfaces (washing of treated walls) [42].

Two malaria vectors have been encountered in treated and control areas, *An. gambiae* (s.l.) (98.05%), which represents the most predominant species, followed by *An. funestus* (1.59%). These data corroborate previous studies performed by Gnanguenon et al. [17] in Kandi (north-east Benin) and Aikpon et al. [43] in Atacora, a region

Table 8 Blood-feeding rates in *An. gambiae* (s.l.) in treated and control areas

Period	Area	No. collected	Unfed	Fed	Gravid	Half-gravid	Blood-feeding rate %	P-value
Before IRS: June–October 2016	IRS areas	1001	26	922	12	41	96.20	< 0.0001
After 1st round of IRS: June–October 2017		273	99	171	1	2	63.37	
After 1st round of IRS: June–September 2017	IRS areas	208	78	129	0	1	62.5	< 0.0001
	Control areas	244	16	187	31	10	80.74	

neighboring Donga (northwest Benin). Molecular identification of the sibling species of the *An. gambiae* (s.l.) complex revealed that *An. gambiae* (65.60%), *An. coluzzii* (33.42%) and *An. arabiensis* (0.98%) live in sympatry. The predominance of *An. gambiae* in the study area, particularly during rainy season, confirms that dry savannah areas where many temporary breeding sites are formed after rains, are conducive to the development this species. This was highlighted by previous studies carried out in similar bio-ecological areas in Nigeria [44], Cameroon [45] and Burkina Faso [46]. As previously found by Simard et al. [47] and Kudom et al. [48], the predominance of *An. coluzzii* in the dry season during this study could be due to the presence of permanent and semi-permanent breeding sites such as dams and, watering places that are the major larval habitats during this period. Deforestation and increasingly long dry seasons in the study area, are suspected to be unfavorable conditions for the development of *An. arabiensis*, as reflected by the low number recorded in the present study ($n = 27$).

Overall, after the first round of IRS, significantly lower density, SI, blood-feeding and parity rates were observed compared to the pre-intervention period. Similarly, after the first and second rounds of IRS, levels of these indicators were significantly lower in treated areas compared to the control ones. Indeed, treated areas had probably become difficult to live in for the *Anopheles* vectors that fled treated houses. This observation is highlighted here by the low indoor resting density and the more pronounced outdoor biting rate of *An. gambiae* (s.l.) which were observed post-IRS intervention in the targeted localities. Thus, only a small proportion of vectors could succeed in taking their blood meals inside treated houses as observed by Sy et al. [49] in west-central Senegal. The reduced blood-feeding rate of the vectors had certainly induced a lower parity rate in treated areas since success in taking a blood meal conditions the maturation of ovaries [50]. In addition, the lethal effect of Actellic 300 CS might not have favored incubation of parasite in vectors before they died, resulting in their low infectivity in the treated areas compared to the control areas. These results confirm the findings by Coleman et al.

[51] in northern Ghana and Mashauri et al. [52] in Lake Victoria basin of Tanzania, who also described a significant decrease in the SI of *An. gambiae* (s.l.) after IRS with Actellic 300 CS.

Before intervention, the EIR of *An. gambiae* (s.l.) was 21.21 ib/p/month in Alibori and Donga. However, after the first round of IRS (June–October 2017), a substantial decrease to 2.7 ib/person/month was detected, which represents a reduction of 87.27%. The high decrease in EIR in sprayed areas compared to the control areas (86.78% in 2017 and 84.61% in 2018) could be due to a high IRS coverage in treated areas (more than 91% IRS coverage in 2017 and 92% in 2018). Indeed, similar results were obtained in Zambia [31], Zimbabwe [53], Tanzania [52] and Uganda [54] where more than 85% IRS coverage with Actellic 300 CS was achieved. In parallel, the results of an epidemiological study conducted in 2017 after IRS revealed that the decrease of EIR was accompanied by an 8% decrease of incidence among children under five years of age in the treated area of Donga [55]. EIR reduction (86.78% in 2017 and 84.61% in 2018) in our study area is lower than that previously observed by Akogbeto et al. [11] (94.4% in Oueme, southern Benin), Aikpon et al. [12] (99.24% in Atacora, northwest Benin) and Sy et al. [49] (92.59% in central-west Senegal).

Although blood-feeding rates and SI of *Anopheles* were significantly lower in the treated areas compared to the control areas, they remained considerable in these areas. This highlights the need to support IRS campaigns with information, education and communication campaigns to aware the population on the necessity of sleeping under LLINs, even in sprayed houses to avoid bites of mosquitoes which do not succeed in resting on walls due to the insecticide effect.

Currently, pirimiphos-methyl CS is the only product used in IRS in Benin due to the emergence of resistance of *An. gambiae* (s.l.) to bendiocarb and pyrethroids [14]. Since resistance is a dynamic phenomenon, its emergence to organophosphates over time cannot be ruled out. Considering this, the use of new generation insecticides such as SumiShield® 50WG and Fludora® Fusion which have a persistence of approximately 8 to 10 months [56, 57] and which have been recently approved by WHO, may be

considered. This will allow covering the entire duration of malaria transmission (approximately 6 months) in the two surveyed regions.

The present study has some limitations. Indeed, the discontinuation of the cone bioassays in September 2018 when Actellic 300CS was still effective meant the exact persistence duration of the product could not be determined. Moreover, the mosquito collections which started at 21:00 h did not allow collecting information on early mosquito biting in the evening.

Conclusions

The reduction of key entomological indicators of malaria transmission in the treated regions shows the positive impact of the IRS programme. However, this strategy must be complemented with a high use of LLINs for greater effectiveness in vector control.

Abbreviations

IRS: indoor residual spraying; PMI: President's Malaria Initiative; USAID: United States Agency for International Development; WHO: World Health Organization; LLIN: long-lasting insecticidal nets; NMCP: National Malaria Control Programme; EIR: entomological inoculation rate; HBR: human-biting rate; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; PCR: polymerase chain reaction; CSP: circumsporozoite protein; HLC: human landing catch; SI: sporozoite index; PSC: pyrethrum spray catch; IVD: indoor vector density; WG: water dispersible granules; CS: micro-encapsulated formulation; CREC: Centre de Recherche Entomologique de Cotonou.

Acknowledgements

We are grateful to the President's Malaria Initiative which supported financially this study. We would also like to acknowledge Monica Patton, Patrick Condo, Peter Thomas, Irish Seth and Raymond Beach of CDC who provided technical support to the study and critically revised the manuscript.

Authors' contributions

ASS, FD, AS, LI, FA and MCA conceived the study. ASS, GGP, AS, RA and MCA participated in the design of the study. Entomologic data was collected by ASS, RA, IA, HS, ASS and bioassays and laboratory analysis was carried out by ASS and HS. ASS, GGP, AS and MCA drafted the manuscript. Statistical data analysis by BA, AS, LI, FD and FA. TS and MCA critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was financially supported by the USA President's Malaria Initiative (PMI) through the United States Agency for International Development (USAID) Africa Indoor Residual Spraying Project (AIRS).

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. The data used and/or analyzed in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The protocol of this study was evaluated and approved by the Institutional Ethical Committee of CREC (IECC) (Grant No. IORG005698). The risk of voluntary mosquito collectors to suffer from malaria has been minimized by identifying them in their home village as they might already have protected immunity due to their prolonged exposure to mosquitoes. Prior to their involvement in this study, they gave their consent and have been trained so that they could collect mosquitoes before they bite them. They have all been vaccinated against yellow fever and were regularly monitored. In case of confirmed malaria, they were immediately taken to the team medical doctor and administered effective treatment.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin. ² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin. ³ USA President's Malaria Initiative, USA Agency for International Development, Cotonou, Benin. ⁴ Faculty of Agronomy, University of Parakou, BP 123, Parakou, Benin. ⁵ Disease Control Department, Faculty of Infectious & Tropical Diseases, The London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK. ⁶ Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques, Abomey, Bénin. ⁷ Faculté des Sciences Humaines et Sociales de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ⁸ PMI VectorLink Project, Abt Associates, Cotonou, Benin. ⁹ PMI VectorLink Project, Abt Associates, Kinshasa, Democratic Republic of Congo.

Received: 8 August 2019 Accepted: 19 December 2019

Published online: 30 December 2019

References

- Sharp BL, Kleinschmidt I, Streat E, Maharaj R, Barnes KI, Durrheim DN, et al. Seven years of regional malaria control collaboration—Mozambique, South Africa and Swaziland. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:42–7.
- Kleinschmidt I, Schwabe C, Shiva M, Segura JL, Sima V, Mabunda SJ, et al. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:519–24.
- Chizema-Kawesha E, Miller JM, Steketee W, Mukonka VM, Mukuka C, Mohamed AD, et al. Scaling up malaria control in Zambia: progress and impact 2005–2008. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83:480–8.
- Steketee RW, Campbell CC. Impact of national malaria control scale-up programmes in Africa: magnitude and attribution of effects. *Malar J*. 2010;9:299.
- WHO. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report>. Accessed 10 Oct 2019.
- The President's Malaria Initiative. Ninth annual report to congress; 2015. <https://www.pmi.gov/docs/default-source/default-document-library/pmi-reports/pmi-ninth-annual-report-congress.pdf>. Accessed 15 Sept 2019.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. Current distribution of pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parasitologia*. 1999;41:319–22.
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*. 2007;101:207–16.
- Yadouleton A, Asidi A, Djouaka R, Braïma J, Agossou C, Akogbeto M. Development of vegetable farming. A cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J*. 2009;8:103.
- Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, et al. Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Trop*. 2010;114:116–22.
- Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:586–93.
- Aikpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, Oussou O, Okè-Agbo F, et al. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC indoor residual spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasites Vectors*. 2014;7:256.
- Akogbeto MC, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, Osse R, Agossa FR, et al. Six years of experience in entomological surveillance of indoor

- residual spraying against malaria transmission in Benin: lessons learned challenges and outlooks. *Malar J.* 2015;14:242.
14. Aikpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aizoun N, Oké-Agbo F, et al. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasites Vectors.* 2013;6:192.
 15. Agossa F, Aikpon R, Azondekon R, Govoetchan R, Padonnuu GG, Oussou O, et al. Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos-methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108:84–91.
 16. Ministère de la Santé. Annuaire des statistiques sanitaires 2016. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2017.
 17. Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Osse R, Oke-Agbo F, Azondekon R, et al. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar J.* 2014;13:444.
 18. Salako AS, Ahogni I, Kpanou C, Sovi A, Azondekon R, Sominahouin AA, et al. Baseline entomologic data on malaria transmission in prelude to an indoor residual spraying intervention in the regions of Alibori and Donga, northern Benin, West Africa. *Malar J.* 2018;17:392.
 19. Gnanguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, et al. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved. *Parasites Vectors.* 2015;8:223.
 20. Salako AS, Ahogni I, Aikpon R, Sidick A, Dagnon F, Sovi A, et al. Insecticide resistance status, frequency of L1014F Kdr and G119S Ace-1 mutations, and expression of detoxification enzymes in *Anopheles gambiae* (s.l.) in two regions of northern Benin in preparation for indoor residual spraying. *Parasites Vectors.* 2018;11:618.
 21. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *S Afr Inst Med Res.* 1968;54:1–343.
 22. Detinova TS, Gillies MT. Observations on the determination of the age composition and epidemiological importance of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. *Bull World Health Organ.* 1964;30:23–8.
 23. Wirtz R, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell G, Burkot T, Schneider I, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ.* 1987;65:39.
 24. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008;7:163.
 25. WHO. Indoor residual spraying: use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. World Health Organization Global Malaria Programme. Geneva: World Health Organization; 2006. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69386>. Accessed 19 July 2019.
 26. Abbott WSA. Method of computing of an insecticide effectiveness. *J Econ Entomol.* 1925;18:265–7.
 27. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2018. <https://www.R-project.org/>. Accessed 12 Dec 2019.
 28. Rothman KJ. Epidemiology: an introduction. Oxford: Oxford University Press; 2012.
 29. WHO. Implementation of the global malaria control strategy: report of a WHO study group on the implementation of global plan of action for malaria control 1193–200. WHO technical report series; Geneva: World Health Organization; 1993. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37106/1/WHO_TRS_839_eng.pdf. Accessed 25 Aug 2019.
 30. WHO. Vector control for malaria and other vector mosquito-borne diseases: report of a WHO group. WHO technical report series; Geneva: World Health Organization; 1995. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41726/1/WHO_TRS_857.pdf. Accessed 10 Sept 2019.
 31. Chanda E, Chanda J, Kandyata A, Phiri FN, Muzia L, Haque U, et al. Efficacy of Actellic 300 CS, pirimiphos-methyl, for indoor residual spraying in areas of high vector resistance to pyrethroids and carbamates in Zambia. *J Med Entomol.* 2013;50:1275–81.
 32. Tchicaya ES, Nsanzabana C, Smith TA, Donze J, de Hips ML, Tano Y, et al. Micro-encapsulated pirimiphos-methyl shows high insecticidal efficacy and long residual activity against pyrethroid-resistant malaria vectors in central Côte d'Ivoire. *Malar J.* 2014;13:332.
 33. Haji AK, Thawer NG, Khatib BO, Mcha JH, Rashid A, Ali AS, et al. Efficacy, persistence and vector susceptibility to pirimiphos-methyl (Actellic® 300CS) insecticide for residual spraying in Zanzibar. *Parasites Vectors.* 2015;8:628.
 34. Hadaway AB, Barlow F. The residual action of two organo-phosphorus compounds and a carbamate in dried muds. *Bull World Health Organ.* 1963;28:69–76.
 35. Crosby DG, Leites E, Winterlin WL. Photodecomposition of carbamate insecticides. *J Agric Food Chem.* 1965;13:204–7.
 36. Müller HM, Stan HJ. Thermal degradation observed with different injection techniques: quantitative estimation by the use of thermo labile carbamate pesticides. *J High Res Chromatogr.* 1990;13:759–63.
 37. Santos RLC, da Silva Fayal A, Aguiar AEF, Vieira DBR, Povoá MM. Evaluation of residual effect of pyrethroids on anopheles in Brazilian Amazon. *Rev Saude Publica.* 2007;41:2.
 38. Senneca O, Scherillo F, Nuuziata A. Thermal degradation of pesticides under oxidative conditions. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2007;80:61–76.
 39. Mulambalah CS, Siamba DN, Ngeiywa MM, Vulule JM. Targeted indoor insecticide and malaria control in the western highlands Kenya. *J Infect Dis Immunity.* 2011;3:50–8.
 40. Etang J, Nwane P, Mbida JA, Piamue M, Manga B, Souop D, et al. Variations of insecticide residual bio-efficacy on different types of walls: results from community based trial in South Cameroon. *Malar J.* 2011;11:378.
 41. Sibanda MM, Focke WW, Labuschagne FJ, Moyo L, Nhlapo N, Maity A, et al. Degradation of insecticides used for indoor spraying in malaria control and possible solutions. *Malar J.* 2011;10:307.
 42. Dengela D, Seyoum A, Lucas B, Johns B, George K, Belemvire A, et al. Multi-country assessment of residual bio-efficacy of insecticides used for indoor residual spraying in malaria control on different surface types: results from program monitoring in 17 PMU/USAID supported IRS countries. *Parasites Vectors.* 2018;11:71.
 43. Aikpon R, Ossè R, Govoetchan R, Sovi A, Oké-Agbo F, Akogbéto MC. Entomological baseline data on malaria transmission and susceptibility of *Anopheles gambiae* to insecticides in preparation for indoor residual spraying (IRS) in Atacora, (Benin). *J Parasitol Vector Biol.* 2013;5:102–11.
 44. Onyabe DY, Vajime CG, Nock IH, Ndams IS, Akpa AU, Alaribe AA, et al. The distribution of M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97:605–8.
 45. Wondji C, Simard F, Fontenille D. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol.* 2002;11:11–9.
 46. Dabire KR, Diabate A, Namountougou M, Toe KH, Ouari A, Kengne P, et al. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:1113–20.
 47. Simard F, Ayala D, Kamdem G, Pombi M, Etouna J, Ose K, et al. Partage de niche écologique entre les formes moléculaires d'*Anopheles gambiae* s.l. au Cameroun: l'aspect écologique de la spéciation. *BMC Ecol.* 2009;9:17.
 48. Kudom AA. Écologie larvaire d'*Anopheles coluzzii* à Cape Coast, Ghana: qualité de l'eau, nature de l'habitat et implications pour le contrôle des larves. *Malar J.* 2015;14:447.
 49. Sy O, Niang EA, Ndiaye M, Konaté L, Diallo A, Ba E, et al. Entomological impact of indoor residual spraying with pirimiphos-methyl: a pilot study in an area of low malaria transmission in Senegal. *Malar J.* 2018;17:64.
 50. Beklemishev WN. Le cycle gonotrophique, principe de base de la biologie d'*Anopheles*. *Vop Fiziol Ekol Malar Komara.* 1940;1:3.
 51. Coleman S, Dadzie SK, Seyoum A, Yihdego Y, Mumba P, Dengela D, et al. A reduction in malaria transmission intensity in northern Ghana after 7 years of indoor residual spraying. *Malar J.* 2017;16:324.
 52. Mashauri FM, Manjurano A, Kinung'hi S, Martine J, Lyimo E, Kishamawe C, et al. Indoor residual spraying with micro-encapsulated pirimiphos-methyl (Actellic® 300CS) against malaria vectors in the Lake Victoria basin, Tanzania. *PLoS ONE.* 2017;12:e0176982.
 53. Kanyangara M, Mamini E, Mharakurwa S, Munyati S, Gwanzura L, Kobayashi T, et al. Reduction in malaria incidence following indoor residual spraying with Actellic 300 CS in a setting with pyrethroid resistance: Mutasa District, Zimbabwe. *PLoS ONE.* 2016;11:e0151971.
 54. Tugume A, Muneza F, Oporia F, Kiconco A, Kihembo C, Kisakyé AN, et al. Effects and factors associated with indoor residual spraying with Actellic 300 CS on malaria morbidity in Lira District, northern Uganda. *Malar J.* 2019;18:44.

55. Ogouyèmi-Hounto A, Hounkpe B, Savi de Tove YS, Edah E, Houngbegnon P, Koukpoliyi A, et al. Effect of indoor residual spraying on malaria incidence, parasitemia and parasite density among children less than five years of age in northern Benin. *J Parasitol Vector Biol.* 2018;10:129–37.
56. Agossa FR, Padonou GG, Koukpo CZ, Zola-Sahossi J, Azondekon R, Akuoko OK, et al. Efficacy of a novel mode of action of an indoor residual spraying product, SumiShield® 50WG against susceptible and resistant populations of *Anopheles gambiae* (s.l.) in Benin, West Africa. *Parasites Vectors.* 2018;11:293.
57. Agossa FR, Padonou GG, Fassinou AJYH, Odjo EM, Akuoko OK, Salako A, et al. Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora® Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin, West Africa. *Malar J.* 2018;17:484.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4. DISCUSSION GENERALE

4.1. Abondance et distribution saisonnière de *Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex quinquefasciatus* dans l'Alibori et la Donga

La présente étude fournit des données de base entomologiques sur la dynamique de population des deux moustiques les plus abondants de la future zone d'extension de la PID au nord Bénin : Alibori et Donga. Un total de 11 différentes espèces a été collectées alors que Huttel (1950) et Hamon (1954) avaient respectivement collecté 13 et 15 espèces au Sud-est du Bénin. Nos données se rapprochent de celles de Gnanguenon *et al.* (2014) qui a échantillonné 12 espèces de moustiques dans des sites sentinelles y compris la région du Borgou. Selon Ndiath *et al.* (2011), la faune culicidienne aurait été plus diversifiée si au cours de l'échantillonnage, les captures sur appât humain étaient associées à des captures aux pièges lumineux. En effet, la capture à l'intérieur des maisons ne prend pas en compte les moustiques exophiles qui sortent tôt le matin des habitations humaines ni les individus qui piquent à l'extérieur et qui se reposent dans les abris extérieurs. L'abondance de *Anopheles gambiae* s.l. dans les deux régions confirme les études antérieures dans le nord Bénin (Aikpon *et al.*, 2013b ; Gnanguenon *et al.*, 2014). L'abondance relative de *Culex quinquefasciatus* est liée à la prolifération des gîtes larvaires pollués de matières organiques dans les grandes villes choisies pour l'étude. La prédominance de *An. gambiae* s.l. s'explique probablement aussi par le faible niveau d'urbanisation des villages périphériques choisis pour l'étude dans chaque commune. En effet, en milieu rural, contrairement au milieu urbain, les gîtes larvaires sont moins pollués et sont propices au développement des anophèles, d'où la forte densité anophélienne constatée dans les zones rurales. L'agressivité des deux espèces à l'intérieur et à l'extérieur des habitations n'est pas la même dans les sites prospectés. Contrairement à *Cx. quinquefasciatus* qui a une activité trophique similaire à l'intérieur et à l'extérieur, la proportion de *An. gambiae* s.l. piquant à l'intérieur des habitations est relativement élevée dans toute la zone d'étude. Ce comportement de *An. gambiae* s.l. à se nourrir sur l'homme préférentiellement à l'intérieur des maisons, se justifie par le fait que les populations ne se couchent pas à l'extérieur des cases dans la zone d'étude pendant la période de l'abondance de ce vecteur. Ce constat milite pour la réalisation de la pulvérisation intradomiciliaire, stratégie qui cible préférentiellement les vecteurs endophages et/ou endophiles. On note une relation entre l'augmentation de la pluviométrie et celle de la densité de *An. gambiae* s.l. et une diminution de la densité de *Culex quinquefasciatus*. La pluviométrie est un facteur clé qui détermine l'existence des espèces d'anophèles, leur abondance et la durée de la saison de transmission du paludisme (Lindsay *et al.*, 1996; Besancenot *et al.* 2004). Dans le Sahel au Sénégal, Fontenille *et al.* (2003) ont vu la densité anophélienne diminuer avec une diminution des précipitations. Cette observation devrait être prise en compte dans l'établissement du calendrier des pulvérisations: pour une meilleure efficacité

des traitements d'insecticides, la campagne de pulvérisation devrait commencer juste au démarrage de la saison pluvieuse.

Seulement deux espèces du complexe *An. gambiae*, *An. gambiae* et *An. coluzzii*, assurent la transmission du paludisme dans les deux régions avec une prédominance de *An. coluzzii* dans l'Alibori en raison probablement d'une aridité plus élevée comme rapporté dans certaines études au Nigeria (Coluzzi *et al.* (1979, 1985), au Cameroun (Onyabe & Conn, 2001 ; Simard *et al.*, 2009) et au Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2005). Dans la région de l'Alibori située à l'extrême nord du Bénin où le degré d'aridité est élevé, *An. coluzzii* est prédominant (69%) pendant presque toute la période de l'étude. Par contre, dans la région de la Donga située plus au sud, *An. gambiae* trouve des conditions de développement plus favorables. Ces résultats confirment les travaux de Touré *et al.* (1994) qui ont mentionné une diminution graduelle de la fréquence de *An. coluzzii* lorsque l'on passe d'un environnement sahélien au nord à un environnement forestier au sud. L'abondance de *An. gambiae* pendant la saison pluvieuse s'explique par le fait que cette espèce est inféodée aux gîtes larvaires temporaires qui pullulent pendant les périodes de pluies où il se développe. Il disparaît ensuite pendant la saison sèche et réapparaît en grand nombre dès les premières pluies (Diabaté *et al.*, 2008 ; Lehmann & Diabaté, 2008).

Aucun spécimen de *An. arabiensis*, vecteur des zones de savane sèche, n'a été retrouvé dans nos échantillons alors que vingt ans auparavant, Akogbéto (1992) et Akogbéto & Di Deco (1995) signalaient sa présence en sympatrie avec *An. gambiae* au nord du Bénin. Ces résultats confirment les travaux de Djogbénou *et al.* (2010a) qui signalaient la disparition de *An. arabiensis* dans les communes de Tanguiéta et de Natitingou au nord du Bénin entre 2006 et 2007 et ceux de Gnanguénon *et al.* (2014) sur le transect nord-sud, qui ont repéré ce vecteur dans les communes de Dassa et d'Allada, en déplacement vers le sud du Bénin. Ces études avaient notifié que la colonisation des régions du sud par *An. arabiensis* pourrait être liée à un mouvement accéléré de la transhumance des animaux du nord vers le sud observé depuis quelques années. Cette migration de *An. arabiensis* du nord au sud trouverait ses causes dans la déforestation, créant ainsi des conditions favorables au développement de l'espèce au centre et au sud du Bénin.

4.2. Niveau et pic de la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga

L'étude de la dynamique de la transmission du paludisme est un préalable indispensable non seulement pour comprendre l'épidémiologie de cette affection, mais aussi pour mettre en place un contrôle efficace et ciblé des moustiques vecteurs (Fontenille & Simard, 2004). Le suivi entomologique que nous avons réalisé a révélé que *Anopheles gambiae* s.l. et *An. funestus* s.l. sont les principaux vecteurs du paludisme dans l'Alibori et la Donga, ce qui confirme les résultats d'études

antérieures menées en Afrique de l'ouest, et en particulier au Bénin (Akogbéto & Di Deco, 1995; Kelly-Hope *et al.*, 2009; Aikpon *et al.*, 2013b ; Gnanguenon *et al.*, 2014). Parmi ces deux espèces vectrices, *Anopheles gambiae* s.l. est majoritaire (97,72%) dans les deux départements, ce qui corrobore les données précédemment publiées par Aikpon *et al.* (2013b) dans l'Atacora et Gnanguenon *et al.* (2014) à Kandi et Malanville, deux communes du département de l'Alibori. Selon Akogbéto *et al.* (2018), dans l'Alibori et la Donga, le complexe *Anopheles gambiae* est composé de deux espèces jumelles (*An. gambiae* et *An. coluzzii*) dont les proportions sont variables d'un département à l'autre. Dans l'Alibori, *An. coluzzii* et *An. gambiae* ont été trouvés respectivement à 62,2 % et 37,8 %. Dans la Donga, *An. gambiae* était le plus abondant (64,7%). Les deux espèces étaient présentes pendant toute la saison de transmission (Akogbetto *et al.*, 2018).

Le comportement de piqûre de *An. gambiae* s.l. était significativement plus marqué à l'intérieur des habitations. Ce comportement de *An. gambiae* s.l. qui cherche à se nourrir sur homme, préférentiellement à l'intérieur des maisons, se justifie par le fait que les populations se couchent exclusivement à l'intérieur des maisons pendant la saison pluvieuse, période d'abondance du vecteur. Toutefois, cette forte endophagie pourrait être aussi facilitée par l'altération des pouvoirs répulsif et létal des moustiquaires imprégnées distribuées en 2014 au sein des communautés des deux départements. En effet, selon Darriet (2007), la moustiquaire Olyset Net neuve diminue le taux d'entrée de *An. gambiae* s.l. dans les cases de 44% par rapport à une moustiquaire non traitée alors que lorsqu'elle est vieille de trois ans, l'effet répulsif est réduit de moitié et, cet effet n'existe plus lorsque la moustiquaire est lavée. De plus, le dosage de la quantité d'insecticide réalisé par Azondékon *et al.* (2014) à la surface des fibres des MIILDs a révélé une baisse d'efficacité chimique seulement 6 mois après la distribution desdites MIILDs. Par ailleurs, le caractère endophagie de *An. gambiae* s.l. dans la zone d'étude est un atout pour une lutte préventive basée sur la pulvérisation intradomiciliaire.

Quant à *Anopheles funestus*, elle représente la deuxième espèce vectrice rencontrée dans la zone d'étude mais en très faible densité comparativement à *Anopheles gambiae* s.l. Cette très faible densité a été déjà observée par Aikpon *et al.* (2013b) dans le département de l'Atacora et par Gnanguenon *et al.* (2014) à Kandi (département de l'Alibori). La rareté de *An. funestus* s.l. à Kandi et à Gogounou pourrait être due à l'absence de son habitat larvaire typique (présence de cours d'eau douce ombragé permanent ou semi-permanent, des marécages, des étangs et des lacs) dans ces districts compte tenu de la longueur de la période de sécheresse. En 2013, *An. funestus* s.l. a été retrouvé à Copargo (Département de la Donga) avec une forte abondance en saison sèche (Aikpon *et al.*, 2017), mais dans la présente étude (année 2016), il a été collecté à faible proportion dans le même district, certainement en raison de la période d'échantillonnage des moustiques qui n'a pas couvert

tous les mois secs de l'année. Par contre, la densité relativement élevée de *An. funestus* s.l. à Djougou par rapport aux autres communes serait due à l'existence d'une petite rivière semi-permanente située non loin de l'un de nos sites d'étude.

La proportion de spécimens de *An. gambiae* s.l. positifs à l'antigène circumsporozoïtique de *Plasmodium falciparum* est très élevée dans l'Alibori et la Donga (IS=8,05%), ce qui justifie la nécessité de la mise en place d'une stratégie de contrôle des vecteurs du paludisme dans ces deux départements. Cet indice sporozoïtique est similaire à celui obtenu par les études antérieures réalisées dans l'Atacora au nord du Bénin (IS=6,63%) (Aikpon *et al.*, 2013b), à Ouidah-Kpomasse-Tori (Sud du Bénin) (IS=9,63%) (Djènantin *et al.*, 2010a) et à l'Ouest du Kenya (IS=8,2%) (Taylor *et al.*, 1990) mais inférieur à ceux observés à l'Est de la Gambie (IS=17,73%) (Thomson *et al.*, 1994) et en Guinée-Bissau (IS=12%) (Snounou *et al.*, 1993 ; Jaenson *et al.*, 1994). Cette valeur relativement élevée de l'indice sporozoïtique pourrait être due à une augmentation du contact homme-vecteur facilité par des comportements anthropiques et certains facteurs qui accélèrent l'usure des moustiquaires (présence d'objets tranchants ou pointus et de bougies) et chimique (forte fréquence de lavage des MIILDs). De plus, en raison des fortes températures enregistrées dans ces deux départements en saison sèche, certaines personnes à la recherche de l'air frais préfèrent dormir au dehors sans aucune protection contre les piqûres de moustiques. Ce constat souligne la nécessité d'accompagner les campagnes de PID par des campagnes d'information, d'éducation et de communication (IEC) afin de faire comprendre aux populations l'importance de dormir à l'intérieur des habitations dans les zones pulvérisées.

Des taux d'inoculation entomologique (TIE) variés ont été observés dans les différentes communes. Les taux les plus élevés ont été obtenus à Djougou (16,85 piqûres infectantes/homme/mois) et à Copargo (17,66 piqûres infectantes/homme/mois) et les plus faibles à Kandi (10,75 piqûres infectantes/homme/mois) et Gogounou (11,06 piqûres infectantes/homme/mois). Ces résultats suggèrent que l'intensité de la transmission du paludisme est plus forte dans le département de la Donga comparativement à celle de l'Alibori. En considérant la formule $TIE = PHN \times IS$ et la similarité de l'indice sporozoïtique des deux départements, nous pouvons aisément déduire que le taux de piqûre de *An. gambiae* s.l. a été le principal facteur à l'origine de la différence observée entre les niveaux de transmission du paludisme entre les deux départements. Cela confirme les travaux de Garrett-Jones (1964) qui a rapporté que l'abondance des vecteurs est un déterminant important dans le niveau de transmission du paludisme. Dans le cas de la présente étude, la fréquence des piqûres de *An. gambiae* s.l. est significativement plus élevée dans la Donga comparativement à l'Alibori ($P=0,0000177$), ce qui pourrait être lié à certaines caractéristiques environnementales (pluviométrie et humidité du sol plus élevées dans la Donga que dans l'Alibori

favorisant ainsi la prolifération des vecteurs). La variation des niveaux de transmission du paludisme entre les deux départements investigués pourrait être également liée à des différences au niveau des reliefs. Dans l'Alibori, les communes de Kandi et de Gogounou sont situées dans des zones de plateaux versant qui favorisent le ruissellement de l'eau vers le sud du pays après les pluies. Cette situation empêche la formation sur place d'un grand nombre de gîtes larvaires, avec pour conséquence un faible taux de piqûre des vecteurs dans l'Alibori par rapport à la Donga. Ces résultats confirment les travaux réalisés à l'Ouest du Kenya par Omukunda *et al.* (2013) qui ont rapporté des résultats similaires dans des zones bioécologiques analogues.

Les fréquences de piqûres infectées globalement plus élevées en zone rurale qu'en zone urbaine ($p=0$) de toutes les communes étudiées confirment l'hétérogénéité spatiale de l'épidémiologie du paludisme précédemment évoquée par Sovi *et al.* (2013) dans le département du Plateau, au sud-est du Bénin. Les TIE élevés obtenus dans les zones rurales seraient probablement dus à une forte agressivité de *An. gambiae* s.l. issue d'une prolifération exponentielle au niveau des gîtes larvaires très peu chargés de matières organiques et beaucoup moins pollués qui s'y trouvent, contrairement au milieu urbain où les habitats larvaires sont généralement très pollués et par conséquent plus propices au développement des Culicines (Omumbo *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés à Dar es Salam en Tanzanie (Wang *et al.*, 2006a), à Ouagadougou au Burkina-Faso (Wang *et al.*, 2006b), à Tori-bossito au Sud Bénin (Pierrat, 2010), à Kandi au nord est du Bénin (Govoetchan *et al.*, 2014) et sur le transect nord-sud du Bénin (Gnanguenon *et al.*, 2014). Dans notre zone d'étude, le risque d'infection palustre est très élevé pendant la saison pluvieuse mais trop faible pendant la saison sèche malgré le taux de parturité élevé enregistré pendant cette période comparé à la saison pluvieuse. Cette période de transmission du paludisme est relativement plus longue dans la Donga que dans l'Alibori avec un pic respectivement en Août et en Octobre. Ces résultats montrent que les deux départements appartiennent à un faciès tropical caractérisé par une transmission saisonnière de paludisme interrompue par la saison sèche pendant une bonne période de l'année. Un tel faciès épidémiologique se rencontre au Zimbabwe, au Kenya, en Tanzanie, dans les zones septentrionales du Nigeria, du Bénin, du Ghana, de la Côte d'Ivoire et de Guinée (Mouchet *et al.*, 1993). Cette observation devrait être prise en compte dans l'établissement du calendrier des pulvérisations pour une meilleure efficacité de l'intervention. Généralement, il est conseillé de commencer la campagne de pulvérisation avant la période de transmission (juin de préférence dans les deux départements couverts par l'étude). Etant donné que la formulation CS du pirimiphos-méthyl à utiliser pour les campagnes PID prochaines présente une rémanence de quatre mois en phase opérationnelle dans l'Atacora (Akogbéto *et al.*, 2015), la courte durée de la transmission du paludisme dans l'Alibori est un atout.

4.3. Contribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* dans la transmission du paludisme dans l'Alibori et la Donga

L'un des moyens les plus efficaces de réduire le fardeau du paludisme est de contrôler les moustiques anophèles qui transmettent les agents pathogènes (Neafsey *et al.*, 2010). Cependant, un contrôle bien ciblé et efficace ne peut être planifié et réalisé que si les vecteurs du paludisme sont correctement identifiés et leur bionomie spécifique, leur rôle dans la transmission du paludisme et leur répartition géographique sont correctement compris. La présente étude fournit des informations détaillées sur la bioécologie des espèces vectrices du complexe *Anopheles gambiae* et leur contribution dans la transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et de la Donga, au nord du Bénin où une campagne de la PID est programmée. Selon plusieurs études réalisées en Afrique subsaharienne, le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur du paludisme et compte 04 espèces présentes en Afrique de l'Ouest: il s'agit de *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. melas* (Coluzzii *et al.*, 1979 ; Coluzzii *et al.*, 1985 ; Akogbéto & Di Deco, 1995 ; Akogbéto *et al.*, 1995 ; Fontenille *et al.*, 1993 ; Coetzee *et al.*, 2013). Dans la présente étude, seulement 02 espèces ont été retrouvées assurant la transmission du paludisme dans les départements de l'Alibori et de la Donga: *An. gambiae* et *An. coluzzii*. Ces deux espèces sont présentes toute l'année avec une forte prédominance de *An. coluzzii* pendant la saison sèche. De résultats similaires ont été signalés en Angola, où *An. coluzzii* et *An. gambiae* avaient été retrouvés en sympatrie dans la partie basse (San Joao) et haute (Alto Liro) de la commune de Lobito (Toto *et al.*, 2011). Malgré que les 02 zones d'étude aient un climat presque similaire, il y avait une disparité dans la répartition des 02 espèces pendant la saison des pluies avec une forte prédominance de *An. coluzzii* dans le département de Alibori par rapport au département de la Donga. Les faibles proportions de *An. gambiae* pendant la saison sèche pourrait être due à l'assèchement des gîtes de reproduction temporaires pendant cette période de l'année, et de la présence de gîtes de reproduction permanents et semi-permanents beaucoup plus favorables au développement des larves de *coluzzii* (Diabaté *et al.*, 2008 ; Lehmann & Diabaté, 2008).

Malgré le grand nombre d'échantillons de *An. gambiae* s.l. (plus de 4000 moustiques) analysés à la PCR, aucune espèce de *An. arabiensis* n'a été identifiée. Un seul spécimen de *Anopheles nili* a été identifié morphologiquement dans la zone d'étude. L'absence de *An. arabiensis* dans la zone d'étude pourrait être due au comportement exophile et zoophile de cette espèce et à sa disparition progressive dans certains environnements en Afrique de l'Ouest (Coluzzii *et al.*, 1979 ; Touré, 1985), en particulier dans le nord du Bénin (Akogbéto & Di Deco, 1995). En effet, dans les années 1992, Akogbeto (1992) avait signalé la présence de *An. arabiensis* en sympatrie avec *An. gambiae* s.s. au

nord du Bénin. En 2010, soit 18 ans après, Aïkpon *et al.* (2013) ont signalé sa disparition dans la même région.

Les taux globaux de piqûres de *An. gambiae* et de *An. coluzzii* n'étaient pas plus élevés à l'extérieur qu'à l'intérieur, aussi bien pendant la saison des pluies que pendant la saison sèche, ce qui suggère un rôle important à jouer par les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides (MII) dans les efforts de prévention contre le paludisme. Cependant, malgré la présence des MII dans les maisons choisies étudiée, *An. gambiae* a maintenu un indice élevé de contact entre l'homme et le vecteur, ce qui pourrait être le résultat de la résistance du vecteur aux insecticides pyréthroïdes utilisés pour traiter ces moustiquaires. En effet, les captures sur homme montrent un contact homme-vecteur plus prononcé à l'intérieur chez *An. gambiae* (56,6%: 751/1326) que chez *An. coluzzii* (43,4%: 575/1326) ($p < 0,0001$). Ce taux de piqûre plus élevé à l'intérieur observé chez *An. gambiae* serait dû probablement à une plus grande capacité de *An. gambiae* à se nourrir sur des hommes à l'intérieur des habitations. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Tuno *et al.* (2010) au Ghana qui ont observé une forte endophagie de *An. gambiae* par rapport à *An. melas*.

Un taux de gorgement très élevé a été observé chez les populations de *An. gambiae* (96,68%) et de *An. coluzzii* (90,20%) collectés après aspersion matinale d'insecticide à l'intérieur des maisons, avec un indice d'anthropophagie élevé et similaire chez les deux espèces (0,97). Ces résultats confirment les études similaires antérieures réalisées par Aikpon *et al.* (2013) dans l'Atacora; Padonou *et al.* (2012a) dans l'Ouémé et Ototo *et al.* (2015) à l'Ouest du Kenya. Du fait que *An. gambiae* et *An. coluzzii* aient une anthropophagie similaire, ces deux espèces ont montré des indices sporozoïtiques similaires respectivement de 8,5% et 8,9% ($p = 0,60$). Ce résultat rappelle les travaux de Carnevale *et al.* (2015), qui ont observé le même taux d'infection chez *An. coluzzii* et *An. gambiae* à Lobito en Angola. Compte tenu de cette attractivité similaire des deux espèces jumelles vis-à-vis des hôtes humains et le grand nombre d'échantillons (plus de 4000) analysé à l'ELISA-CSP, il est probable que *An. gambiae* et *An. coluzzii* aient la même capacité à offrir un environnement physico-chimique adapté au développement du *Plasmodium falciparum* au cours du cycle sporogonique.

En tenant compte du fait que la capacité vectorielle d'une population d'anophèle dépend de plusieurs facteurs, notamment de la capacité à favoriser le développement du cycle sporogonique, la contribution de *An. coluzzii* et de *An. gambiae* à la transmission du paludisme a été exprimée en termes d'indice sporozoïtique (IS) et de fréquence des contacts homme-vecteur (PHN). Sur la base des taux d'inoculation entomologique (TIE) calculés, *An. coluzzii* est impliqué dans 85,6% de la transmission du paludisme dans Alibori et 78,8% dans Donga pendant la saison sèche, contre seulement 14,4% et 21,2% respectivement dans l'Alibori et dans la Donga pour *An. gambiae*. De

plus, pendant la saison des pluies, *An. coluzzii* continue de contribuer majoritairement à la transmission du paludisme dans Alibori (64,8% contre 35,2% pour *An. gambiae*), alors que la situation inverse a été observée dans la Donga avec une contribution plus élevée de *An. gambiae* à la transmission du paludisme (65,7% contre 34,3% pour *An. coluzzii*) pendant la saison des pluies. La variation de l'abondance de chaque espèce vectrice d'une saison à l'autre pourrait expliquer cela. En effet, les départements de l'Alibori et de la Donga sont traversés par plusieurs rivières et barrages d'eau qui créent tout au long de l'année (saisons des pluies et sèches), des sites de reproduction permanents et semi-permanents adaptés au développement des larves de *An. coluzzii*. De plus, le département de la Donga est caractérisé par un sol de type hydromorphe par endroit, qui retient l'eau, et entraînant ensuite la formation de nombreux gîtes de reproduction temporaires favorables à l'émergence de *An. gambiae* comme principal vecteur de transmission du paludisme pendant la saison des pluies. Par contre, dans l'Alibori, le sol de type sableux ou ferrugineux provoquant l'infiltration rapide de l'eau et, par conséquent, très peu d'habitats larvaires temporaires se créent, ce qui justifie le fait que *An. coluzzii* provenant des gîtes de reproduction permanents et semi-permanents (barrages d'eau souvent créés pour l'abreuvement des animaux) continue de jouer le rôle majeur dans la transmission du paludisme pendant la saison des pluies dans cette région. Il est possible que ces conditions environnementales et ce changement de comportement humain aient contribué de manière significative aux variations observées dans les proportions de *An. coluzzii* et *An. gambiae* (Carnevale *et al.*, 2015).

De nombreuses études ont rapporté la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes en Afrique (Nwane *et al.*, 2009 ; Camara *et al.*, 2018 ; Mathias *et al.*, 2011; Hien *et al.*, 2017 ; Olé Sangba *et al.*, 2017 ; Djègbè *et al.*, 2018). Au Bénin, la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoïdes observée d'abord à Cotonou s'est propagée non seulement aux régions centrales et méridionales du pays, mais aussi aux parties nord (Akogbéto & Yakoubou, 1999 ; Chandre *et al.*, 1999 ; Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouleton *et al.*, 2009 ; Sovi *et al.*, 2013 ; Akogbeto *et al.*, 2015 ; Gnanguenon *et al.*, 2015 ; Yahouédo *et al.*, 2016). La faible fréquence de la mutation *Kdr* L1014F observée chez *An. coluzzii* dans l'Alibori pourrait favoriser l'impact des MII et entraîner un meilleur contrôle du paludisme dans ce département par rapport à la Donga. Cependant, si le pirimiphos-méthyl (organophosphoré) est à nouveau utilisé pour la PID dans la zone d'étude, un impact positif pourrait être attendu en raison des très faibles fréquences de la mutation *Ace*¹ (0,01–0,03) chez les deux espèces.

4.4. Dynamique de la résistance des vecteurs aux insecticides et caractérisation des mécanismes biochimiques et moléculaires dans l'Alibori et la Donga

Le suivi de la résistance des anophèles vecteurs du paludisme aux insecticides fait partie intégrante de toute stratégie de gestion de la résistance, ce qui permet des décisions éclairées sur le choix des insecticides pour chaque méthode de lutte en fonction du contexte (WHO, 2012b). Cette surveillance a permis à certains pays de se rendre compte de l'évidence de la résistance des vecteurs du paludisme à une ou plusieurs classes d'insecticides. Au Bénin, plusieurs études ont révélé l'expansion de la résistance aux différentes familles d'insecticides chez *Anopheles gambiae* s.l., principal vecteur du paludisme, (Akogbeto & Yakoubou, 1999; Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouleton *et al.*, 2010; Djègbè *et al.*, 2011; Aïkpon *et al.*, 2013b; Aïzoun *et al.*, 2013a , 2013b ; Gnanguenon *et al.*, 2015). La présente étude révèle une résistance confirmée à la deltaméthrine et à la perméthrine (pyréthrinoides) et une augmentation du niveau de sensibilité des vecteurs grâce à l'utilisation du synergiste PBO dans les départements de l'Alibori et la Donga. Elle montre également une baisse de sensibilité au bendiocarb (carbamates) dans certaines localités et une sensibilité au pirimiphos- méthyl (organophosphoré).

Les niveaux de résistance à la perméthrine et à la deltaméthrine observés dans la présente étude étaient significativement variables d'une localité à une autre et ont fortement augmenté par rapport à ceux obtenus en 1999 (Akogbeto & Yakoubou, 1999). Cette résistance de *An. gambiae* s.l. à ces pyréthrinoides confirment les études antérieures réalisées au Bénin (Corbel *et al.*, 2007 ; Yadouleton *et al.*, 2009 ; Djogbénou *et al.*, 2011 ; Djègbè *et al.*, 2011 ; Aïkpon *et al.*, 2013a ; Sovi *et al.*, 2014). Les plus faibles taux de mortalité des vecteurs aux pyréthrinoides ont été observés dans les localités de Kandi, Djougou et Ségbana. Cette différence serait liée à la très forte pression de sélection insecticide exercée sur les populations vectrices de ces localités reconnues pour leur grande production cotonnière (Ton, 2004). Selon plusieurs auteurs, la large distribution et le niveau élevé de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides seraient dus à l'expansion de l'agriculture et principalement la culture de coton (Curtis *et al.*, 1998; Diabate *et al.*, 2002 ; Akogbeto *et al.*, 2006). Mais à cela, s'ajoutent les pressions insecticide engendrées par l'utilisation massive et universelle des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides, distribuées à l'échelle nationale (Czeher *et al.*, 2008 ; Protopopoff *et al.*, 2008). Cette résistance notée chez les populations de *An. gambiae* s.l. de notre zone d'étude est très fortement associée à la présence du gène *Kdr 1014F* qui semble être le principal mécanisme de résistance aux insecticides. Il a été retrouvé à des fréquences alléliques très élevées (0,77 en moyenne) dans toutes les populations de *An. gambiae* s.l. testées. L'allèle résistant *Kdr L1014S* n'a pas été détecté dans nos échantillons. La fréquence *Kdr 1014F* semble être plus élevée chez *An. gambiae* que chez *An. coluzzii* dans la plupart des localités. Ces résultats confirment les travaux récents de Gnanguenon *et al.* (2015) et Yahouédo *et al.* (2016) respectivement sur le transect

nord-sud et au sud du Bénin qui ont obtenu des résultats analogues. Plusieurs études antérieures ont montré que les fréquences du gène *Kdr L1014F* étaient plus élevées chez *An. gambiae* en Afrique de l'Ouest et du Centre (Chandre *et al.*, 1999 ; Kristan *et al.*, 2003 ; Santolamazza *et al.*, 2008) comparativement à *An. coluzzii* qui présentait des fréquences plus basses (Kristan *et al.*, 2003 ; Santolamazza *et al.*, 2008) sauf dans quelques zones côtières urbaines et périurbaines (Tia *et al.*, 2006). L'expansion du gène *Kdr L1014F* dans les populations des principaux vecteurs du paludisme au Bénin pourrait compromettre l'efficacité des outils de lutte antivectorielle (Chouaibou *et al.*, 2008). Toutefois, le niveau de la résistance des vecteurs à la perméthrine et à la deltaméthrine a été quelque peu réduit par le synergiste PBO dans toutes les localités confirmant l'implication des mono-oxygénases à cytochromes P450 dans la résistance aux pyréthrinoïdes dans notre zone d'intervention. Ces oxydases sont impliquées dans la détoxification des pyréthrinoïdes chez *Anopheles gambiae* s.l. (Miller *et al.*, 1988 ; Berge *et al.*, 1998). Nos données biochimiques ont révélé leur surexpression chez les populations de *An. gambiae* s.l. des localités de Djougou, Gogounou et Kandi. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Djouaka *et al.* (2011) chez les populations naturelles de *An. funestus* à Pahou et confirme les travaux de Corbel *et al.* (2007), Djègbè *et al.* (2011) et Aïzoun *et al.* (2013b) respectivement à Parakou, Malanville et Kandi, trois localités du nord Bénin proches de notre zone d'étude. L'utilisation à grande échelle des MIILDs et les quantités énormes de pyréthrinoïdes utilisés en milieu agricole pourraient être à l'origine de la surproduction des oxydases. Ces pressions insecticides étaient responsables des taux élevés d'oxydases à l'ouest du Kenya chez les populations de *An. gambiae* s.s. (Kawada *et al.*, 2011 ; Ochomo *et al.*, 2013). Ainsi, cette présence simultanée du gène *Kdr 1014F* et des oxydases pourrait conférer un niveau de résistance plus élevé aux moustiques. Dans ces conditions, l'imprégnation des moustiquaires avec du PBO (synergiste destiné à inhiber l'action des oxydases) en combinaison avec un pyréthrinoïde pourrait être envisagée afin d'améliorer l'efficacité des MIILDs. Pour cela, nous suggérons la promotion des moustiquaires Permanet 3.0 et Olyset Plus qui sont imprégnées à la fois de pyréthrinoïdes et de synergiste PBO dans toutes ces localités investiguées. Par ailleurs, la forte activité des Glutathion-S-Transférase au sein des populations sauvages de *An. gambiae* s.l. dans les localités de Copargo et Gogounou pourrait jouer un rôle mineur dans la résistance aux pyréthrinoïdes en raison de la désintoxication des produits issus de la peroxydation des lipides induites par les pyréthrinoïdes (Hemingway *et al.*, 2004). D'autres études attribuent cette surexpression des GST à la résistance de *An. gambiae* vis-à-vis du DDT (Corbel *et al.*, 2007). Ainsi, ces enzymes (GST) pourraient donc augmenter la résistance phénotypique aux pyréthrinoïdes et au DDT due à la mutation *Kdr* et élargir le spectre de résistance aux composés indépendants (Vontas *et al.*, 2001).

Outre la résistance aux pyréthrinoïdes, l'apparition d'une possible résistance au sein des différentes populations testées au bendiocarb (carbamate) est un peu alarmante. Elle est associée à de faibles fréquences du gène *Ace-1R* (1 à 6% en fonction de la localité). Cette résistance au bendiocarb avait été signalée à des fréquences du gène *Ace-1R* presque nulles (0 à 1%) par Corbel *et al.* (2007), Djènontin *et al.* (2010a), Aïzoun *et al.* (2013a), Gnanguenon *et al.* (2015). Ce début de résistance au bendiocarb associée à l'augmentation progressive de la fréquence *Ace-1R* est très inquiétant puisque plusieurs études ont montré que cet insecticide représente une alternative potentielle aux pyréthrinoïdes pour la gestion de la résistance (Guillet *et al.*, 2001 ; Djènontin *et al.*, 2009 ; Akogbéto *et al.*, 2010). Les plus fortes fréquences du gène *Ace-1R* sont retrouvées chez *An. gambiae* (2 à 6%) et les plus faibles chez *An. coluzzii* (0 à 1%). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Aïkpon *et al.* (2013a) dans l'Atacora et Gnanguenon *et al.* (2015) à Kandi au nord du Bénin. Cette résistance de *An. gambiae* au bendiocarb serait probablement due à la forte pression sélective que représente l'usage d'importantes quantités de carbamates et d'organophosphorés en milieu agricole dans ces deux départements. Cependant, même si le gène *Ace-1R* est souvent incriminé dans la résistance des vecteurs aux carbamates et aux organophosphorés, il n'explique pas complètement la résistance observée au bendiocarb car quelques individus homozygotes sensibles survivent après exposition à ce carbamate (Tia *et al.*, 2006). La forte activité des estérases non-spécifiques notée dans les localités de Djougou, Ouake, Copargo et Kandi en est la preuve. Ces enzymes peuvent conférer la résistance aux organophosphorés et aux carbamates (Hemingway *et al.*, 2004). Cette surproduction des estérases confirme les travaux réalisés par Gnanguenon *et al.* (2015) à Kandi et pourrait être due à la pression exercée sur les larves de moustiques par les molécules insecticides utilisées par les agriculteurs afin de lutter contre les ravageurs du coton (Akogbeto *et al.*, 2006 ; Yadouleton *et al.*, 2009). Par contre, la sensibilité des populations de *An. gambiae* au pirimiphos-méthyl observée dans les deux départements sillonnés confirme les résultats de Asidi *et al.* (2005) qui ont montré que la présence de la mutation *Ace-1* ne confère pas une résistance systématique aux organophosphorés. Ceci expliquerait la sensibilité au pirimiphos méthyl associée à une possible résistance au bendiocarb même dans les zones où la pression insecticide est forte.

Dans le contexte actuel de multiples mécanismes de résistance observés chez *An. gambiae* s.l. dans les départements de l'Alibori et la de Donga, la pulvérisation intradomiciliaire à base du pirimiphos-méthyl serait une alternative idéale pour le contrôle des vecteurs résistants aux pyréthrinoïdes.

4.5. Impact entomologique de Actellic 300 CS en pulvérisation intradomiciliaire dans l'Alibori et la Donga.

La durée de l'efficacité résiduelle de l'insecticide appliqué sur les surfaces des murs constitue l'un des facteurs qui influencent l'efficacité de la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide à effet rémanent (PID) (WHO, 1993 ; WHO, 1995). Dans les départements de l'Alibori et de la Donga, la rémanence de Actellic 300 CS (pirimiphos méthyl) utilisé pour les campagnes de PID de 2017 et 2018 est estimée à 04 - 5 mois (Mai - Septembre/Octobre). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Chanda *et al.* (2013) en Zambie et par Tchicaya *et al.*, (2014) à Mbe en Côte d'Ivoire qui ont observé une efficacité résiduelle de Actellic 300 CS de 04 à 05 mois sur les murs en banco et en ciment. Par contre, la rémanence de Actellic 300 CS observée dans la présente étude est plus faible que celle observée à Zanzibar (8 mois) par Haji *et al.* (2015) pour le même produit. Ces différences dans la rémanence en communauté de Actellic 300CS d'un pays à un autre, pourraient être dues à l'influence de plusieurs facteurs variables tels que : les conditions environnementales (température, humidité relative, exposition aux rayons ultraviolets) (Hadaway & Barlow, 1963 ; Crosby *et al.*, 1965; Müller & Stan, 1990; Santos *et al.*, 2007 ; Senneca *et al.*, 2007), la composition et les caractéristiques (porosité, pH) des murs traités (Mulambalah *et al.*, 2010 ; Etang *et al.*, 2011 ; Sibanda *et al.*, 2011), les interférences humaines sur les surfaces traitées (lavage des murs pulvérisés) (Dengela *et al.*, 2018).

Deux principaux vecteurs du paludisme ont été retrouvés dans les zones traitées et témoins: *An. gambiae* s.l. (98,05%), qui représente l'espèce la plus prédominante et *An. funestus* (1,59%). Ces données corroborent les travaux antérieurs réalisés par Gnanguenon *et al.* (2014) à Kandi (nord-est du Bénin), par Aikpon *et al.* (2014) dans l'Atacora, un département voisin de celui de la Donga (nord-ouest du Bénin) et Salako *et al.* (2018) dans ces mêmes zones en prélude à la PID. L'identification des espèces moléculaires du complexe *An. gambiae* a révélé que *An. gambiae* (65,60%), *An. coluzzii* (33,42%) et *An. arabiensis* (0,98%) vivent en sympatrie. La prédominance de *An. gambiae* dans la zone d'étude et plus particulièrement en saison pluvieuse, confirme que cette espèce est inféodée aux zones de savane sèche où de nombreux gîtes temporaires se forment après les pluies, comme l'ont souligné des études antérieures réalisées dans des zones bioécologiques analogues au Nigéria (Onyabe *et al.*, 2003), au Camérout (Wondji *et al.*, 2002) et au Burkina Faso (Dabiré *et al.*, 2009). Par contre, la prépondérance de *An. coluzzii* en saison sèche serait due à la présence des gîtes permanents et semi-permanents (barrages, abreuvoirs) ou d'autres habitats pollués par des substances organiques qui sont plus favorables au développement de cette espèce (Simard *et al.*, 2009 ; Kudom, 2015). La faible fréquence de *An. arabiensis* (n=27) pourrait être due à certaines conditions telles que la déforestation et les saisons sèches de plus en plus longues qui sont défavorables à la survie de l'espèce.

Globalement, après le premier tour de la PID, des densités, des taux de gorgement, de parturité et d'infectivité significativement plus faibles ont été observés comparativement à la période avant intervention. Similairement, après le premier et le deuxième tour de la PID, les niveaux de ces indicateurs étaient significativement plus faibles dans les zones traitées comparées aux zones témoins. En effet, les zones traitées étaient probablement devenues difficilement vivables pour les anophèles vecteurs qui fuyaient les maisons traitées, ce qui fait qu'une faible densité de *Anopheles gambiae* s.l. au repos y étaient collectés. Ainsi, seule une proportion réduite de vecteurs pourrait réussir à prendre leur repas de sang à l'intérieur des maisons traitées comme observé par Sy *et al.* (2018) au centre-ouest du Sénégal. Les taux de gorgement réduits des vecteurs ont certainement induit des taux de parturité plus faibles dans les zones traitées puisque, le succès dans la prise du repas de sang conditionne la maturation des ovaires (Beklemishev, 1940). De plus, il se peut que l'effet létal de Actélic 300 CS n'ait pas favorisé l'incubation du parasite chez les vecteurs avant qu'ils ne meurent, d'où la faible infectivité de ces derniers en zones traitées par rapport aux zones témoins. Ces résultats confirment les travaux de Coleman *et al.* (2017) au nord du Ghana et de Mashauri *et al.* (2017) dans le bassin du lac Victoria en Tanzanie qui ont également observé une réduction de l'infectivité de *An. gambiae* s.l. au *Plasmodium* après pulvérisation de Actellic 300 CS.

Avant intervention (juin-octobre 2016), le taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. gambiae* s.l. est estimé à 21,21 piqûres infectantes/personne/mois dans l'Alibori et la Donga. Par contre, après le premier tour de la PID (juin-octobre 2017), une baisse substantielle du TIE à 2,7 piqûres infectantes/personne/mois est notée, soit une réduction de 87,27%. Après chacun des 2 tours de la PID, une personne recevait en moyenne 12,11 piqûres infectantes/mois et 9,75 piqûres infectantes/mois dans la zone témoin (Bembereke et Kouande) contre 1,6 piqûres infectantes/mois et 1,5 piqûres infectantes/mois dans la zone traitée (Alibori et Donga) respectivement en 2017 et 2018, soit une réduction de 86,78% en 2017 et 84,61% en 2018. Cette baisse du TIE serait due à une forte couverture de la PID dans les zones traitées (plus de 91% de couverture de PID en 2017 et 92% en 2018). En effet, des résultats similaires ont été obtenus en Zambie (Chanda *et al.*, 2013), Zimbabwe (Kanyangarara *et al.*, 2016), en Tanzanie (Mashauri *et al.*, 2017) et en Ouganda (Tugume *et al.*, 2019) où une couverture de plus de 85% de la PID avec Actellic 300 CS a été observée. Parallèlement, les résultats d'une étude épidémiologique réalisée en 2017 après la PID, ont révélé que la baisse du TIE était accompagnée d'une diminution de l'incidence de 8% chez les enfants âgés de moins de cinq ans dans la zone traitée (Donga), tandis que dans la zone témoin (Borgou), l'incidence a augmenté de 17% (Ogouyèmi-Hounto *et al.*, 2018). La réduction du TIE (86,78% en 2017 et 84,61% en 2018) dans notre zone d'étude est en deçà de celle précédemment observée par Akogbéto *et al.* (2011)

(94,4%) dans l'Ouémé (sud du Bénin), Aikpon *et al.* (2014) (99,24%) dans l'Atacora et, Sy *et al.* (2018) (92,59%) au centre-ouest du Sénégal.

Bien que le taux de gorgement et l'infectivité des anophèles soient significativement plus faibles en zones traitées comparativement aux zones non traitées, ils ne sont pas négligeables. Ce constat souligne la nécessité d'accompagner les campagnes de PID par des campagnes d'Information, d'Education et de Communication (IEC) afin de faire comprendre aux populations l'importance de dormir sous MIILDs à l'intérieur des habitations dans les zones pulvérisées.

Actuellement, le pirimiphos méthyle CS est le seul produit utilisé en PID au Bénin en raison de la résistance de *An. gambiae* s.l. observée au bendiocarb et aux pyréthrinoides (Aikpon *et al.*, 2013a). La résistance étant un phénomène dynamique, son émergence vis à vis des organophosphorés dans le temps n'est pas à exclure. Dans ce cas, l'utilisation des insecticides de nouvelle génération tels que SumiShield® 50WG et Fludora ® Fusion récemment homologués par l'OMS et dont la rémanence est d'environ 8 à 10 mois (Agossa *et al.*, 2018a ; Agossa *et al.*, 2018b) pourra être envisagée afin de couvrir toute la durée de transmission du paludisme (environ 06 mois) dans les deux régions.

4.6. Défis affectant l'impact de la pulvérisation intradomiciliaire au Bénin

Les données entomologiques collectées avant et après le déploiement de la PID dans les départements de l'Alibori et la Donga nous ont permis d'identifier cinq défis majeurs de la lutte antivectorielle au nord du Bénin.

Défi lié à la transmission résiduelle du paludisme dans les communes couvertes par la PID: absence de corrélation évidente entre la diminution du TIE et l'incidence du paludisme

Nos résultats ont montré qu'avant intervention, le taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. gambiae* s.l. était estimé à 21,21 piqûres infectantes/personne/mois dans les futures zones PID contre 2,7 piqûres infectantes/personne/mois après le premier tour de la PID, soit une baisse substantielle du TIE de 87,27%. A l'issue des 2 tours de la PID, une réduction de 86,78% en 2017 et 84,61% en 2018 a été observée dans les zones traitées par rapport aux zones témoins. Ce résultat suggère l'existence d'une transmission résiduelle du paludisme d'environ 10% malgré la couverture de plus de 80% des structures protégées par la PID en communauté.

Des interrogations sur l'évidence de l'impact de la PID sur des données épidémiologiques de routine collectées dans les formations sanitaires nous amènent à observer cette réduction du TIE avec prudence. La réduction du TIE observée pourrait être insuffisante pour réduire les indicateurs épidémiologiques étant donné que le TIE résiduel dans les communes sous PID était encore plus élevé que dans certaines régions de paludisme stable. Des résultats mitigés ont été également observés dans une étude initiée et conduite de 2011 à 2015 au Bénin, au Cameroun, au Kenya, en Inde et au Soudan

et portant sur l'efficacité des outils de lutte antivectorielle (MIILD et PID) sur les paramètres épidémiologiques. Les auteurs ont observé très peu de corrélation entre la diminution des paramètres entomologiques et les paramètres parasitologiques et cliniques (Kleinschmidt *et al.*, 2015 ; Tokponnon *et al.*, 2019). Une autre étude sur l'efficacité de quatre interventions de lutte antivectorielle soutenue par le ministère français de la Coopération dans des zones de forte résistance des vecteurs aux insecticides au Bénin n'a montré aucune différence significative entre les stratégies de lutte (Djènantin *et al.*, 2010b ; Corbel *et al.*, 2012). Cette étude comparative réalisée dans 28 villages au sud du Bénin sur l'efficacité de diverses interventions de lutte antivectorielle sur les indicateurs épidémiologiques: couverture ciblée des MIILDs pour les femmes enceintes et les enfants âgés de moins de 6 ans (T-MIILDs, groupe de référence), couverture universelle des MIILDs de toutes les unités de couchage (U-MIILDs), couverture ciblée des T-MIILDs pour les femmes enceintes et les enfants âgés de moins de 6 ans en plus d'une couverture complète de la PID au bendiocarb appliqués tous les 8 mois (T-MIILDs + PID), et U-MIILDs en plus d'une couverture complète de bâches en plastique traitées au bendiocarb (CTPS) (U-MIILDs + CTPS). Les résultats de l'étude ont révélé que l'incidence clinique du paludisme n'a été réduite ni chez les enfants du groupe U-MIILDs, ni chez ceux du groupe T-MIILDs + PID, ni chez ceux du groupe U-MIILDs + CTPS comparé au groupe de référence (T-MIILDs) malgré la réduction significative du taux de piqûre et du TIE des vecteurs.

Des relations entre l'incidence de *P. falciparum* et le TIE avaient déjà été observées par Beier *et al.* (1994) dans une étude réalisée à l'ouest du Kenya, montrant que les mesures du TIE ou du taux de piqûre des vecteurs peuvent être utilisées pour prédire les taux de mortalité chez les enfants. Quelques années plus tard, la relation de base entre les TIE et la prévalence de *P. falciparum* dans différentes zones écologiques a montré de manière convaincante que des réductions significatives de la prévalence du paludisme ne peuvent être obtenues que lorsque les TIE sont réduits à des niveaux inférieurs à une piqûre infectieuse par personne et par an (Beier *et al.*, 1999). Ce rapport a montré que des sites présentant des TIE inférieurs à 5 piqûres infectantes/an ont des niveaux de prévalence au *P. falciparum* supérieurs à 40 % et lorsque la transmission dépasse 15 piqûres infectantes/an, aucun site ne présente une prévalence inférieure à 50 %.

Plusieurs raisons pourraient être à l'origine de l'existence de cette transmission résiduelle: la résistance des vecteurs aux insecticides (N'guessan *et al.*, 2007a ; Pinto *et al.*, 2007 ; Ranson *et al.*, 2009), la faible activité résiduelle de Actellic 300 CS au Bénin (Akogbéto *et al.*, 2015), la non utilisation des MIILDs par la population pendant certaines périodes de l'année (N'tcha, 2019), ainsi que l'existence d'une fréquence substantielle de piqûres infectées des vecteurs à l'extérieur des habitations (Govella & Ferguson, 2012). Dans le but de gérer cette résistance des vecteurs aux

insecticides et d'améliorer l'efficacité de la PID, deux nouvelles formulations SumiShield™ 50WG et Fludora Fusion™ WP-SB avec de nouveaux modes d'action ont été développées et pré-qualifiées respectivement en 2017 et 2018 par le Système d'évaluation des pesticides de l'Organisation mondiale de la santé (WHO, 2018b ; WHO, 2018c). Ces deux formulations contiennent de la clothianidine qui est un nouvel insecticide utilisant un nouveau mode d'action, ce qui pourrait limiter les phénomènes de résistance croisée avec les insecticides existants. De plus, l'évaluation des deux nouvelles formulations en cases expérimentales a montré une bonne efficacité résiduelle (>8 mois) (Ngufor *et al.*, 2017; Agossa *et al.*, 2018; Ngwej *et al.*, 2019). Cependant, l'arsenal réel d'insecticides utilisables pour la PID en Afrique sub-saharienne demeure très limité à cause du développement de la résistance des vecteurs aux insecticides. De plus, tous les nouveaux insecticides pré-qualifiés par l'OMS pour la lutte antivectorielle proviennent de l'agriculture, ce qui augmente le risque de développement de la résistance chez les vecteurs. Récemment, une investigation faite sur la sensibilité des vecteurs à la clothianidine dans 16 pays d'Afrique entre 2016-2017 a révélé une suspicion de résistance dans au moins un site de 5 pays (Mali, Sénégal, Ouganda, Ghana et Zambie) (Oxborough *et al.*, 2019). Au Bénin, les tests n'ont pas encore été réalisés pour évaluer le niveau de sensibilité des vecteurs à la clothianidine. Toutefois les résultats obtenus dans les autres pays montrent qu'il y a un besoin urgent de développer d'autres insecticides avec de nouveaux modes d'action et de préférence non utilisés en agriculture pour maintenir l'efficacité de la PID face à la menace croissante que représente la résistance multiple des vecteurs aux insecticides.

Enfin, si on considère les données sur l'exposition des populations humaines aux piqûres des vecteurs en Afrique sub-saharienne, il est évident que la transmission des *Plasmodium spp.* continuerait même avec une couverture complète de PID et de MIILDs (Monroe *et al.*, 2019). Ceci s'explique par le fait que la PID cible uniquement les vecteurs endophiles et les MIILDs, les vecteurs endophages et nocturnes. Par conséquent, les vecteurs exophages/exophiles et zoophages qui ne sont pas atteints par la PID et les MIILDs, pourraient maintenir la transmission dans la population humaine. L'importance de cette transmission résiduelle est d'autant plus préoccupante qu'elle peut augmenter quand le niveau de la couverture de la PID et des MIILDs augmente (Fornadel *et al.*, 2010; Moiroux *et al.*, 2012; Ojuka *et al.*, 2015). Selon de récentes estimations, la proportion de transmission à l'extérieur des habitations a considérablement augmenté entre 2003 et 2018 en Afrique (Sherrard-Smith *et al.*, 2019). Il y a donc un besoin réel et urgent d'évaluer et de déployer des stratégies efficaces dirigées contre les vecteurs responsables de la transmission résiduelle. Par exemple, les personnes qui dorment à l'intérieur des maisons traitées devraient associer l'utilisation des MIILDs. Celles qui restent à l'extérieur pour diverses activités (cuisiner, au repos, prier, écouter la radio, manger, faire des tâches ménagères, prendre de l'air frais à cause de la chaleur) devraient utiliser une pommade

anti-moustique ou des serpentins fumigènes. Une autre alternative serait de porter des vêtements imprégnés de répulsifs, disponibles dans certains pays.

Le choix des zones témoin affecte l'estimation de la réduction du TIE dans les zones d'intervention.

Les taux élevés de réduction des paramètres entomologiques observés dans les zones PID doivent être pris avec prudence. Ils ont été estimés sur la base des données collectées dans les zones témoins. Pourtant, il n'est pas facile d'avoir des zones témoins ayant les mêmes caractéristiques environnementales que les zones d'intervention. Au cours de l'évaluation entomologique de la PID dans les départements de l'Alibori et de la Donga, les données ont été comparées sur deux périodes: avant la PID (données de base de 2016) et après les campagnes de PID respectives de 2017 et 2018. Cependant, entre ces deux périodes, des facteurs tels que la saison, les conditions socio-économiques et anthropologiques pourraient varier. Les deux méthodes de comparaison du TIE présentent donc des limites qui pourraient influencer l'estimation de sa réduction. Nous suggérons des dispositions appropriées pour identifier de meilleures zones témoin.

Comment la PID au Bénin peut-elle bénéficier des stratégies de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides ?

L'émergence de la résistance des vecteurs du paludisme au bendiocarb dans le département de l'Atacora (Aïkpon *et al.*, 2013a ; Akogbéto *et al.*, 2015) pourrait être liée non seulement aux campagnes de routine de la PID, mais aussi à l'utilisation massive d'insecticides agricoles contre les ravageurs du coton (Yadouléon *et al.*, 2011). La gestion de cette résistance ne peut être perçue uniquement en un remplacement d'un insecticide par un autre. Deux méthodes pourraient être utilisées:

- (i) les PNLPs devraient éviter d'exposer les anophèles vecteurs au même produit pendant plusieurs années. Cela permettrait d'affaiblir les moustiques porteurs de gènes de résistance (coût génétique). Pour y parvenir, Akogbeto *et al.* (2015) proposent l'alternance des campagnes PID avec les campagnes de distribution universelle de MIILDs. Cela signifie que, la mise en œuvre de la PID aura lieu deux ans après la distribution des MIILDs. En ce moment-là, la plupart des MIILDs auraient déjà perdu leur efficacité insecticide et certaines seraient déchirées. La perte d'efficacité des pyréthrinoïdes sera alors couverte par un insecticide non pyréthrinoïdes en PID.
- (ii) une combinaison de deux insecticides avec des modes d'action différents pourrait être utilisée en rotation avec la première méthode. La méthode basée sur l'utilisation combinée ou mosaïque de 2 ou 3 insecticides est bien connue des PNLPs, mais sa mise en œuvre est assez difficile en raison des

insecticides disponibles recommandés pour la PID. Cependant, l'homologation par l'OMS de deux nouveaux insecticides pour la PID (SumiShield de Sumitomo Chemicals et Fludora Fusion de Bayer Crop Science) devrait faciliter la gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides.

Pratiques communautaires affectant l'impact de la PID

En partant des réductions des paramètres entomologiques qui n'ont pas été associées à des réductions similaires des indicateurs épidémiologiques dans les communes sous PID, c'est théorique que les comportements communautaires pourraient expliquer le nombre élevé et continu de cas de paludisme malgré la protection qu'offre la PID et des taux d'utilisation élevés des MIILDs rapportés. Pour identifier les pratiques domestiques susceptibles d'avoir un impact sur les stratégies de lutte antivectorielle, une étude parallèle a réalisé une surveillance socio-comportementale nocturne pendant les saisons froide, sèche et pluvieuse dans les deux régions protégées par la PID au Bénin (Alibori, Donga) (N'tcha, 2019). Cette enquête a montré que pendant la saison froide, 25,1% des membres du ménage dormaient à l'extérieur sans MIILDs, 23,8% pendant la saison des pluies et 41,1% pendant la période chaude. Plus de 90% des membres du ménage inclus dans l'étude n'étaient pas protégés contre les piqûres de moustiques entre 19 heures et 22 heures au cours des trois saisons, car la plupart effectuaient des activités à l'extérieur sans la protection de la PID, probablement en raison du défaut d'éclairage (lumière) et de l'espace limité dans leur ménage. Pendant la saison chaude, la majorité des membres du ménage n'était pas du tout protégée contre les piqûres de moustiques après 22 heures parce qu'ils dormaient à l'extérieur sans protection de la PID ou dormaient à l'intérieur sans MIILDs. On a également noté que les ménages avaient de grandes quantités d'effets personnels et de vêtements suspendus ou non aux murs qui servaient d'endroits où les moustiques pouvaient se reposer en évitant les murs traités. Les figures 18,19 et 20 soulignent la nécessité d'accompagner les campagnes de PID par des campagnes d'information, d'éducation et de communication afin de faire comprendre aux populations l'importance de dormir à l'intérieur des habitations pulvérisées.



Figure 18 : Membres de ménage dormant à l'intérieur (a) et à l'extérieur (b) des habitations sans protection MIILDs pendant la période chaude (Kandi, mai 2019).



Figure 19 : Membres de ménage dormant à l'extérieur (c) des habitations avec protection MIILDs pendant la période chaude (Kandi, mai 2019).



Figure 20 : Vêtements suspendus où les moustiques se reposent en évitant les murs traités.

✚ Dormir sous MIILDs dans les zones PID comme outils complémentaire de lutte contre le paludisme

Au cours des 02 ans de suivi de la PID dans l'Alibori et de la Donga, la majorité des moustiques retrouvés au repos dans les maisons traitées présentaient des abdomens gorgés de sang humain. En effet, lorsqu'un moustique réussit à pénétrer une maison traitée, il va directement sur son hôte et prend son repas de sang. Après le repas, le moustique cherche à se reposer sur les murs ou sur les effets ou les vêtements suspendus aux murs, ou à s'échapper lorsque la maison traitée est invivable. Cette situation confirme les travaux de Agossa *et al.* (2014) en cases expérimentales à Malanville et de Djènantin *et al.* (2010b) en communauté qui ont montré des moustiques gorgés collectés après aspersion matinale de bombe aérosol et dans les pièges fenêtre des maisons traitées. Compte tenu du

taux de gorgement des moustiques relativement élevé dans les communes sous PID, nous suggérons que les PNLPs éduquent les communautés protégées par la PID, en particulier les enfants et les femmes enceintes, à dormir sous des MIILDs.

4.7. Les limites de l'étude

Une limite de ce travail est que l'impact de la PID a été mesuré sur une durée de 4 à 5 mois. Une phase de suivi d'un an serait davantage pertinente pour mieux apprécier l'efficacité de cette stratégie dans les deux zones où la transmission du *Plasmodium spp.* est pérenne.

4.8. Stratégies complémentaires potentielles pour une lutte antivectorielle plus efficace dans l'avenir

Dans ce travail, nous avons mentionné que les stratégies renforcées de MIILDs, d'IEC et d'utilisation des répulsifs seraient des stratégies complémentaires à la PID capables d'éliminer la transmission résiduelle dans les zones PID au nord du Bénin. Toutefois, d'autres outils seront nécessaires pour maintenir l'efficacité de la lutte antivectorielle dans l'avenir et éliminer le paludisme en Afrique subsaharienne. A l'heure actuelle, de nombreux outils de lutte prometteurs existent et ont fait l'objet de nombreuses revues (Barreaux *et al.*, 2017; Simard, 2018). Ces outils qui sont à différents stades de leur développement, présentent pour la plupart l'originalité de cibler un comportement du vecteur/un stade du moustique jusque-là pas ou très peu exploités. Ils utilisent aussi des technologies avancées pour venir à bout des vecteurs. Il nous a semblé nécessaire de mentionner quelques-uns de ces outils, la liste n'étant pas exhaustive.

Outre la PID et les MIILDs, d'autres stratégies complémentaires dirigées contre les vecteurs endophages et endophiles pourraient contribuer à réduire la transmission des *Plasmodium spp.* en Afrique subsaharienne. Parmi ces stratégies, on peut citer celle qui consiste à améliorer les habitations pour réduire l'entrée des vecteurs par des barrières physiques comme la fermeture des avant-toits, des grillages sur les fenêtres et les portes, etc. (Yé *et al.*, 2006; Atieli *et al.*, 2009; Animut *et al.*, 2013; Bradley *et al.*, 2013; Ondiba *et al.*, 2018). L'ajout d'insecticide a aussi été développé pour produire un effet létal de la barrière physique. Cet ajout pourrait alors permettre de réduire considérablement la densité et la longévité des vecteurs ainsi que la transmission des *Plasmodium spp.* en communauté si la couverture est élevée (Sternberg *et al.*, 2016; Killeen *et al.*, 2017). L'une de ces stratégies à base d'insecticide nommée « tubes d'avant-toit » (en anglais « eave tubes ») consiste non seulement à fermer les avant-toits des maisons (un point d'entrée privilégié des *An. gambiae s.l.* en Afrique (Njie *et al.*, 2009) mais aussi à placer des inserts traités d'insecticide à certains endroits des avant-toits (Sternberg *et al.*, 2016).

Une autre méthode consiste à éliminer les mâles et les femelles de vecteurs à l'aide des pièges à appât sucré (en anglais « Attractive Toxic Sugar Baits »). Ce sont des pièges qui contiennent du sucre (alimentation des moustiques mâles et femelles) et des substances toxiques qui sont sélectives et qui ont des effets minimes sur les espèces non ciblées et sur l'environnement (Müller *et al.*, 2010; Beier *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2013). De nombreuses études menées à petite échelle ont montré que l'utilisation des pièges à appâts sucrés avait un impact significatif sur la densité et la longévité des vecteurs (Müller *et al.*, 2010; Beier *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2013). L'évaluation à grande échelle de cette stratégie en combinaison avec les outils actuels de lutte (PID et les MIILDs) est nécessaire pour mesurer son impact additionnel sur la transmission et la survenue du paludisme.

Enfin, les progrès majeurs de la génétique ont aussi laissé entrevoir plusieurs possibilités pour lutter efficacement contre les anophèles vecteurs. Parmi celles-ci, la stérilisation par irradiation, la Technique de l'Insecte Incompatible par l'utilisation de *Wolbachia* et, le forçage génétique ou « gene drive » sont en développement. La stérilisation par irradiation se base sur un principe simple qui est le suivant : l'accouplement d'une femelle de moustique avec un mâle stérile entraîne l'absence de descendance viable. Cette technique n'a pas encore été évaluée à l'échelle opérationnelle contre les anophèles vecteurs mais de bons progrès ont été réalisés ces dernières années au laboratoire pour l'améliorer et produire en masse des mâles stériles (Benelli, 2015). En ce qui concerne la Technique de l'Insecte Incompatible (TII) par l'utilisation des *Wolbachia*, elle fonctionne selon le principe suivant : l'accouplement des mâles infectés par une certaine souche de *Wolbachia* (souche différente de celle présente dans la population locale) avec une femelle sauvage entraîne des pontes non viables. Jusqu'à présent, cette technique n'a été évaluée qu'au laboratoire contre les anophèles (Joshi *et al.*, 2014). Enfin, le forçage génétique est une technique très récente qui permet d'augmenter la transmission d'un élément génétique sans suivre les lois naturelles de Mendel. Cette technique peut être utilisée pour supprimer la population de vecteurs ou la modifier afin de réduire la compétence vectorielle des moustiques (Hammond *et al.*, 2016). Dans le premier cas, le transgène introduit dans la population vectrice vise à changer la transmission des chromosomes sexuels pour avoir une descendance majoritairement mâle ou à inhiber les gènes de fertilité des femelles pour les rendre stériles. Dans le deuxième cas (réduction de la compétence vectorielle des moustiques), les gènes spécifiques codant pour les protéines de liaison du parasite chez le moustique peuvent être modifiés de sorte que les parasites ne se fixent plus sur les récepteurs spécifiques. Ainsi les femelles portant le transgène sont incapables de porter le parasite et donc ne peuvent le transmettre. Ces possibilités qu'offre cette nouvelle technologie de « forçage génétique » ont été évaluées au laboratoire et ont donné des résultats très encourageants (Hammond *et al.*, 2017; Kyrou *et al.*, 2018). Toutefois, des

recherches supplémentaires sont encore nécessaires avant qu'elle ne soit évaluée à l'échelle opérationnelle et utilisée dans les programmes de lutte contre le paludisme (Simard, 2018).

5. Conclusions générales et perspectives

L'un des objectifs de développement durable (ODD) est d'enrayer le paludisme à l'horizon 2030. Pour concrétiser cette vision d'un monde sans paludisme, l'Organisation Mondiale de la Santé et le Partenariat Roll Back Malaria ont fixé trois objectifs dans la stratégie technique mondiale 2016-2030 de lutte contre le paludisme que sont : (i) réduire d'au moins 90 % les taux de mortalité et d'incidence du paludisme à l'échelle planétaire par rapport à 2015 ; (ii) éliminer le paludisme dans 35 pays de plus qu'en 2015 et (iii) empêcher la réapparition de cette maladie dans tous les pays qui en sont exempts. A cet effet, il a été suggéré la poursuite de l'engagement des nations et un financement adéquat d'environ 100 milliards de dollars. A l'heure actuelle, nombre de pays africains s'investissent avec l'appui des partenaires financiers (PMI, UNITAID, Fonds Mondial, Fondation Bill et Melinda Gates, l'Agence Américaine pour le Développement International etc.) dans la lutte contre le paludisme à travers la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide et des pulvérisations intradomiciliaires pour protéger leurs populations contre cette maladie. Mais de nombreux défis restent à relever pour l'atteinte de ces objectifs. En effet, l'efficacité des stratégies de lutte antivectorielle, se heurte dans une certaine mesure à la transmission résiduelle (Govella & Ferguson, 2012) qu'il faut d'abord surmonter. Il est donc impératif de rechercher des stratégies alternatives permettant de maintenir et d'améliorer l'efficacité des outils actuels et de gérer la résistance des vecteurs aux insecticides.

Cette thèse s'est articulée sur l'impact entomologique de la PID dans un contexte de résistance des vecteurs aux insecticides. Cette stratégie de lutte a démontré son efficacité sur les indicateurs entomologiques de transmission du paludisme dans les deux départements cibles du nord Bénin. Une réduction significative du TIE (environ 90%) a été observée chaque année pendant la période de rémanence de Actellic 300 CS.

Cependant, il semble ne pas avoir une corrélation entre la baisse des indicateurs entomologiques et épidémiologiques dans les zones PID. En effet, selon les données collectées dans les registres des formations sanitaires, il n'y a pas de réduction du nombre de cas de paludisme dans les communes traitées. C'est pourquoi, le PNLP a décidé d'initier dès l'année prochaine (2020), une étude de recherche sur les données épidémiologiques de l'incidence et de la prévalence de *P. falciparum* dans les zones sous intervention en collaboration avec l'unité de recherche parasitologique du CREC et la faculté des sciences de la santé de l'université d'Abomey-Calavi, au Bénin.

De plus, le comportement des populations bénéficiaires de la PID limite souvent son efficacité. En effet, de récentes études montrent que plus de 90% des populations des départements de l'Alibori et de la Donga ne sont pas entièrement protégées de 19 h à 22 h, cela est dû au fait qu'ils restent à l'extérieur des habitations pour diverses activités. De même, la plupart des gens ne sont pas entièrement protégés contre les piqûres de moustiques après 22 heures parce qu'ils dorment à l'extérieur sans protection PID ou à l'intérieur des maisons traitées sans MIILDs. De plus, de grandes quantités d'objets accrochés aux murs permettent aux moustiques de se reposer en évitant les murs traités.

Toutefois, en dehors de la PID, d'autres interventions étaient également mises en œuvre de façon simultanée dans ces zones où le paludisme est persistant. Il s'agit de : la prise en charge des cas de paludisme après l'utilisation des tests de diagnostic rapide (TDR) ou de la microscopie, l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) et, des traitements préventifs intermittents chez les femmes enceintes.

A la lumière des résultats obtenus, le besoin de déployer des stratégies complémentaires à la PID et à la distribution gratuite des MIILDs s'impose et est urgent au nord du Bénin en particulier. Le déploiement de la stratégie renforcée d'information, d'éducation et de communication (IEC) ou d'utilisation des répulsifs ou des barrières physiques en combinaison avec la PID et les MIILDs réduirait la transmission résiduelle dans les zones PID au nord du Bénin où les vecteurs sont résistants aux pyréthrinoïdes. Toutefois, il conviendrait d'évaluer l'efficacité et le rapport coût/efficacité de telles combinaisons avant leur déploiement. A l'heure actuelle, des outils de lutte antivectorielle innovants sont aussi en développement et nécessitent des évaluations d'abord à petite échelle puis à grande échelle avant d'intégrer l'arsenal de lutte contre le paludisme. De telles évaluations qui impliquent à leurs phases finales des recherches opérationnelles doivent être soutenues par les partenaires financiers afin d'envisager un niveau de transmission du paludisme proche de zéro au nord du Bénin et plus généralement en Afrique sub-saharienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (HORS ARTICLES)

1. Agossa FR, Aïkpon R, Azondékon R, Govoetchan R, Padonnou GG, Oussou O, Oké-Agbo F, Akogbéto MC. Efficacy of various insecticides recommended for indoor residual spraying: pirimiphos methyl, potential alternative to bendiocarb for pyrethroid resistance management in Benin, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014; 108:84–91.
2. Agossa FR, Padonou GG, Koukpo CZ, Zola-Sahossi J, Azondekon R, Akuoko OK, Ahoga J, N'dombidje B, Akinro B, Fassinou AJYH, Sezonlin M, Akogbeto MC. Efficacy of a novel mode of action of an indoor residual spraying product, SumiShield® 50WG against susceptible and resistant populations of *Anopheles gambiae* (s.l.) in Benin, West Africa. *Parasit Vectors.* 2018a;11(1):293.
3. Agossa FR, Padonou GG, Fassinou AJYH, Odjo EM, Akuoko OK, Salako A, Koukpo ZC, Nwangwu UC, Akinro B, Sezonlin M, Akogbeto MC. Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora® Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin, West Africa. *Malar J.* 2018b; 17:484.
4. Aïkpon R., Agossa F., Ossè R., Oussou O., Aïzoun N., Oké-Agbo F., Akogbéto M. Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control. *Parasit Vectors.* 2013a; 6:192.
5. Aïkpon R, Osse R, Govoetchan R, Sovi A, Oke-Agbo F, Akogbeto M C: Entomological baseline data on malaria transmission and susceptibility of *Anopheles gambiae* to insecticides in preparation for Indoor Residual Spraying (IRS) in Atacora, (Benin). *J. Parasitol. Vector Biol* 2013b; 5(7): 102-111.
6. Aïkpon R, Sèzonlin M, Tokponon F, Okè M, Oussou O, Oké-Agbo F, Beach R, Akogbéto M. Good performances but short lasting efficacy of Actellic 50 EC indoor residual spraying (IRS) on malaria transmission in Benin, West Africa. *Parasites Vectors.* 2014;7:256.
7. Aïzoun N, Aïkpon R, Gnanguenon V, Oussou O, Agossa F, Padonou GG, Akogbéto M. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato from the south and north Benin, West Africa. *Parasit Vectors.* 2013a; 6:274.

8. Aïzoun N, Aïkpon R, Padonou GG, Oussou O, Oké-Agbo F, Gnanguenon V, Ossè R, Akogbéto M. Mixed-function oxidases and esterases associated with permethrin, deltamethrin and bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in the south-north transect Benin, West Africa. *Parasit Vectors*. 2013b; 6:223.
9. Akogbeto M. Study of the epidemiological aspects of coastal lagoon malaria in Benin. Doctoral thesis. University of Paris XI. 1992.
10. Akogbeto M, Di Deco M. Distribution of members of the *Anopheles gambiae* complex and their chromosomal variants in Benin and Togo, West Africa. *Afr Zool* 1995; 109:443–454.
11. Akogbeto M, Yakoubou S. Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. *Bull Soc Pathol Exot*. 1999; 92: 123 –130.
12. Akogbeto MC, Djouaka RF, Kinde-Gazard DA. Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malar J*. 2006; 5: 22.
13. Akogbéto M, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton A. Bendiocarb: a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa in *Malar J*. 2010; 9: 204- 210.
14. Akogbéto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85:586–93.
15. Akogbeto MC, Aikpon R, Azondekon R, Padonou G, Osse R, Agossa FR, Raymond Beach, Michel Sèzonlin. Six years of experience in entomological surveillance of indoor residual spraying against malaria transmission in Benin: lessons learned challenges and outlooks. *Malar J*. 2015; 14:242.
16. Animut A, Balkew M, Lindtjørn B. Impact of housing condition on indoor-biting and indoor-resting *Anopheles arabiensis* density in a highland area, central Ethiopia. *Malar J*. 2013;12(1):393.
17. Anthony NM, Benner EA, Rauh JJ, Sattelle DB. GABA receptors of insects susceptible and resistant to cyclodiene insecticides. *Pesticide Science*. 1991; 33: 223–230.

18. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium Knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012; 4(1): e2012013.
19. Antonio-Nkondjio C, Simard F, Cohuet A, Fontenille D. Morphological variability in the malaria vector, *Anopheles moucheti*, is not indicative of speciation: evidences from sympatric south Cameroon populations. *Infect Genet Evol*. 2002; 2: 69-72.
20. Antonio-Nkondjio C, Ment C, Kera H, Dé F, Simard R, Awono-Ambene P, Chouaibou M, Tchuinkam T, Fontenille D. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: Contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J Med Entomol*. 2006; 43(6):1215–21.
21. Apperson CS, Georgiou GP. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *J econ entomol*. 1975; 68: 153–157.
22. Arama C, Troye-Blomberg M. The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *J Intern Med*. 2014; 275: 456–466.
23. 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 combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J*. 2005; 4:25.
24. Assogba BS, Djogbénou LS, Milesi P, Berthomieu A, Perez J, Ayala D, Chandre F, Makoutodé M, Labbé P, Weill M. An *ace-1* gene duplication resorbs the fitness cost associated with resistance in *Anopheles gambiae*, the main malaria mosquito. *Sci Rep*. 2015; 5(1):14529.
25. Atieli H, Menya D, Githeko A, Scott T. House design modifications reduce indoor resting malaria vector densities in rice irrigation scheme area in western Kenya. *Malar J*. 2009;8(1):108.
26. Awolola TS, Oyewole IO, Amajoh CN, Idowu ET, Ajayi MB, Oduola A, OU Manafa, K Ibrahim, LL Koekemoer, M Coetzee. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Trop*. 2005;95:204–5.

27. Awolola TS, Oduola OA, Strode C, Koekemoer LL, Brooke B, Ranson H. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103: 1139–1145.
28. Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, Mijailovsky SJ, Chalepakis G, Anthousi A, Lynd A, Antoine S, Hemingway J, Ranson H, Lycett GJ, Vontas J. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 2016; 113(33):9268–73.
29. Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Robert Shaw W, Dabiré RK, Diabate A, Levashina EA, Catteruccia F. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nat Commun.* 2014; 5(1):3985.
30. Barreaux P, Barreaux AMG, Sternberg ED, Suh E, Waite JL, Whitehead SA, Thomas MB. Priorities for broadening the malaria vector control tool kit. *Trends Parasitol.* 2017;33(10):763–74.
31. Bass C, Schroeder I, Turberg A, Field LM, Williamson MS. Identification of the *Rdl* mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Manag Sci.* 2004; 60: 1157–1162.
32. Bass C, Nikou D, Blagborough AM, Vontas J, Sinden RE, Williamson MS, Field LM. PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar J.* 2008; 7(1): 177.
33. Bay EC. Mosquito control by fish: A present-day appraisal. *WHO Chron.* 1967 :415–423.
- Beier MS, Schwartz IK, Beier JC, Perkins PV, Onyango F, Koros JK, Campbell GH, Andrysiak PM, Brandling-Bennett AD. Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected *Anopheles* from western kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 39(4): 323-327.
34. Beier JC, Oster CN, Onyango FK, Bales JD, Sherwood JA, Perkins PV, Chumo DK, Koech DV, Whitmire RE, Roberts CR, Diggs CL, Hoffman SL. *Plasmodium falciparum* incidence relative to entomological inoculation rates at a site proposed for testing malaria vaccines in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;49:529–36.

35. Beier JC, Killeen GF, Githure JI. Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(1):109-13.
36. Beier JC, Müller GC, Gu W, Arheart KL, Schlein Y. Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles* malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. *Malar J.* 2012;11(1):31.
37. Benelli G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol Res.* 2015;114(8):2801–5.
38. Benoit-Vical F, Paloque L, Augereau JM. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies (ACTs): Fears of widespread drug resistance. *Bull Acad Natle Méd.* 2016; 200 (3):477-490.
39. Berge JB, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998;353:1701–5.
40. Besancenot J-P, Ndione J-A, Handschumacher P, Ibrahima M, Laaidi K. Climate, water and health in the West African Sahel, Science and global change / Drought. *Synthesis.* 2004; 15 (3): 233-241.
41. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle KE, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA, Briët O, Penny MA, Smith TA, Bennett A, Yukich J, Eisele TP, Griffin JT, Fergus CA, Lynch M, Lindgren F, Cohen JM, Murray CLJ, Smith DL, Hay SI, Cibulskis RE, Gething PW. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature.* 2015; 526(7572):207–11.
42. Billingsley PF, Baird J, Mitchell JA, Drakeley C. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol.* 2006; 28(4): 143-53.
43. Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5): 1-12.

44. Bradley DJ. Morbidity and mortality at Pare-Taveta, Kenya and Tanzania, 1954-1966: the effects of a period of malaria control. In: Feachem, R.G. & Jamison, D.T. (eds.): Disease and mortality in sub-Saharan Africa. Oxford: Oxford University Press. 1991. p. 248-263.
45. Bradley J, Rehman AM, Schwabe C, Vargas D, Monti F, Ela C, Riloha M, Kleinschmidt I. Reduced prevalence of malaria infection in children living in houses with window screening or closed eaves on Bioko Island, Equatorial Guinea. PLoS One. 2013;8(11):e80626.
46. Brogdon WG, McAllister JC, Corwin AM, Cordon-Rosales C. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). J Econ Entomol. 1999; 92(2):298–302.
47. Brooks MKK, Benthem V, Koen J, Magnusson A, Casper W, Nielsen A, Skaug H, Mächler M, Bolker B. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. R J. 2017;9(2):378–400.
48. Bruce-Chwatt LJ. Lessons learned from applied field research activities in Africa during the malaria eradication era. Bull World Health Organ. 1984;62 (Suppl):19-29.
49. Brutus L, Le Goff G, Rasolomaina LG, Rajaonarivelo V, Raveloson A, Cot M. Lutte contre le paludisme dans le moyen-ouest de Madagascar : Comparaison de l'efficacité de la lambda-cyhalothrine et du DDT en aspersions intradomiciliaires. I. Etude entomologique. Parasite. 2001;8:309–16.
50. Caldas de Castro M, Yamagata Y, Mtasiwa D, Tanner M, Utzinger J, Keiser J, Singer BH. Integrated urban malaria control: a case study in Dar es Salaam, Tanzania. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71(2):103–17.
51. Campo JJ, Sacarlal J, Aponte JJ, Aide P, Nhabomba AJ, Dobaño C, Alonso PL. Duration of vaccine efficacy against malaria: 5th year of follow-up in children vaccinated with RTS,S/AS02 in Mozambique. Vaccine. 2014; 32: 2209–2216.
52. Cardé RT, Resh VH. Encyclopedia of insects. Academic Press; 2003.

53. Carnevale P, Robert V, Molez JF, Baudon D. Faciès épidémiologique des paludismes en Afrique subsaharienne. *Études médicales*. 1984;3:123–33.
54. Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L, Gazin P, Richard A, Mouchet J. Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1988;81(5):832–46.
55. Carnevale P, Robert V, Snow R, Curtis C, Richard A, Boudin C, Pazart LH, Haina JM, Mouchet J. The impact of impregnated mosquito nets on prevalence and morbidity related to malaria in sub-Saharan Africa. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1991; 71 (suppl 1): 127–150.
56. Carnevale P, Robert V, Manguin S, Corbel V, Fontenille D, Garros C, Rogier C, Roux J. Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. *Medical Med Vet Entomol*. 2009; 20: 29–36.
57. Carrasco D, Lefèvre T, Moiroux N, Penetier C, Chandre F, Cohuet A. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. *Curr Opin Insect Sci*. 2019; 5745(18).
58. Carter R, Mendis KN, Roberts D. Spatial targeting of interventions against malaria. *Bull World Health Organ*. 2000; 78:1401–11.
59. Chabasse D. Parasitologie mycologie, Saint-Maur, ANOFEL, 7^{ème} edition. 2002. p.107.
Chandre F. Résistance d'*Anopheles gambiae* Giles et de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say aux insecticides en Afrique de l'Ouest et implications opérationnelles. Montpellier : ORSTOM, 242 p. multigr. Th. : Interactions Hôtes-Parasites, Entomol. Médicale, Université de Paris 12 : Créteil ; 1998.
60. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. Situation de la résistance aux pyrèthrinoïdes chez *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ*. 1999; 77: 230-234.
61. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol*. 2000; 14, 81–88.

62. Charlwood JD, Pinto J, Sousa CA, Madsen H, Ferreira C. The swarming and mating behaviour of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from São Tomé Island. J Vector Ecol. 2002; 27(2): 178-183.
63. Charlwood JD, Pinto J, Sousa CA, Ferreira C, Petrarca V, Rosario Vdo E. (2003). « A mate or a meal » – Pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. Malar J. 2003; 2:9.
64. Chavasse DC, Yap HH. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance; 1997.
65. Choi KS, Coetzee M, Koekemoer LL. Simultaneous identification of the *Anopheles funestus* group and *Anopheles longipalpis* type C by PCR-RFLP. Malar J. 2010; 9:316.
66. Clements AN. Biology of mosquitoes: development nutrition and reproduction. Springer Netherlands. 1992. p.509.
67. Clements AN. The biology of mosquitoes: sensory reception and behaviour. London: Chapman & Hall.1999. p.752.
68. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. Science (New York, N.Y.). 2011a; 332(6031): 855-858.
69. Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. Cell host & microbe. 2011b; 10(4): 307-310.
70. Coetzee M, Craig M, Le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. Parasitol Today. 2000; 16: 74 -77.
71. Coetzee M, Fontenille D. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. Insect Biochem. Mol. Biol. 2004; 34(7): 599-605.
72. Coetzee M, Hunt H, Wilkerson R, Della Tore A, Coulibali MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. Zootaxa. 2013; 3619:246–74.

73. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? Trends Parasitol. 2010; 26: 130–136.
74. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. Clin Microbiol Rev. 2007; 20:579–92.
75. Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979; 73(5):483–97.
76. Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradations and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. Boll Zool. 1985; 52:45–63.
77. Coosemans M, Carnevale P. Malaria vector control: a critical review of chemical methods and insecticides. Ann Soc Belg Med Trop. 1995; 75(1):13-31.
78. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbéto M, Lardeux F, Hougard JM, Guillet P. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. Malar J. 2004; 3: 22.
79. Corbel V, N'guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard JM, Rowland M. Multiple insecticide mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. Acta Tropica. 2007; 101: 207-216.
80. Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, Moiroux N, Chabi J, Banganna B, Padonou GG, Henry M-C. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. Lancet Infect Dis. 2012;12:617–26.
81. Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. Parassitologia. 1999;41(4):595–611.
81. Cox J, Craig MH, Le Sueur D, Sharp BL: Mapping malaria risk in the highlands of Africa MARA/HIMAL Technical Report: London/Durban; 1999.

82. Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, Wong KT, Adem P, Zaki SR, Singh B, Krishna S. Severe malaria - A case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: A case report. *Malar J.* 2010; 9(1):10.
83. Dabire KR, Diabate A, Namountougou M, Toe KH, Ouari A, Kengne P, Bass C, Baldet T. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:1113–20.
84. Dambach P, Louis VR, Kaiser A, Ouedraogo S, Sié A, Sauerborn R, Becker N. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 371.
85. Darriet F, Robert V, Tho Vien N, Carnevale P. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. Bobo-Dioulasso: OCCGE; 1984 .p.35.
86. 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.* 1998; 58: 349-354.
87. 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 :131-134.
88. Davidson G. The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. *Riv Malariol.* 1964; 43:167–83.
89. Dennison NJ, Saraiva RG, Cirimotich CM, Mlambo G, Mongodin EF, Dimopoulos G. Functional genomics analyses of *Enterobacter*, *Anopheles* and *Plasmodium* reciprocal interactions that impact vector competence. *Malar J.* 2016; 15(425): 1-15.

90. Detinova TS, Gillies MT. Observations on the determination of the Age composition and epidemiological importance of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. Bull World Health Organ. 1964;30:23–8.
91. Dia I, Lochouart L, Boccolini D, Costantini C, Fontenille D. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. Parasite. 2000; 7(3):179–84.
92. Diabaté A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, Baldet T, Simard F, Gimnig JE, Hawley WA, Lehmann T. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. J Med Entomol. 2005;42(4):548–53.
93. Diabate A, Dabiré RK, Kengne P, Brengues C, Baldet T, Ouari A, Simard F, Lehmann T. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric areas from Burkina Faso. Popul Com Ecol. 2006; 43(3): 480-483.
94. Diabate A, Dabire RK, Heidenberger K, Crawford J, Lamp WO, Culler LE, Lehmann T. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: Role of predation. BMC Evol Biol. 2008; 8:5.
95. Dicko A, Roh ME, Diawara H, Mahamar A, Soumare HM, Lanke K, Bradley J, Sanogo K, Kone DT, Diarra K, Keita S, Issiaka D, Traore SF, McCulloch C, Stone WJR, Hwang J, Müller O, Brown JM, Srinivasan V, Drakeley C, Gosling R, Chen I, Bousema T. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of *Plasmodium falciparum* transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. Lancet Infect Dis. 2018; 18(6): 627-639.
96. Djègbé I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranso H, Chandre F, Akogbéto M, Corbel V. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. Malar J. 2011;10:261.
97. Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Pernetier 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.

98. 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*. 2010a;3:83.
99. Djènontin A, Chandre F, Dabiré KR, Chabi J, N'guessan R, Baldet T, Akogbéto M, Corbel V. Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long-lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid resistant malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2010b;83:266–70.
100. Djogbenou L, Chandre F, Berthomieu A, Dabire R, Koffi A. Evidence of introgression of the *ace-1 R* mutation and of the *ace-1* duplication in West African *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS One*. 2008;3(5):1–7.
101. Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbéto M. Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Tropica*. 2010a; 114: 116-122.
102. Djogbenou L, Noel V, Agnew P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar J*. 2010b; 9: 12.
103. Djogbenou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol*. 2011; 25:256–67.
104. Djouaka R, Bakare A, Bankole H, Doannio J, Coulibaly O, Kossou H, Tamo M, Basene H, Popoola OK, Akogbeto M. Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance? *Malar J*. 2007; 6: 159.
105. Djouaka R, Bakare A, Coulibaly O, Akogbeto M, 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.

106. Djouaka R, Irving H, Tukur Z, Wondji CS. Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. PLoS One. 2011;6:e27760.
107. Douce S. Des moustiques OGM contre le paludisme : le projet qui fait débat au Burkina. Le Monde.fr; 2018.
108. Duchemin JB, Tsy JM, Rabarison P, Roux J, Coluzzi M, Costantini C. Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. Med Vet Entomol. 2001; 15(1):50-57.
109. Dye C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. Annu Rev Entomol. 1992; 37: 1–19.
109. Edi CV, Djogbénou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MAT, Poupardin R, Jones CM, Essandoh J, Kétoh GK, Paine MJI, Koudou BG, Donnelly MJ, Ranson H, Weetman D. CYP6 P450 enzymes and *Ace-1* duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. PLoS Genet. 2014; 10(3):e1004236.
110. Elamathi N, Verma V, Sharma P, Uragayala S, Kamaraju R. Neonicotinoids in vector control: In silico approach. Asian J Biomed Pharm Sci. 2014; 4(39):25–9.
111. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi 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; 40:491–7.
112. Favia G, della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti A, Sagnon NF, Toure YT, Coluzzi M. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. Insect Mol Biol. 1997; 6: 377-383.
113. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol. 2001;10(1):19–23.

114. Fegan GW, Noor AM, Akhwale WS, Cousens S, Snow RW. Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study. *Lancet*. 2007;370(9592):1035-9.
115. French-Constant RH, Rocheleau TA. Drosophila-Aminobutyric Acid Receptor Gene *Rdl* Shows Extensive Alternative Splicing. *J Neurochem*. 1993; 60: 2323–2326.
116. Fillinger U, Knols BGJ, Becker N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop Med Int Health*. 2003; 8(1):37-47.
117. Fontenille D, Campbell GH. Is *Anopheles mascarensis* a new malaria vector in Madagascar? *Am J Trop Med Hyg*. 1992 ; 46 : 28-30.
118. Fontenille D, Cohuet A, Ambene PHA, Nkondjio CA, Wondji C, Kengne P, Dia I, Boccolini D, Duchemin JB, Rajaonarivelo V, Dabire R, Akre MA, Ceainu C, Le Goff G, Simard F. Systematics and biology of anopheline vectors of plasmodium in Africa, recent data. *Med Trop*. 2003; 63: 247-253.
119. 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.
120. Fontenille D, Cohuet A, Awono-Ambene P, Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, Simard F. Vecteurs de paludisme: du terrain à la génétique moléculaire Recherches en Afrique. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2005;53: 283–290.
121. Fontenille D. Écosystèmes, entomologie et lutte antivectorielle. Responsabilité & environnement. 2008 ; 51 : 55-60.
122. Fontenille D, Lagneau C, Lecollinet S, Lefait Robin R, Setbon M, Tirel B, Yébakima A. Quelle est la contribution de l'évaluation des risques vectoriels à l'évaluation du risque épidémique? Dans *La lutte antivectorielle en France*. Marseille: IRD Éditions. 2013. p. 501-564.

123. Fornadel CM, Norris LC, Glass GE, Norris DE. Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern Zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):848–53.
124. Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect.* 1990;87:245–54.
125. Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, James AA. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112(49): E6736-E6743.
126. Garrett-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ.* 1964; 30(2): 241-261.
127. Garros C, Koekemoer LL, Kamau L, Awolola TS, Van Bortel W, Coetzee M, Coosemans M, Manguin S. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70 (3):260–5.
128. Gemperli A, Sogba N, Fondjo E, Mabaso M, Bagayoko M, Olivier JTB, Aderegg D, Liebe J, Smith T, Vounatsou P. Mapping malaria transmission in west and central Africa. *Trop. Med. Int. Health.* 2006; 11: 1032 -1046.
129. Georgiou GP. The evolution of resistance to pesticides. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 1972; 3: 133–168.
130. Gilles HM. The malaria parasites. In: Gilles HM, Warrell DA, editors. *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. 3rd Edition. London: Edward Arnold; 1993. pp. 12–34.
131. Gillies M, de Meillon D. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. *Publ South African Inst Med Res Johannesburg.* 1968;54:343.
132. Gillies M, Coetzee M. A Supplement to the *Anophelinae* of the South of the Sahara (Afrotropical Region). *Publ South African Inst Med Res.* 1987;55:143.

133. Gimnig JE, Otieno P, Were V, Marwanga D, Abong'o D, Wiegand R, Williamson J, Wolkon A, Zhou Y, Bayoh MN, Lobo NF, Laserson K, Kariuki S, Hamel MJ. The effect of indoor residual spraying on the prevalence of malaria parasite infection, clinical malaria and anemia in an area of perennial transmission and moderate coverage of insecticide treated nets in Western Kenya. PLoS ONE. 2016;11:0145282.
134. Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabiré RK, Simard F. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. Med Vet Entomol. 2012; 26 (1):9–17.
135. Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Osse R, Oke-Agbo F, Azondekon R, Sovi A, Attolou R, Badirou K, Tokponnon FT, Padonou GG, Akogbeto MC. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. Malar J 2014; 13:444.
136. Gnanguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, Azondekon R, AgbanrinYoussof R, Attolou R, Tokponnon FT, Aïkpon R, Ossè R, Akogbeto MC. Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved. Parasit Vectors. 2015;8:223.
137. Gomes FM, Hixson BL, Tyner MDW, Ramirez JL, Canepa GE, Alves e Silva TL, Molina-Cruz A, Keita M, Kane F, Traoré B, Sogoba N, Barillas-Mury C. Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. Proc Natl Acad Sci. 2017; 114(47): 12566-12571.
138. Govella NJ, Ferguson H. Why Use of Interventions Targeting Outdoor Biting Mosquitoes Will Be Necessary to Achieve Malaria Elimination. Front Physiol. 2012;3:199.
139. Govoetchan R, Gnanguenon V, Azondékon R, Agossa RF, Sovi A, Oké- Agbo F, Ossè R, Akogbéto M. Evidence for perennial malaria in rural and urban areas under the Sudanian climate of Kandi, Northeastern Benin. Parasit Vectors. 2014;7:79.
140. Gratz NG. Emerging and resurging vector-borne diseases. Annu Rev Entomol. 1999. 44:51 75.

- 141.** Guillet P, Alnwick D, Cham MK, Neira M, Zaim M, Heymann D, Mukelabai K. Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. *Bull World Health Organ.* 2001; 79(10):998.
- 142.** Hamon J. Contribution to the study of Culicidae in the Porto- Novo region (Bas-Dahomey). *Ann parasitol* 1954; 29:588–594.
- 143.** Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol.* 2016; 34(1): 78-83.
- 144.** Hammond AM, Kyrou K, Bruttini M, North A, Galizi R, Karlsson X, Kranjc N, Carpi FM, D’Aurizio R, Crisanti A, Nolan T. The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito. *PLoS Genet.* 2017;13(10):e1007039.
- 145.** Harbach RE. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. In: *Anopheles* mosquitoes -New insights into malaria vectors (ed. Manguin, S.). InTech, Rijeka, Croatia ;2013.p.54.
- 146.** Hardstone MC, Leichter CA, Scott JG. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monoxygenase detoxification, in mosquitoes. *J Evol Biol.* 2009; 22: 416–423.
- 147.** Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34:653–65.
- 148.** Henry M, Rogier C, Nzeyimana I, Assi SB, Audibert M, Mathonnat J, Keundjian A. Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the savannah of Côte d’Ivoire. *Trop Med Int Heal.* 2003;8(5):449–58.
- 149.** Hosie A, Sattelle D, Aronstein K, Ffrench-Constant RH. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 578–583.

150. Hougard JM, Mbentengam R, Lochouarn L, Escaffre H, Darriet F, Barbazan P, Quillévéré D. Control of *Culex quinquefasciatus* by *Bacillus sphaericus*: Results of a pilot campaign in a large urban agglomeration of Equatorial Africa. Bull World Health Org. 1993; 71:367–375.
151. Howard AF, Zhou G, Omlin FX. Malaria mosquito control using edible fish in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. BMC Public Health. 2007; 7: 199.
152. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, Hay SI. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 2016; 95(6 Suppl): 15-34.
153. Hughes GL, Rivero A, Rasgon JL. *Wolbachia* can enhance *Plasmodium* Infection in mosquitoes: Implications for malaria control? PLoS Pathog. 2014; 10(9): 1-4.
154. Hunt RH, Coetzee M, Fettene M. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998; 92: 231-235.
155. Huttel J. Note on the distribution of mosquitoes in Lower- Dahomey. Bull Soc Pathol Exot 1950; 43:563–566.
156. Isaacs AT, Jasinskiene N, Tretiakov M, Thiery I, Zettor A, Bourgouin C, James AA. Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. Proc Natl Acad Sci. 2012; 109(28): E1922-E1930.
157. James S, Collins FH, Welkhoff PA, Emerson C, Godfray HCJ, Gottlieb M, Greenwood B, Lindsay SW, Mbogo CM, Okumu FO, Quemada H, Savadogo M, Singh JA, Tountas KH, Touré YT. Pathway to deployment of gene drive mosquitoes as a potential biocontrol tool for elimination of malaria in sub-saharan africa: recommendations of a scientific working group †. Am J Trop Med Hyg. 2018; 98(6_Suppl): 1-49.
158. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012; 337(6096): 816-821.
159. Joshi D, McFadden MJ, Bevins D, Zhang F, Xi Z. *Wolbachia* strain wAlbB confers both fitness costs and benefit on *Anopheles stephensi*. Parasit Vectors. 2014;7:336.

160. Kamdem C, Tene Fossog B, Simard F, Etouna J, Ndo C, Kengne P, Boussès P, Etoa F-X, Awono-Ambene P, Fontenille D, Antonio-Nkondjio C, Besansky NJ, Costantini C. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. PLoS One. 2012;7(6):e39453.
161. Kawada H, Dida GO, Ohashi K, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Sonye G, Maekawa Y, Mwatele C, Njenga SM, Mwandawiro C, Minakawa N, Takagi M. Multimodal Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* s.s. in Western Kenya. PLoS ONE. 2011; 6(8): e22574.
162. Kazembe LN, Kleinschmidt I, Holtz TH. Spatial analysis and mapping of malaria risk in Malawi using point-referenced prevalence of infection data. Int J Health Geograph. 2006;5:41.
163. 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.
164. Kent RJ, Norris DE. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73(2): 336–342.
165. Kettle DS. Medical and Veterinary Entomology 2nd ed. Wallingford, Oxon, UK: CAB International; 1995.
166. Khot AC, Bingham G, Field LM, Moores GD. A novel assay reveals the blockade of esterases by piperonyl butoxide. Pest Manag Sci. 2008;64:1139–42.
167. Kigozi R, Baxi SM, Gasasira A, Sserwanga A, Kakeeto S, Nasr S, Rubahika D, Dissanayake G, Kamya MR, Filler S, Dorsey G. Indoor residual spraying of insecticide and malaria morbidity in a high transmission intensity area of Uganda. PLoS ONE. 2012;7:e42857.
168. Killeen GF, Smith TA. Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101(9):867-80.

169. Killeen GF, Okumu FO, N’Guessan R, Coosemans M, Adeogun A, Awolola S, Etang J, Dabiré RK, Corbel V. The importance of considering community-level effects when selecting insecticidal malaria vector products. *Parasit Vectors*. 2011;4:160.
170. Killeen GF, Masalu JP, Chinula D, Fotakis EA, Kavishe DR, Malone D, Okumu FO. Control of malaria vector mosquitoes by insecticide-treated combinations of window screens and eave baffles. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(5):782–9.
171. Kleinschmidt I, Sharp B, Mueller I, Vounatsou P. Rise in malaria incidence rates in South Africa: small area spatial analysis of variation in time trends. *Am J Epidemiol*. 2002;155:257–64.
172. Kleinschmidt I, Sharp B, Benevente L, Schwabe C, Torrez M, Kuklinski J, Morris N, Raman J, Carter J. Reduction in infection with *Plasmodium falciparum* one year after the introduction of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74:972–8.
173. Kleinschmidt I, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, Bashir AI, Bigoga J, Adechoubou A, Raghavendra K, Knox TB, Malik EM, Nkuni ZJ, Bayoh N, Ochomo E, Fondjo E, Kouambeng C, Awono-Ambene HP, Etang J, Akogbeto M, Bhatt R, Swain DK, Kinyari T, Njagi K, Muthami L, Subramaniam K, Bradley J, West P, Massougboji A, Okê-Sopoh M, Hounto A, Elmardi K, Valecha N, Kamau L, Mathenge E, Donnelly MJ. Design of a study to determine the impact of insecticide resistance on malaria vector control: a multi-country investigation. *Malar J*. 2015; 14:282.
174. Knight KL, Stone A. catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2nd ed. Thomas Say Foundation and Entomological Society of America, College Park, MD. 1977. p. 33.
175. Koekemoer LL, Kamau L, Garros C, Manguin S, Hunt RH, Coetzee M. Impact of the Rift Valley on restriction fragment length polymorphism typing of the major African malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2006;43(6):1178–84.
176. Kristan M, Fleischmann H, della Torre A, Stich A, Curtis CF. Pyrethroid Resistance/Susceptibility and Differential Urban/Rural Distribution of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s. Malaria Vectors in Nigeria and Ghana. *Med Vet Entomol*. 2003 ; 17(3):326-32.

177. Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2018;36(11):1062–6.
178. 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.
179. Lehmann T, Diabate A. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective. *Infect Genet Evol* 2008; 8:737–746.
180. Le Sueur D, Binka F, Lengeler C, de Savigny D, Snow B, Teuscher T, Toure Y. An atlas of malaria in Africa. *Afr Health.* 1997;19:23–4.
181. Lengeler C, Snow RW. From efficacy to effectiveness: insecticide-treated bednets in Africa. *Bull World Health Organ.* 1996; 74: 325–332.
182. Lepoivre P. *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte.* De Boeck Supérieur. 2003. p. 112.
183. Li Z, Jingjiang X, Banquan L, Taihua Z, Mingxin L, World Health Organization. Mosquito nets impregnated with deltamethrin against malaria vectors in China. Geneva: World Health Organization; 1987.
184. Lindsay SW, Birley MH. Climate change and malaria transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1996; 6:573- 588.
185. Lord CC, Woolhouse MEJ, Heesterbeek JAP, Mellor PS. Vector-borne diseases and the basic reproduction number: a case study of African horse sickness. *Med Vet Entomol.* 1996 ; 10: 19–28.
186. Lyimo EO, Msuya FH, Rwegoshora RT, Nicholson EA, Mnzava AE, Lines JD, Curtis CF. Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria. Part 3. Effects on the prevalence of malaria parasitaemia and fever. *Acta Trop.* 1991; 49: 157–163.
187. Mabaso ML, Sharp B, Lengeler C. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house spraying. *Trop Med Int Health.* 2004; 9:846-56.

- 188.** Mabaso MLH, Craig M, Cross A, Smith T. Environmental predictors of the seasonality of malaria transmission in Africa: The challenge. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 6: 33 -37.
- Macdonald G. The Measurement of Malaria Transmission. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1955;48: 295–302.
- 189.** MacDonald G. Epidemiological basis of malaria control. *Bull Org Mond Santé.* 1956; 15: 613-626.
- 190.** MacDonald. The epidemiology and control of malaria. *Revue of Sciences.* 1957. p. 89.
- 191.** Macias VM, Ohm JR, Rasgon JL. Gene drive for mosquito control: where did it come from and where are we headed? *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14(9):1006.
- 192.** Manoukis NC, Diabate A, Abdoulaye A, Diallo M, Dao A, Yaro AS, Ribeiro JMC, Lehmann T. Structure and dynamics of male swarms of *Anopheles gambiae*. *J Med Entomol.* 2009; 46(2): 227-235.
- 193.** Marbiah NT, Petersen E, David K, Magbity E, Lines J, Bradley DJ. A controlled trial of lambda-cyhalothrin-impregnated bed nets and/or dapsone/pyrimethamine for malaria control in Sierra Leone. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(1):1-6.
- 194.** Marsh K. Research priorities for malaria elimination. *Lancet.* 2010; 376:1626–1627.
- 195.** Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998; 7: 179–184.
- 196.** Masendu HT, Hunt RH, Govere J, Brooke BD, Awolola TS, Coetzee M. The sympatric occurrence of two molecular forms of the malaria vector *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto* in Kanyemba, in the Zambezi Valley, Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(7):393–6.
- 197.** Ministère de la Santé. Annuaire des statistiques sanitaires 2016. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective; 2017.
- 198.** Mitchell SN, Stevenson BJ, Müller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG, Hemingway J, Paine MJI, Ranson H, Donnelly MJ. Identification and validation of a gene causing cross

- resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109:6147–52.
- 199.** Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin A, Chandre F, Djègbé I, Guis H, Corbel V. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. J Infect Dis. 2012; 206(10):1622–9.
- 200.** Monroe A, Moore S, Koenker H, Lynch M, Ricotta E. Measuring and characterizing night time human behaviour as it relates to residual malaria transmission in sub-Saharan Africa: a review of the published literature. Malar J. 2019;18(1):6.
- 201.** Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A, Robert V. Typologie du paludisme en Afrique. Cahiers Santé. 1993;3:220–38.
- 202.** Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Sircoulon J. Biodiversité du paludisme dans le monde. (Eds) John Libbey Eutotext. 2004. p. 428.
- 203.** Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the “bashful” malaria parasites. Trends Parasitol. 2007; 23:278–83.
- 204.** Muirhead-Thomson RC. The significance of irritability, behaviouristic avoidance and allied phenomena in malaria eradication. Bull World Health Organ. 1960; 22: 721–34.
- 205.** Mullen G, Durden L. Medical and Veterinary Entomology. Academic Press; 2002.
- 206.** Müller GC, Beier JC, Traore SF, Toure MB, Traore MM, Bah S, Doumbia S, Schlein Y. Successful field trial of attractive toxic sugar bait (ATSB) plant-spraying methods against malaria vectors in the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. Malar J. 2010;9(1):210.
- 207.** Munga S, Yakob L, Mushinzimana E, Zhou G, Ouna T, Minakawa N, et al. Land use and land cover changes and spatiotemporal dynamics of *Anopheline* larval habitats during a four-year period in a highland community of Africa. Am J Trop Med Hyg. 2009;81:1079–84.
- 208.** Ndiath, MO, Mazenot C, Gaye A, Konate L, Bouganali C, Faye O, Sokhna C, Jean- Trape J: Methods to collect *Anopheles* mosquitoes and evaluate malaria transmission: A comparative study in two villages in Senegal. Malar J. 2011; 10:270

- 209.** 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.* 2007a; 13(2):199–206.
- 210.** N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Yates A, Rowland M. Chlorfenapyr: A pyrrole insecticide for the control of pyrethroid or DDT resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) mosquitoes. *Acta Trop.* 2007b; 102(1):69–78.
- 211.** N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Chabi J, Akogbeto M, Rowland M. Control of pyrethroid and DDT-resistant *Anopheles gambiae* by application of indoor residual spraying or mosquito nets treated with a long-lasting organophosphate insecticide, chlorpyrifos-methyl. *Malar J.* 2010; 9:44.
- 212.** N'tcha L. Socio-behavioral study on population sleeping patterns in northern Benin for Indoor Residual Spraying decision. USAID Annual Report, IL#31; 2019.
- 213.** Najera JA, Zaim M. Malaria vector control: insecticides for indoor residual spraying [WHO/CDS/WHOPES/2001.3]. Geneva: World Health Organization; 2001.
- 214.** Najera JA, Zaim M. Lutte contre les vecteurs du paludisme : critères et procédures de prise de décisions pour une utilisation raisonnée des insecticides. Geneve: Organisation Mondiale de la Santé ; 2004.
- 215.** Neafsey DE, Lawniczak MKN, Park DJ, Redmond SN, Coulibaly MB, Traoré SF, Sagnon N, Costantini C, Johnson C, Wiegand RC, Collins FH, Lander ES, Wirth DF, Kafatos FC, Besansky NJ, Christophides GK, Muskavitch MAT, Kleinschmidt I, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, Bashir AI, Bigoga J, Adechoubou A, Raghavendra K, Knox TB, Malik EM, Nkuni ZJ, Bayoh N, Ochomo E, Fondjo E. SNP Genotyping Defines Complex Gene-Flow Boundaries Among African Malaria Vector Mosquitoes. *Science.* 2010; 330: 514 - 517.
- 216.** Ngufor C, Fongnikin A, Rowland M, N'Guessan R. Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* *sl* in Southern Benin. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189575.

217. Ngwej LM, Hattingh I, Mlambo G, Mashat EM, Kashala J-CK, Malonga FK, Bangs MJ. Indoor residual spray bio-efficacy and residual activity of a clothianidin-based formulation (SumiShield® 50WG) provides long persistence on various wall surfaces for malaria control in the Democratic Republic of the Congo. *Malar J.* 2019;18(1):72.
218. Nikou D, Ranson H, Hemingway J. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene.* 2003;318: 91–102.
219. Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting human transmission biology for malaria elimination. *PLOS Pathog.* 2015; 11(6):1-17.
220. Njie M, Dilger E, Lindsay SW, Kirby MJ. Importance of eaves to house entry by *Anopheline*, but not *Culicine*, mosquitoes. *J Med Entomol.* 2009;46(3):505–10.
221. Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013;43: 407–416.
222. Nwakanma DC, Neafsey DE, Jawara M, Adiamoh M, Lund E, Rodrigues A, Loua KM, Konate L, Sy N, Dia I, Awolola TS, Muskavitch MAT, Conway DJ. Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics.* 2013;193(4):1221–31.
223. Ochomo E, Bayoh MN, Brogdon WG, Gimnig JE, Ouma C, Vulule JM, Walker ED. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in western Kenya: phenotypic, metabolic and target site characterizations of three populations. *Med Vet Entomol.* 2013; 27(2): 156–164.
224. Ojuka P, Boum Y, Denoeud-Ndam L, Nabasumba C, Muller Y, Okia M, Mwanga-Amumpaire J, De Beaudrap P, Protopopoff N, Etard JF. Early biting and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles* might compromise the effectiveness of vector control intervention in Southwestern Uganda. *Malar J.* 2015;14(1):1–8.
225. Okumu FO, Moore J, Mbeyela E, Sherlock M, Sangusangu R, Ligamba G, Russell T, Moore SJ. A modified experimental hut design for studying responses of disease-transmitting mosquitoes to indoor interventions: The Ifakara Experimental Huts. *PLoS ONE.* 2012;7:e30967.

226. Ondiba IM, Oyieke FA, Ong'amo GO, Olumula MM, Nyamongo IK, Estambale BBA. Malaria vector abundance is associated with house structures in Baringo County, Kenya. PLoS One. 2018;13(6):e0198970.
227. Onyabe DY, Conn JE. Genetic differentiation of the malaria vector *Anopheles gambiae* across Nigeria suggests that selection limits gene flow. Heredity. 2001 ; 87 : 647–658.
228. Onyabe DY, Vajime CG, Nock IH, Ndams IS, Akpa AU, Alaribe AA, Conn JE. The distribution of M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97:605–8.
229. OMS. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016–2030. Geneve: Organisation Mondiale de la Santé; 2015.
230. OMS. Maladies à transmission vectorielle. Geneve: Organisation Mondiale de la Santé; 2020. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.
231. Ossè R, Aikpon R, Padonou GG, Oussou O, Yadouléton A, Akogbéto M. Evaluation of the efficacy of bendiocarb in indoor residual spraying against pyrethroid resistant malaria vectors in Benin: results of the third campaign. Parasit Vectors. 2012; 5: 163.
232. Ossè RA, Tokponnon T, Padonou GG, Sidick A, Aïkpon R, Fassinou A, Koukpo ZC, Sèwadé W, Akinro B, Sovi A, Aïssi M, Akogbéto MC. Involvement of *Anopheles nili* in *Plasmodium falciparum* transmission in North Benin. Malar J. 2019; 18:152.
233. Overgaard HJ, Reddy VP, Abaga S, Matias A, Reddy MR, Kulkarni V, Schwabe C, Segura L, Kleinschmidt I, Slotman MA. Malaria transmission after five years of vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. Parasit Vectors. 2012;5:253.
234. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Dabire R, Gnanguenon V, Wat'senga F, Agossa FR, Yohannes G, Coleman S, Samdi LM, Diop A, Faye O, Magesa S, Manjurano A, Okia M, Alyko E, Masendu H, Baber I, Sovi A, Rakotoson JD, Varela K, Abong'o B, Lucas B, Fornadel C, Dengela D. Susceptibility testing of *Anopheles* malaria vectors with the neonicotinoid insecticide clothianidin;

results from 16 African countries, in preparation for indoor residual spraying with new insecticide formulations. *Malar J.* 2019;18(1):264.

235. Padonou GG, Gbedjissi G, Yadouleton A, Azondekon R, Ossé R, Oussou O, Gnanguenon V, Aikpon R, Sezonlin M, Akogbeto M. Decreased proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae s.l.* populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa). *Parasit Vectors.* 2012; 5: 262

236. Payne D, Grab B, Fontaine RE, Hempel JHG. Impact of control measures on malaria transmission and general mortality. *Bull Org mond Santé.* 1976; 54: 369-377.

237. Payne D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 1987; 3(8): 241-246.

238. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B, Chandre F, Hougard J-M. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1707–1714.

239. Perera MDB, Hemingway J, Karunaratne SP. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar J.* 2008;7: 168.

240. Pfeil J, Sepp KJ, Heiss K, Meister M, Mueller A-K, Borrmann S. Protection against malaria by immunization with non-attenuated sporozoites under single-dose piperazine-tetraphosphate chemoprophylaxis. *Vaccine.* 2014; 32 : 6005–6011.

241. Pinto J, Lynd A, Vicente JL, Santolamazza F, Randle NP, Gentile G, Moreno M, Simard F, Charlwood JD, do Rosário VE, Caccone A, della Torre A, Donnelly MJ. Multiple Origins of Knockdown Resistance Mutations in the Afrotropical Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *PLoS One.* 2007; 2(11): e1243.

242. Plapp JrFW. The genetic basis of insecticide resistance in the house fly: Evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. *Pestic Biochem Phys.* 1984; 22: 194–201.

243. PNLP du Bénin: Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme 2011-2015 ; 2011
244. Pock Tsy J-M, Duchemin JB, Marrama L, Rabarison P, Le Goff G, Rajaonarivelo V, Robert V. Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malar J.* 2003; 2: 33.
245. Prasad H, Prasad RN, Haq S. Control of mosquito breeding through *Gambusia affinis* in rice fields. *Indian J Malariol.* 1993;30:57–65.
246. Protopopoff N, Wright A, West PA, Tigererwa R, Mosha FW, Kisinza W, Kleinschmidt I, Rowland M. Combination of insecticide treated nets and indoor residual spraying in Northern Tanzania provides additional reduction in vector population density and malaria transmission rates compared to insecticide treated nets alone: a randomised control trial. *PLoS ONE.* 2015;10:e0142671.
247. Raeisi A, Abai MR, K Akbarzadeh, Nateghpour M, Sartipi M, Hassanzehi A, Shahbakhsh N, Faraji L, Nikpour F, Mashayekhi M. Residual Effects of Deltamethrin WG 25% as a New Formulation on Different Surfaces against *Anopheles stephensi*, in Southeastern Iran. *Iran J Arthropod Borne Dis.* 2010; 4(1): 60–65.
248. Randriantsimaniry D. Vector control in the Madagascar plateau epidemic. *Santé.* 1995; 5:392–396.
249. Ranson H, Jensen B, Vulule J, Wang X, Hemingway J, Collins F. 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; 9:491–7.
250. Ranson H, Rossiter L, Ortellì F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.* 2001; 359(2):295–304.
251. Ranson H, Abdallah H, Badolo A, Guelbeogo WM, Kera-Hinzoumbé C, Yangalbé-Kalnoné E, Sagnon N, Simard F, Coetzee M. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malar J.* 2009; 8:299.

252. Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: introduction. Bull Soc Vect Ecol. 1989; 14(9):39-40.
253. Riveron JM, Ibrahim SS, Chanda E, Mzilahowa T, Cuamba N, Irving H, Barnes KG, Ndula M, Wondji CS. The highly polymorphic CYP6M7 cytochrome P450 gene partners with the directionally selected CYP6P9a and CYP6P9b genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. BMC Genomics. 2014;15(1):817.
254. Robert V, Carnevale P. Les vecteurs du Paludisme en Afrique sub-saharienne. Etudes Méd. 1984 ; 2 : 79 -90.
255. Robert V. Les vecteurs ; 2001. <http://asmt.louis.free.fr/anopheles.html#ano-hom>.
256. Rodhain F, Perez C. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris, France. 1985.p.458.
257. Rodhain F. Le microbe, l'insecte, l'homme et les autres... : le monde des maladies à vecteurs. Bull Acad Vet France. 2015; 168(1): 5.
258. Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MB, Teelen K, Makamdop KN, Wiersma J, Arens T, Beckers P, van Gemert G, van de Vegte-Bolmer M, van der Ven AJ, Luty AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. The Lancet. 2011, 377:1770–1776.
259. Roll Back Malaria. Seventeenth meeting of the RBM partnership monitoring and evaluation reference group (MERG). New York City, United States of America; 2011.
260. Rowland M, Boko P, Odjo A, Asidi A, Akogbeto M, N'Guessan R. A new long-lasting indoor residual formulation of the organophosphate insecticide pirimiphos methyl for prolonged control of pyrethroid-resistant mosquitoes: An experimental hut trial in Benin. PLoS One. 2013;8(7):e69516.
261. RTS SCTP. Efficacy and safety of RTS, S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. Lancet (London, England). 2015; 386 (9988):31–45.
262. Salako AS, Ahogni I, Kpanou C, Sovi A, Azondekon R, Sominahouin AA, Tokponnon F, Gnanguenon V, Dagnon F, Iyikirenga L, Akogbeto MC. Baseline entomologic data on malaria

transmission in prelude to an indoor residual spraying intervention in the regions of Alibori and Donga, northern Benin, West Africa. *Malar J.* 2018;17:392.

263. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008;7:163.

264. Sharp BL, Kleinschmidt I, Streat E, Maharaj R, Barnes KI, Durrheim DN, Ridl FC, Morris N, Seocharan I, Kunene S, LA Grange JJ, Mthembu JD, Maartens F, Martin CL, Barreto A. Seven years of regional malaria control collaboration—Mozambique, South Africa and Swaziland. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:42–7.

265. Shaw WR, Marcenac P, Childs LM, Buckee CO, Baldini F, Sawadogo SP, Dabiré RK, Diabate A, Catteruccia F. *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nat Commun.* 2016; 7(11772): 1-7.

266. Sherrard-Smith E, Skarp JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, Mihreteab S, Charlwood JD, Bhatt S, Winskill P, Griffin JT, Churcher TS. Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(30):15086–95.

267. Shousha AT. Species eradication: The eradication of *Anopheles gambiae* from Upper Egypt 1942-1945. *Bull World Heal Organ.* 1948;1(2):309–52.

268. Sibanda^{1†}MM, Focke^{1*†} WW, Labuschagne FJWJ, Moyo L, Nhlapo NS, Maity A, Muiambo H, Massinga Jr P, Crowther NAS, Coetzee M, Brindley GWA. Degradation of insecticides used for indoor spraying in malaria control and possible solutions. *Malar J.* 2011; 10:307.

269. Sidhu ABS, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science (New York, N.Y.).* 2002; 298(5591): 210-213.

270. Simard F, Ayala D, Kamdem G, Pombi M, Etouna J, Ose K, Fotsing J-M, Fontenille D, Besansky JN, Costantini C. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* 2009; 9:17.

271. Simard F. La lutte contre les vecteurs : quel avenir ? Biol Aujourd'hui. 2018;212(3–4):137–45.
272. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. A global map of dominant malaria vectors. Parasit Vectors. 2012; 5(1):69.
273. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993; 61(2): 315-320.
274. Snow RW, Lindsay SW, Hayes RI, Greenwood BM. Permethrin-treated bed nets (mosquito nets) prevent malaria in Gambian children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988; 82: 838-842.
275. Sovi A, Djegbe I, Soumanou ., Tokponnon F, Gnanguenon V, Azondekon R, Oké-Agbo F, Okè M., Adéchoubou A, Massougbodji A, Corbel V, Akogbéto M. Microdistribution of the resistance of malaria vectors to deltaméthrine in the region of Plateau (southeastern Benin) in preparation for an assessment of the impact of resistance on the effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs). BMC Infect Dis. 2014;14:103.
276. Spellings BL, Brooke BD, Koekemoer LL, Chiphwanya J, Coetzee M, Hunt RH. A New Species Concealed by *Anopheles funestus* Giles, a Major Malaria Vector in Africa. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81(3): 510–515.
277. Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P , Muangnoicharoen S, O'Neill PM, Lu-Yun L, Müller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, Sutcliffe MJ, Paine MJI. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. Insect Biochem Mol Biol. 2011 ; 41 (7) : 492-502.
278. Sternberg ED, Ng'habi KR, Lyimo IN, Kessy ST, Farenhorst M, Thomas MB, Knols BGJ, Mnyone LL. Eave tubes for malaria control in Africa: initial development and semi-field evaluations in Tanzania. Malar J. 2016;15(1):447.

- 279.** Stewart ZP, Oxborough RM, Tungu PK, Kirby MJ, Rowland MW, Irish SR. Indoor application of attractive toxic sugar bait (ATSB) in combination with mosquito nets for control of pyrethroid-resistant mosquitoes. *PLoS One*. 2013;8(12):e8416.
- 280.** Su X, Miller LH. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science China. Life sci.* 2015; 58(11): 1175-1179.
- 281.** Sy O, Niang EA, Ndiaye M, Konaté L, Diallo A, Ba E, Tairou F, Diouf E, Cissé B, Gaye O, Faye O. Entomological impact of indoor residual spraying with pirimiphos-methyl: a pilot study in an area of low malaria transmission in Senegal. *Malar J.* 2018;17:64.
- 282.** Tangena J-AA, Hendriks CMJ, Devine M, Tammaro M, Trett AE, Williams I, DePina AJ, Sisay A, Herizo R, Kafy HT, Chizema E, Were A, Rozier J, Coleman M, Moyes CL. Indoor residual spraying for malaria control in sub-Saharan Africa 1997 to 2017: an adjusted retrospective analysis. *Malar J.* 2020; 19:150.
- 283.** Tchioffo MT, Boissière A, Churcher TS, Abate L, Gimonneau G, Nsango SE, Awono-Ambéné PH, Christen R, Berry A, Morlais I. Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *PLoS ONE*. 2013; 8(12): 1-9.
- 284.** Tchioffo MT, Boissière A, Abate L, Nsango SE, Bayibéki AN, Awono-Ambéné PH, Christen R, Gimonneau G, Morlais I. Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. *Front. Microbiol.* 2016a; 6(1500): 1-9.
- 285.** Tchioffo MT, Abate L, Boissière A, Nsango SE, Gimonneau G, Berry A, Oswald E, Dubois D, Morlais I. An epidemiologically successful *Escherichia coli* sequence type modulates *Plasmodium falciparum* infection in the mosquito midgut. *Infect Genet Evol.* 2016b; 43, 22-30.
- 286.** Thompson M, Shotkoski F, Ffrench-Constant RH. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Lett.* 1993;325: 187–190.
- 287.** Tokponnon F, Sissinto Y, Hounto Ogouyémi A, Adéothy AA, Adechoubou A, Houansou T, Oke M, Kinde-Gazard D, Massougbedji A, Akogbeto MC, Cornelie S, Corbel V, Knox TB, Mnzava

- AP, Donnelly MJ, Kleinschmidt I, Bradley J. Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: evidence from health facility data from Benin. *Malar J.* 2019;14:282.
- 288.** Toto, JC, Besnard P, Le Mire J, Almeida DS, Dos Santos MA, Fortes F, Foumane V, Simard F, Awono-Ambene HP, Carnevale P. [Preliminary evaluation of the insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Lobito (Angola), using WHO standard assay]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2011; 104: 307– 312.
- 289.** Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, H. M. Maïga, O. Sankaré, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.str. in Mali, West Africa. *Genetica.* 1994; 94:213–223.
- 290.** Utzinger J, Tozan Y, Singer BH. Efficacy and cost-effectiveness of environmental management for malaria control. *Trop Med Int Heal.* 2001; 6(9):677–87.
- 291.** Viniaker H, Lavaud F. Allergy to mosquito bites. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 45: 620–625.
- 292.** Vontas J, David J-P, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Mol Biol.* 2007; 16: 315–324.
- 293.** Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Mcallister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol.* 1999; 13(3):239–44.
- 294.** Walker T, Moreira LA. Can *Wolbachia* be used to control malaria? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(suppl 1): 212-217.
- 295.** Wang SJ, Lengeler C, Mtasiwa D, Mshana T, Manane L, Maro G, Tanner M. Rapid urban malaria appraisal (RUMA) II: epidemiology of urban malaria in Dar es Salaam (Tanzania). *Malar J.* 2006a;5:29.

296. Wang SJ, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Diadie DA, Pritroipa X, Convelbo N, Kientga M, Tanner M. Rapid urban malaria appraisal (RUMA) I: epidemiology of urban malaria in Ouagadougou. *Malar J.* 2006b;4:43.
297. 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.
298. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect. Dis.* 2001; 184: 770-776.
299. White GB. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1974a; 68(4):278-301.
300. White GB. Biological effects of intraspecific chromosomal polymorphism in malaria vector populations. *Bull World Health Organ.* 1974b; 50: 299-306.
301. WHO. A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control During Pregnancy in the African Region; 2004.
302. WHO. Indoor residual spraying: use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination: WHO position statement. Geneva: World Health Organization; 2006.
303. WHO. Global malaria control and elimination : report of a technical review. Geneva: World Health Organization; 2008.
304. WHO. The use of DDT in malaria vector control: WHO position statement; 2011a.
305. WHO. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance. Preserving the effectiveness of modern malaria vector control, meeting report, 4–6 May 2010. Geneva: World Health Organization; 2011b.
306. WHO. WHO evidence review group: the safety and effectiveness of single dose primaquine as a *P. falciparum* gametocytocide. Malaria Policy Advisory Committee Meeting, Session 5. Bangkok, Thailand: World Health Organization; 2012a.
307. WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management (GPIRM). Geneva: World Health Organization; 2012b.

- 308.** WHO. Larval source management: a supplementary malaria vector control measure: an operational manual; Geneva:World Health Organization; 2013.
- 309.** WHO. Module de formation à la lutte contre le paludisme : Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle. Guide du participant. Geneva: World Health Organization; 2014.
- 310.** WHO. World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015a.
- 311.** WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Third Edition. Geneva: World Health Organization; 2015b.
- 312.** WHO. World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
- 313.** WHO. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018a.
- 314.** WHO. WHO | SumiShield 50WG. World Health Organization; 2018b.
- 315.** WHO. WHO | Fludora Fusion. World Health Organization; 2018c.
- 316.** WHO. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016. Geneva: World Health Organization; 2018d.
- 317.** WHO. WHO | Overview of malaria treatment. World Health Organization; 2018e.
<http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/> Consulté le 14 mai 2020.
- 318.** WHO. World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
- 319.** WHO. List of WHO Prequalified Vector Control Products; 2020. <https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/PrequalifiedProducts27January2020.pdf?ua=1>.
- 320.** WHOPES. Report of the twentieth WHOPES working group meeting. Geneva: World Health Organization; 2017.
- 321.** Wiebe A, Longbottom J, Gleave K, Shearer FM, Sinka ME, Massey NC, Cameron E, Bhatt S, Gething PW, Hemingway J, Smith DL, Coleman M, Moyes CL. Geographical distributions of African malaria vector sibling species and evidence for insecticide resistance. *Malar J.* 2017;16(1):85.

322. Wirtz R, Burkot TR, Andre RG, Rosenberg R, Collins WE, Roberts DR. Identification of *Plasmodium Vivax* Sporozoites in Mosquitoes using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34(6): 1048-1054.
323. 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(1): 39-45.
324. Wondji C, Simard F, Fontenille D. Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect Mol Biol.* 2002;11:11–9.
325. Wondji C, Frédéric S, Petrarca V, Etang J, Santolamazza F, Della Torre A, Fontenille D. Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J Med Entomol.* 2005;42(6):998–1005.
326. Wondji CS, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowa T, Irving H, Ndula M, Rehman A, Morgan J, Barnes KG, Hemingway J. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109: 19063–19070.
327. Wood OR, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer LL, Brooke BD. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors.* 2010;3(1):67.
328. Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbéto MC. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J.* 2009; 8: 103.
329. Yadouleton A, Padonou G., Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N’guessan R, Gbénou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbéto M. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J.* 2010; 9: 83-88.

330. Yadouléton AW, Martin T, Padonou G, Chandre F, Alex A, Djogbénou L, Dabiré R, Aïkpon R, Boko M, Glitho I, Akogbeto M. Cotton pest management strategies on the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* populations in northern Benin. *Parasit Vectors*. 2011;4:60.
331. Yadouleton A, Badirou K, Agbanrin R, Jöst H, Attolou R, Srinivasan R, Padonou G, Akogbéto M. Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. *Parasit Vectors* 2015; 8:17.
332. Yahouédo GA, Chandre F, Rossignol M, Ginibre C, Balabanidou V, Garcia N, Mendez A, Pigeon O, Vontas J, Cornelie S. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci Rep*. 2017;7(1):11091.
333. Yawson AE, Weetman D, Wilson MD, Donnelly MJ. Ecological zones rather than molecular forms predict genetic differentiation in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. in Ghana. *Genetics*. 2007;175(2):751–61.
334. Yé Y, Hoshen M, Louis V, Séraphin S, Traoré I, Sauerborn R. Housing conditions and *Plasmodium falciparum* infection: Protective effect of iron-sheet roofed houses. *Malar J*. 2006;5(1):8.

Annexes

Annexe 1

C.R.E

.COT

C.R.E
.COT
ONO
U



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT

U.S. President's Malaria Initiative

Procédure Opératoire Standardisée du CREC	Extraction d'ADN au CTAB sur moustique entier
Développée par	Aboubakar Sidick / Razaki Ossè
Date d'édition	
Date de mise à jour	Octobre 2017

I- Objectif

Extraire l'ADN du moustique entier au CTAB.

II- Référence

Pas de publication à ce jour. C'est une technique que faisait Myriam dans son ancien labo.

III- Matériels, instruments et équipements

- Pylons
- Broyeur automatique (pellette)
- Centrifugeuse
- Bain- marie ou Bloc chauffant
- Tube eppendorf 1,5 ml
- Solution de CTAB 2%

- Chloroforme
- Isopropanol
- Ethanol 70%
- Vortex
- Micropipettes de 1000 µl, 200µl, 100µl, 20µl
- Papier essuie-tout

IV- Mesures de protection

Blouse labo, Gants, lunette de protection

V- Procédure

1. Broyer chaque moustique dans 200µl de CTAB 2%
2. Mettre au bain- marie ou dans un bloc chauffant à 65 pendant 5minutes
3. Ajouter 200µl de chloroforme (utiliser le même cône tant que celui-ci n'a pas touché les tubes)
- Mélanger par inversion au moins 10fois
4. Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm à TA
5. Préparer des tubes correspondants bien étiquetés pour recueillir le surnageant
6. Prélever la phase supérieure (surnageant) et la mettre dans les tubes préparés
7. Ajouter 200 µl d'Isopropanol sur le surnageant – Bien mélanger par inversion

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%
H ₂ O	QSP 1 L	

12. Sécher le culot d'ADN 5 minutes au speed-vac
13. Reprendre (reconstituer) dans 20µl d'H₂O stérile (utiliser un nouveau cône pour chaque tube) – Laisser suspendre toute la nuit sur la paillasse ou ½ journée
14. Faire les dilutions appropriées pour les PCRs

CTAB 2% (Cetyl trimethyl ammonium bromide)

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à température ambiante (TA)

C.R.E

.COT

ONO

U



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT

U.S. President's Malaria Initiative

Procédure Opératoire Standardisée du CREC	PCR diagnostic de la mutation L1014F chez <i>An. gambiae</i>
Développée par	Aboubakar Sidick / Razaki Ossè
Date d'édition	
Date de mise à jour	Octobre 2017

Kdr : knockdown résistance

Polymorphismes dans un gène codant pour un canal à Na, associé à la résistance au DDT et aux Pyrèthrinoides.

I- Objectifs

Identifier la mutation Kdr (L1014F) au niveau du canal sodium responsable de la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes chez *An. gambiae s.l* en Afrique de l'Ouest.

II- Référence

Martinez-Torres D *et al.* (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7:179-184

III- Matériels, instruments et amorces

- Thermocycleur
- Micropipette 10µl, 20µl, 200µl
- Embout (cône) 10µl, 20µl, 200µl
- Hotte pour PCR

Amorces

- **AgD1** : ATAGATTCCCCGACCATG
- **AgD2** : AGACAAGGATGATGAACC
- **AgD3** : AATTTGCATTACTTACGACA
- **AgD4**: CTGTAGTGATAGGAAATTTA

IV – Mesure de protection

Blouse labo, Gants, lunette de protection

V- Conditions PCR

Avec la Diamond Taq (Eurogentec) Réf : TAQ-I021-1000

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 rxs à 25µl
H ₂ O		QSP 25µl
Tamponde Taq 5X	1X	2,5µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5mM	1,5µl
dNTPs (10mM)	0.2mM	1µl
AgD1 (10µM)	10pmoles	1µl
AgD2 (10µM)	10pmoles	1µl
AgD3 (10µM)	10pmoles	1µl
AgD4 (10µM)	10pmoles	1µl
Taq (u/µl) (Eurogentec)	1u	0,2µl

ADN dilué au (1 /15)		7µl
----------------------	--	-----

Amplification 3' [30'', 60'', 60''] 35c, 7' @ 50°C

Tailles attendues

D1/D2 : 293 pb

D2/D4 : 137 pb Sensible

D1/D3 : 193 pb Résistant

Préparation et conservation des réactifs

Tous les réactifs pour la préparation du master mix doivent être conservés à -20°C.

Préparation du master mix

- Préparer le mix sur la glace suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessus.
- Vortexer le mix et mettre 18 µl pour ADN dilué ou 24µl pour ADN non dilué du mix dans chaque puits (Utiliser le même cône)
- Ajouter 7µl de l'ADN dilué (1/15) ou 1µl de l'ADN non dilué
- Mettre tous les témoins disponibles (RR, RS, SS).
- Mettre le témoin négatif (H₂O)

VI- Préparation et migration du Gel d'agarose 2%

1- Réactif

- Agarose
- 1X Tampon triborate EDTA (TBE)
- Ethidium bromide ou SybrSafe
- Bleu de bromophénol ou Bleu de charge
- Marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 100 pb)

2- Matériels et Instruments

- Pipettes (0,1-10µl, 2-20µl)
- Pipette multicanaux (5- 50µl)
- Embouts (cônes) de 10µl et de 100µl
- Erlenmeyer
- Micro onde
- Cuve électrophorétique
- Transluminateur (chambre noire) pour la lecture du gel

3- Procédure de la préparation du gel d'agarose 2%

- Mélanger 2g d'agarose dans 100ml de tampon TBE 1X
- Faire chauffer au micro-onde environ 1-3min. Laisser refroidir à environ 50°C,
- Ajouter 5µl de Bromide d'éthidium ou 3µl de SybrSafe (bien faire le mélange et éviter de faire des bulles d'air)
- Couler lentement le gel dans la moule de migration contenant les peignes de loge
- Laisser le gel refroidir environ 15 à 20 min

4- Migration et lecture du gel d'agarose

- Préparer les échantillons : 15µl de l'amplicon (produit) PCR et 5µl du bleu de charge.
- Charger les 20µl dans les puits appropriés du gel (**changer de cône après chaque échantillon**)
- Ajouter un marqueur de taille (100pb) dans le puits suivant le contrôle négatif.
- Migrer à 100V pendant environ 1h30min ou à 140V pendant 60min.
- Vérifier la PCR sous UV. Photographier le gel
- Coller la photo dans le cahier de laboratoire et si nécessaire noter les remarques.

C.R.E

.COT

C.R.E
.COT
ONO
U



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT

U.S. President's Malaria Initiative

Procédure Opératoire Standardisée du CREC	PCR diagnostic de la mutation Ace.1R chez <i>An. gambiae</i>
Développée par	Aboubakar Sidick / Razaki Ossè

Date d'édition	
Date de mise à jour	Octobre 2017

I- Objectifs

Identifier la mutation Ace.1R responsable de la résistance aux carbamates et organophosphorés chez *An. gambiae*

Le gène Ace.1 qui code pour l'acétylcholinestérase Ache1. La mutation située au niveau de l'AA 119 est une glycine chez les sensibles et une Sérine chez les résistants.

II- Référence

Weill M *et al.* (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13:1-7

III- Matériels, instruments et amorces

- Thermocycleur
- Micropipette 10µl, 20µl, 200µl
- Embout (cône) 10µl, 20µl, 200µl
- Hotte pour PCR

Amorces

- **Ex3AGdir** : GATCGTGGACACCGTGTTTCG
- **Ex3AGrev** : AGGATGGCCCGCTGGAACAG

IV- Mesure de protection

Blouse labo, Gants, lunette de protection

V- Conditions PCR

Avec la Diamond Taq (Eurogentec) Réf : TAQ-I021-1000

Réactifs	Concentrations finales et Quantités	Pour une réaction de 25µl
dd H ₂ O		
Tampon de Taq 5x	1x	5µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5mM	1.5µl
dNTPs (5mM)	0.2mM	1µl
Ex3AGDir (10µM)	10pmoles	1µl
Ex3AGrev (10µM)	10pmoles	1µl
Taq (5U/µl) (eurogentec)	1U	0.1µl

ADN (1/15)		5 µl
------------	--	------

Amplification 3' [30'', 30'', 30''] 35c, 5' @ 62°C

Vérifier 5µl du produit PCR sur un gel d'agarose 1,5 %

Taille attendue

Ex3AG : 541bp

Digestion Enzymatique

Réactifs	Conc.finale	Pour 1rxs à 25µl
H ₂ O		6,9µl
Tampon de l'enzyme (10x)	1x	2,5µl
BSA (10mg /ml)	0,1mg/ml	0,25µl
Alu1	1u	0,35µl
Produit PCR	15µl	

Incuber à 37°C pendant 3 heures, voire toute la nuit.

Vérifier la réaction en faisant migrer 15µl de la digestion sur un gel d'agarose 2%

Tailles attendues

SS : 403 bp et 138 bp

RR : 253bp, 150bp et 138bp

Préparation et conservation des réactifs

Tous les réactifs pour la préparation du master mix doivent être conservés à -20°C.

Préparation du master mix

- Préparer le mix sur la glace suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessus.
- Vortexer le mix et mettre 20 µl du mix dans chaque puits (Utiliser le même cône)
- Ajouter 5µl de l'ADN dilué (1/15)
- Mettre tous les témoins disponibles (RR, RS, SS).
- Mettre le témoin négatif (H₂O)

VI- Préparation et migration du Gel d'agarose 2%

4- Réactif

- Agarose
- 1X Tampon triborate EDTA(TBE)
- Ethidium bromide ou SybrSafe
- Bleu de bromophénol ou Bleu de charge
- Marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 100 pb)

5- **Matériels et Instruments**

- Pipettes (0,1-10µl, 2-20µl)
- Pipette multicanaux (5- 50µl)
- Embouts (cônes) de 10µl et de 100µl
- Erlenmeyer
- Micro onde
- Cuve électrophorétique
- Transluminateur (chambre noire) pour la lecture du gel

6- **Procédure de la préparation du gel d'agarose 2%**

- Mélanger 2g d'agarose dans 100ml de tampon TBE 1X
- Faire chauffer au micro-onde environ 1-3min. Laisser refroidir à environ 50°C,
- Ajouter 5µl de Bromide d'éthidium ou 3µl de SybrSafe (bien faire le mélange et éviter de faire des bulles d'air)
- Couler lentement le gel dans la moule de migration contenant les peignes de loge
- Laisser le gel refroidir environ 15 à 20 min

4- **Migration et lecture du gel d'agarose**

- Préparer les échantillons : 15µl de l'amplicon (produit) PCR et 5µl du bleu de charge.
- Charger les 20µl dans les puits appropriés du gel (**changer de cône après chaque échantillon**)
- Ajouter un marqueur de taille (100pb) dans le puits suivant le contrôle négatif.
- Migrer à 100V pendant environ 1h30min ou à 140V pendant 60min.
- Vérifier la PCR sous UV. Photographier le gel
- Coller la photo dans le cahier de laboratoire et si nécessaire noter les remarques.

C.R.E

.COT

ONO



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT

U.S. President's Malaria Initiative

Procédure Opératoire Standardisée du CREC	PCR diagnostic des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> en Afrique de l'Ouest
Développée par	Aboubakar Sidick / Razaki Ossè
Date d'édition	
Date de mise à jour	Octobre 2017

Polymorphisme dans l'espace intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal

I- Objectifs

Elle distingue en Afrique de l'Ouest : *An. gambiae* s.s, *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. merus*, *An. quadriannulatus*, *An. bwambae*.

II- Référence

Scott JA, Brogdon W, Collins FH (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 49(4):520-9.

III- Matériels, instruments et amorces

- Thermocycleur
- Micropipette 10µl, 20µl, 200µl
- Embout (cône) 10µl, 20µl, 200µl
- Hotte pour PCR

Amorces

- **UN** : GTGTGCCGCTTCCTCGATGT
- **AG** : CTGGTTTGGTCGGCACGTTT
- **AA** : AAGTGTCTTCTCCATCCTA
- **AM**: GTGACCAACCCACTCCCTTGA
- **QD** : CAGACCAAGATGGTTAGTAT

IV- Mesure de protection

Blouse labo, Gants, lunette de protection

V- Conditions PCR

Avec la Go Taq (Promega) Réf : M7805

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 rxs à 25µl
H ₂ O		QSP25µl
Tampon de Taq 5X	1X	5µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5mM	1,5µl
dNTPs (5mM)	0.2mM	1µl
UN (5µM)	5pmoles	1µl
AG (5µM)	5pmoles	1µl
AA (5µM)	5pmoles	1µl
AM (5µM)	5pmoles	1µl
QD (5µM)	5pmoles	1µl
Taq (u/µl) (Promega)	0,25u	0,05µl
ADN dilué (1/15)		5µl

Amplification 3' [30'', 30'', 10''] 40c , 5' @ 56°

Tailles attendues

An. gambiae : 390 bp

An. melas : 464 bp

An. arabiensis : 315 bp

An. quadriannulatus : 153 bp

Préparation et conservation des réactifs

Tous les réactifs pour la préparation du master mix doivent être conservés à -20°C.

Préparation du master mix

- Préparer le mix sur la glace suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessus.
- Vortexer le mix et mettre 18 µl du mix dans chaque puits (Utiliser le même cône)
- Ajouter 5 µl de l'ADN dilué (1/15) ou 1 µl de l'ADN non dilué
- Mettre tous les témoins disponibles (RR, RS, SS).
- Mettre le témoin négatif (H₂O)

VI- Préparation et migration du Gel d'agarose 1,5%

7- Réactif

- Agarose
- 1X Tampon triborate EDTA(TBE)
- Ethidium bromide ou SybrSafe
- Bleu de bromophénol ou Bleu de charge
- Marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 100 pb)

8- Matériels et Instruments

- Pipettes (0,1-10µl, 2-20µl)
- Pipette multicanaux (5- 50µl)
- Embouts (cônes) de 10µl et de 100µl
- Erlenmeyer
- Micro onde
- Cuve électrophorétique
- Transluminateur (chambre noire) pour la lecture du gel

9- Procédure de la préparation du gel d'agarose 1,5%

- Mélanger 1,5g d'agarose dans 100ml de tampon TBE 1X
- Faire chauffer au micro-onde environ 1-3min. Laisser refroidir à environ 50°C,
- Ajouter 5 µl de Bromide d'éthidium ou 3 µl de SybrSafe (bien faire le mélange et éviter de faire des bulles d'air)
- Couler lentement le gel dans la moule de migration contenant les peignes de loge
- Laisser le gel refroidir environ 15 à 20 min

4- Migration et lecture du gel d'agarose

- Préparer les échantillons : 15 µl de l'amplicon (produit) PCR et 5 µl du bleu de charge.
- Charger les 20 µl dans les puits appropriés du gel (**changer de cône après chaque échantillon**)
- Ajouter un marqueur de taille (100pb) dans le puits suivant le contrôle négatif.

- Migrer à 100V pendant environ 1h30min ou à 140V pendant 60min.
- Vérifier la PCR sous UV. Photographier le gel
- Coller la photo dans le cahier de laboratoire et si nécessaire noter les remarques.

C.R.E

.COT

C.R.E
.COT

ONO



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT

U.S. President's Malaria Initiative



Procédure Opératoire Standardisée du CREC	PCR Sine pour la détection de <i>An. gambiae</i> , <i>An. coluzzii</i> et <i>An. arabiensis</i>
Développée par	Aboubakar Sidick / Razaki Ossè
Date d'édition	
Date de mise à jour	Octobre 2017

I- Objectifs

Identifier les espèces du complexe *An. gambiae* (*An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*)

II- Référence

Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A, (2008). Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation island of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar J, 7: 163.

III- Matériels, instruments et amorces

- Thermocycleur
- Micropipette 10µl, 20µl, 200µl
- Embout (cône) 10µl, 20µl, 200µl
- Hotte pour PCR

Amorces

- **F6** : TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA
- **R6** : CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC

IV- Mesure de protection

Blouse labo, Gants, lunette de protection

V- Conditions PCR

Avec la Go Taq (Promega) Réf : M7805

Réactifs	Concentrations finales et Quantités	Pour une réaction de 25µl
dd H ₂ O		
Tampon de Taq 5x	1x	5µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5mM	1.5µl
dNTPs (5mM)	0.2mM	1µl
F6 (10µM)	10pmoles	1µl
R6 (10µM)	10pmoles	1µl
Taq (5U/µl)	1U	0.1µl
ADN (1/15)		5 µl

Amplification 3' [30'', 30'', 10''] 35c, 5' @ 56°

Tailles attendues

An. coluzzii: 479pb

An. gambiae : 249pb

An. arabiensis : 223pb

Hybride *An. gambiae* / *An. Coluzzii*: 249pb et 479pb

Préparation et conservation des réactifs

Tous les réactifs pour la préparation du master mix doivent être conservés à -20°C.

Préparation du master mix

- Préparer le mix sur la glace suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessus.
- Vortexer le mix et mettre 20 µl du mix dans chaque puits (Utiliser le même cône)
- Ajouter 5µl de l'ADN dilué (1/15) ou 1µl de l'ADN non dilué
- Mettre tous les témoins disponibles (Ag, Colu, Ar)
- Mettre le témoin négatif (H₂O)

VI- Préparation et migration du Gel d'agarose 2%

10- Réactif

- Agarose
- 1X Tampon triborate EDTA(TBE)
- Ethidium bromide ou SybrSafe
- Bleu de bromophénol ou Bleu de charge
- Marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 100 pb)

11- Matériels et Instruments

- Pipettes (0,1-10µl, 2-20µl)
- Pipette multicanaux (5- 50µl)
- Embouts (cônes) de 10µl et de 100µl
- Erlenmeyer
- Micro onde
- Cuve électrophorétique
- Transluminateur (chambre noire) pour la lecture du gel

12- Procédure de la préparation du gel d'agarose 2%

- Mélanger 2g d'agarose dans 100ml de tampon TBE 1X
- Faire chauffer au micro-onde environ 1-3min. Laisser refroidir à environ 50°C,
- Ajouter 5µl de Bromide d'éthidium ou 3µl de SybrSafe (bien faire le mélange et éviter de faire des bulles d'air)
- Couler lentement le gel dans la moule de migration contenant les peignes de loge
- Laisser le gel refroidir environ 15 à 20 min

4- Migration et lecture du gel d'agarose

- Préparer les échantillons : 15µl de l'amplicon (produit) PCR et 5µl du bleu de charge.
- Charger les 20µl dans les puits appropriés du gel (**changer de cône après chaque échantillon**)
- Ajouter un marqueur de taille (100pb) dans le puits suivant le contrôle négatif.

- Migrer à 100V pendant environ 1h30min ou à 140V pendant 60min.
- Vérifier la PCR sous UV. Photographier le gel
- Coller la photo dans le cahier de laboratoire et si nécessaire noter les remarques.

C.R.E

.COT

C.R.E
.COT

ONO



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE



BOLD
THINKERS
DRIVING
REAL-WORLD
IMPACT

U.S. President's Malaria Initiative

U

ELISA - CSP (Circumsporozoïte protein de Plasmodium)

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

- 1 - SI NECESSAIRE PREPARER LES TAMPONS PBS - BB - TWEEN 20 - NP 40 +BB
- 2 - 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

6 - 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. falôiparum</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 paillasse (ou le W.E. à 4°C).

7 - VIDER LES PLAQUES, NE PAS LAVER

8 - METTRE 200 µl de BB par puits (screen ou monospécifique) pendant 1 H sur paillasse.
Pendant ce temps faire décongeler les moustiques à tester (Tête Thorax dans

BB) 09 - VIDER LES PLAQUES, NE **PAS** LAVER

10 - METTRE 50 µl du **broyat de moustique** par puits. Bien vérifier qu'on met dans le bon puit. Laisser pendant 2 H sur paillasse.

11 - Environ 10 minutes avant la fin des 2h, préparer les **ACm** **CONJUGUES**, si nécessaire reconstituer le lyophilisat (cf. fiche)

12 - VIDER LA PLAQUE. **LAVER 2 FOIS AU PBS/TWEEN 20**

13 - METTRE 50 µl/puits de **l'ACm CONJUGUE**, correspondant à l'ACm de capture (pour Screen = 3 x 50 µl) **LAISSER 1 H** sur paillasse

ACm conjugués à Peroxydase dans **BB**, il faut faire les essai de dilution a chaque nouvelle commande

CONJUGUES Pour 1 plaque		Pour 3 plaques	
<i>p. falôiparum</i> :	7,5 µl/5 ml BB	f :	22,5 µl/15 ml BB

<i>p. vivax</i> 210:	10 µl/5 ml BB	v 210	30 µl/15 ml BB
<i>p. vivax</i> 247 :	2 µl/5 ml BB	v 247 :	6 µl/15 ml BB
<i>p. malariae</i>	15 µl/5 ml PBS	m :	45 µl/15 ml PBS
<i>p. ovale</i>	15 µl/5 ml BB	o :	45 µl/15 ml BB

14 - Environ 5 minutes avant la fin de l'heure, préparer le **SUBSTRAT** de la peroxydase (selon Lhuillier, Sarthou *et al*) :

Pour 3 plaques :

- * 5 mg d'**Ortho-tolidine** dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- * 30 ml de **Tampon citrate**
- * 12 µl de **H2O2** à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

15 - VIDER LA PLAQUE. **LAVER 4 FOIS** AU PBS/TWEEN 20

16 - METTRE 100 µl/puits de **SUBSTRAT**

17 - INCUBER 30 minutes A OBSCURITE SANS TOUCHER (coloration bleue 620 nm)

18 - Blocage par 50 µl d'**acide sulfurique 4N** : Coloration

jaune : 19-Lecture à 620 et 450 nm sur le lecteur Elisa

Réactifs et quantités pour ELISA - CSP

* **PBS**

Reconstituer le PBS en poudre Sigma :

9,7 g dans 1 L d'eau distillée (ex réf. Sigma D 5773)

* **NP 40/BB** = Nonidet P40 (Sigma n° 3516, 50 ml) pour une plaque 2 ml = 25 µl NP 40 + 2 ml BB, agiter (préparer pour 5 plaques 10 ml + 125 µl NP 40)

* **BB** = Dans un litre PBS, ajouter :

- 1) 5 g de Casein (Sigma C 5890)
- 2) 0,1 g de Thiomérosal (Sigma T 5125)
- 3) 0,04 g de Phenol red (Sigma P 4758)

4) 10 g de BSA (Sigma A 7906)

AGITER 2H

(pour les calculs une plaque, moustiques à broyer compris : 100 ml de BB)

* **PBS/TWEEN 20** - 500 µl de Tween 20 dans 1l de PBS, agiter (Sigma P 1379)

Substrat de Peroxydase = Pour 3 plaques :

* 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide

* 30 ml de Tampon citrate

* 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30% , ou 6 µl à 20%).

Tampon Citrate pH4

- préparer le Tampon Citrate pH4 : Pour 1 litre :

Acide citrique, 1 H₂O 11,77 g

Hydroxyde de Sodium 4,48 g

Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution. Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N. Compléter à 1 l avec de l'eau bidistillée.

RECONSTITUTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX LYOPHILISES (ACm)

* milieu reconstitution = 1/2 volume H₂O + 1/2 volume Glycérol (Sigma G.9012)

- 1,0 mg ACm + 2 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

- 0,5 mg ACm + 1 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

- 0,25 mg ACm + 0,5 ml milieu reconstitution (soit 500 µg / ml)

QUANTITE D'ACM NECESSAIRE :

- Sensibilisation : ACM capture dans du **PBS**

DILUTIONS RECOMMANDEES PAR WIRTZ :

P. falôiparum 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. falôiparum : 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 PBS
p. ovale 15 µl/5 ml BB

ml BB Les ACm sont fournis par le Dr WIRTZ, CDC Atlanta

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

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</i> 210	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</i> 247	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

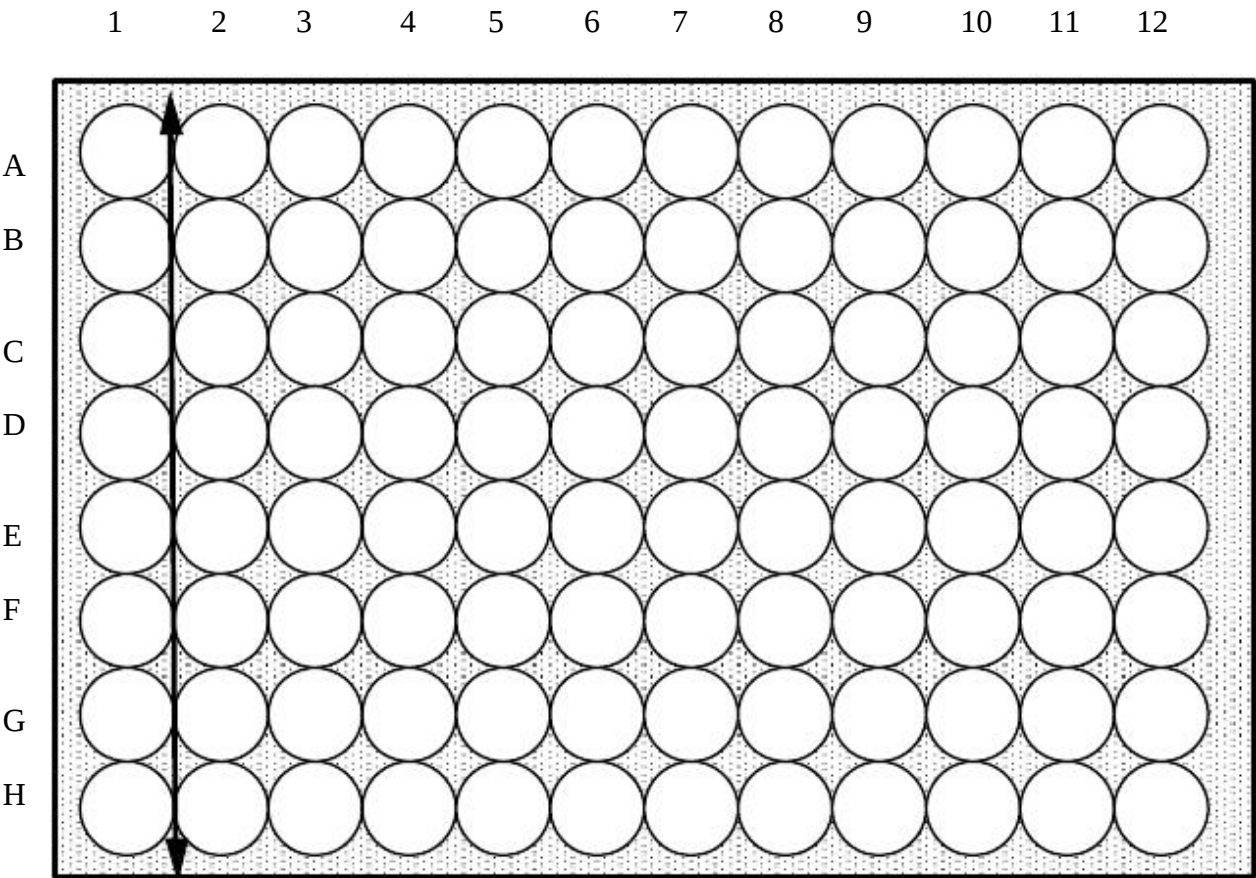
PM : NAAG au 1/8000 déjà dilué

Opérateurs ELISA : SIDICK, A. ; OSSE, R. ; KOUDENOUKPO, S. et CHANDRE, F.

ELISA Circumsporozoite Protein (CSP)

N° plaque : Espèce : Date de captures :

Origine des moustiques : Saisie dans la base de données et contrôlé le :



CONDITIONS: SCREEN OU Pf / Pv 210 / Pv 247 / Pm / Po

Moustiques broyés lepar



International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906
CODEN: IJMRK2
IJMR 2017; 4(3): 107-112
© 2017 IJMR
Received: 15-03-2017
Accepted: 16-04-2017

Rock Aikpon

1) Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin
2) Université Nationale des
Sciences, Technologies, Ingénierie
et Mathématiques d'Abomey,
(UNSTIM), Bénin

Razacki Ossè

1) Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin
2) Université Nationale
d'Agriculture de Porto-Novo,
Bénin

Gil Padonou

1) Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin
2) Faculté des Sciences et
Techniques, Université d'Abomey
Calavi (UAC), Bénin

Rock Aikpon

Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin

Rock Aikpon

Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin

Rock Aikpon

Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin

Rock Aikpon

1) Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin
2) Faculté des Sciences et
Techniques, Université d'Abomey
Calavi (UAC), Bénin

Correspondence

Rock Aikpon

1) Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), Bénin
2) Université Nationale des
Sciences, Technologies, Ingénierie
et Mathématiques d'Abomey,
(UNSTIM), Bénin

Involvement of both *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in the perennial malaria transmission through a seasonal abundance in savannah area in Benin

Rock Aikpon, Razacki Ossè, Gil Padonou, Rodrigue Anagonou, **Albert Salako**, Idelphonse Ahogni and Martin Akogbéto

Abstract

The involvement of *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* in malaria transmission was investigated in Savannah area in Benin. This study shows the trends in malaria vectors dynamics and their part of contribution in malaria transmission.

Female mosquitoes were collected, using human landing catches. All the anopheline mosquitoes were assessed for species identify and sporozoite infection status.

Most of the anopheline mosquitoes collected were members of the *An. gambiae* complex (80.90%) and *An. funestus* group (14.36%). *An. gambiae* and *An. coluzzii* were found in sympatry. All of the females of the *An. funestus* group investigated were identified as *An. funestus* s.s. In spite of being the major malaria vector as far as abundance is concerned, sporozoite prevalence was three times higher with *An. funestus* than *An. gambiae*.

This study provides useful informations on the relative contribution of malaria vectors to the perennial malaria transmission in the study area.

Keywords: Perennial malaria transmission, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, contribution

Introduction

Malaria transmission is sustained through vector interaction ^[1] and the current effective vector control tools include the use of Long Lasting Insecticide Nets (LLIN) and Indoor Residual Spraying (IRS) ^[2]. Although malaria can be severely limited, if not eliminated, by effective vector, the implementation of any successful vector-control measures requires knowledge of the biology of the anopheline species present in the area to be targeted.

The malaria vectorial system in tropical Africa is dominated by four species of major importance, *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*, which are broadly codistributed across much of tropical Africa in close association with humans ^[3, 4]. *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis* belong to the same cryptic species complex (the *An. gambiae* complex) whose members cannot be distinguished morphologically at any developmental stage, although they differ in aquatic larval ecology and adult behaviours relevant to malaria transmission and control (e.g., degree of anthropophily and tendency to blood-feed or rest indoors) ^[5, 6]. *Anopheles funestus* and its presently recognized closest relatives are classified into a group and subgroup ^[7, 8] rather than a species complex, owing to slight morphological distinctions mainly at immature stages.

Although *Anopheles gambiae* Giles complex and *Anopheles funestus* Giles are the primary malaria vectors in sub-saharan Africa, *Anopheles gambiae* s.l. is often regarded as the most important vector species across Africa ^[9-11] and, because of its almost entirely anthropophilic and endophilic behaviour, it is the species that has been targeted most effectively by LLINs. Nevertheless, *Anopheles funestus* is also a very anthropophilic and endophilic mosquito and it too can be a highly efficient malaria vector ^[4, 11, 12]. However, despite its obvious importance as vector, *An. funestus* s.l. has been sadly neglected compared to *An. gambiae* s.l. Undoubtedly, this has been due to the adaptability of the *An. gambiae* complex to laboratory conditions and the ease with which species in the group be colonized.

~ 107 ~

RESEARCH

Open Access



Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora[®] Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin, West Africa

Fiacre R. Agossa^{1*}, Gil G. Padonou^{1,2}, Arsene Jacques Y. H. Fassinou^{1,3}, Esdras M. Odjo¹, Osei K. Akuoko⁴, Albert Salako^{1,3}, Zinsou C. Koukpo^{1,3}, Udoka C. Nwangwu⁵, Bruno Akinro¹, Michel Sezonlin^{1,2} and Martin C. Akogbeto^{1,2}

Abstract

Background: In recognition of the threat of insecticide resistance in vectors of malaria, the WHO Global Malaria Programme recommends the development of an appropriate and comprehensive response to insecticide resistance. In principle, good resistance management practice requires the application of multiple insecticides of different modes of action, for example, in rotations and mixtures. Insecticides recommended by the World Health Organization for indoor residual spraying and long-lasting insecticide nets are limited. It is, therefore, judicious to prevent the rapid spread of insecticide resistance by evaluating new insecticides formulations with different modes of action and long residual effect.

Methods: Fludora[®] Fusion, a new neonicotinoid IRS formulation (a mixture of 500 g/kg clothianidin and 62.5 g/kg deltamethrin applied 200 mg ai/sqm + 25 mg ai/sqm, respectively) was tested. Small scale field evaluation of this product was conducted in the district of Dangbo in Benin, to compare its efficacy and residual effect on cement and mud walls against those of clothianidin 200 mg ai/sqm (WG 70) alone, and of deltamethrin 25 mg ai/sqm (WG 250) alone. WHO wall cone bioassays were conducted monthly with laboratory susceptible *Anopheles* "Kisumu" and wild *Anopheles gambiae* sensu stricto (s.s.) population from Dangbo. The induced mortality by each treatment per wall substrate for 24 h, 48 h, and 72 h post exposure were recorded every month and analysed.

Results: Fludora[®] Fusion and clothianidin WG 70 showed mortality rates over 80% WHO bio-efficacy threshold on cement walls either with susceptible or resistant *An. gambiae* s.s. over a period of 10 and 9 months, respectively. Treatment with Fludora[®] Fusion and clothianidin WG 70 on the mud walls showed residual effect for 6 months and 5 months respectively against both susceptible and resistant mosquitoes. During the whole evaluation period, deltamethrin WG 250 showed mortality rates below 80% against resistant *Anopheles* population. Furthermore, the knock down rates observed with the Fludora[®] Fusion combination were significantly higher ($p < 5\%$) than those induced by Clothianidin WG 70.

*Correspondence: rofargossa@yahoo.fr

¹ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC),
06BP2604 Cotonou, Bénin

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



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906
CODEN: IJMRK2
IJMR 2019; 6(2): 05-10
© 2019 IJMR
Received: 02-01-2019
Accepted: 06-02-2019

Rock Aïkpon

(1). Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou (CREC),
06 BP 2604 Cotonou, Bénin
(2). Ecole normale Supérieure de
Natitingou, UNSTIM, Bénin

Albert Salako

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

Razaki Ossè

(1). Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou (CREC),
06 BP 2604 Cotonou, Bénin
(2). Université Nationale
d'Agriculture, Bénin

Gorgias Aïkpon

Faculté des Sciences Agronomiques,
Université d'Abomey-Calavi, Bénin

Bruno Akinro

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

Aboukar Sidick

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

Wilfrid Sèwadé

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

Martin Akogbèto

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

Correspondence

Rock Aïkpon

(1). Centre de Recherche
Entomologique de Cotonou
(CREC), 06 BP 2604 Cotonou,
Bénin
(2). Ecole normale Supérieure de
Natitingou, UNSTIM, Bénin

The spread of malaria in savannah area in Benin: The contribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in the transmission

Rock Aïkpon, Albert Salako, Razaki Ossè, Gorgias Aïkpon, Bruno
Akinro, Aboukar Sidick, Wilfrid Sèwadé and Martin Akogbèto

Abstract

The role of the *Anopheles complex* and *Anopheles funestus* Giles in the malaria transmission was investigated in a Savannah area in Benin. This study shows the part of their contribution in malaria transmission in the study area. Mosquitoes were collected, using human landing catches. All the anopheline mosquitoes were assessed for species identify and sporozoite infection status. Most of the anopheline mosquitoes collected were members of the *An. gambiae* complex (80.90%) and *An. funestus* group (14.36%). *An. gambiae* and *An. coluzzii* were found in sympatry. All of the females of the *An. funestus* group investigated were identified as *An. funestus s.s.* In spite of being the major malaria vector as far as abundance is concerned, sporozoite prevalence was three times higher with *An. funestus* than *An. gambiae*. This study documented useful informations on the relative contribution of malaria vectors to the perennial malaria transmission in the study area.

Keywords: Malaria, spread, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*

Introduction

Malaria transmission is sustained through vector interaction ^[1] and the current effective vector control tools include the use of Long Lasting Insecticide Nets (LLIN) and Indoor Residual Spraying (IRS) ^[2]. Although malaria can be severely limited, if not eliminated, by effective vector, the implementation of any successful vector-control measures requires knowledge of the biology of the anopheline species present in the area to be targeted.

There are four major species of malaria vectors in tropical Africa that *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*, which live in close association with humans ^[3, 4]. *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis* belong to the same cryptic species complex (the *An. gambiae* complex) whose show no morphological difference despite the fact that they do not share the same larval ecology ^[5,6]. *Anopheles funestus* and its presently recognized closest relatives are classified into a group and subgroup ^[7, 8] rather than a species complex, owing to slight morphological distinctions mainly at immature stages.

Although *Anopheles gambiae* Giles complex and *Anopheles funestus* Giles are the primary malaria vectors in sub-saharan Africa, *Anopheles gambiae* s.l is often regarded as the most important vector species across Africa ^[9-11] and, because of its almost entirely anthropophilic and endophilic behaviour, it is the species that has been targeted most effectively by LLINs. Nevertheless, *Anopheles funestus* is also a very anthropophilic and endophilic mosquito and it too can be a highly efficient malaria vector ^[4, 11, 12]. However, despite its obvious importance as vector, *An funestus* s.l has been sadly neglected compared to *An. gambiae* s.l. Undoubtedly, this has been due to the adaptability of the *An. gambiae* complex to laboratory conditions and the ease with which species in the group be colonized.

The present study aims to investigate the contribution of *Anopheles gambiae* and *An. funestus* mosquitoes to malaria transmission in Copargo district in a savannah area in Benin.

RESEARCH

Open Access



Lessons learned, challenges and outlooks for decision-making after a decade of experience monitoring the impact of indoor residual spraying in Benin, West Africa

Martin C. Akogbéto^{1,2}, Fortuné Dagnon³, Rock Aikpon^{1,4}, Razaki Ossé^{1,5}, Albert S. Salako^{1,2*}, Idelphonse Ahogni^{1,2}, Bruno Akinro¹, André Sominahouin^{1,6}, Aboubakar Sidick¹, Filémon Tokponnon⁷ and Germain G. Padonou^{1,2}

Abstract

Background: Since 2008, Indoor Residual Spraying (IRS) has been performed in Benin in 19 districts, including 4 in southern Benin, 9 in Atacora, and 8 in Atacora, Alibori and Donga in northern Benin. However, Benin still struggles with questions about IRS cost–benefit and epidemiological impact. Lessons learned and challenges from 10 years of IRS in Benin to be shared with the stakeholders involved in vector control implementation for decision-making.

Methods: Entomological parameters have been assessed entomological parameters in IRS communes since 2008. In all IRS intervention communes, decreases in human biting rate (HBR) of *Anopheles gambiae*, blood feeding inhibition and entomological inoculation rate (EIR) as compared to control district have been measured.

Results: EIR was reduced by 80–90%, which is encouraging, but should be observed with caution because: (i) the reduction may be insufficient to decrease epidemiological indicators given that the residual EIR in IRS districts is still higher than it is in some regions of stable malaria; (ii) the reduction in EIR is based on comparisons with control communes, but it is difficult to select control areas with the same environmental characteristics as intervention areas; (iii) despite the reduction, half of all mosquitoes that entered IRS-treated houses succeeded in taking human blood meals. Further, there are behaviours among Benin's population that limit IRS efficacy, including recent data showing that > 90% of people are not protected by IRS between 7 and 10 p.m. This is due to the fact that they remain outdoors and that most people are not protected from mosquito bites after 10 p.m. because they either sleep outdoors without IRS protection or indoors without an ITN. Moreover, people have large amounts of clothing hanging on walls where mosquitoes can rest instead of IRS-treated walls. Finally, other components are important to consider in implementing IRS among which: (i) Vector resistance management strategies are sometimes poorly understood; this is actually different from the need to replace one insecticide with another after the emergence of resistance; (ii) African countries should prepare to finance IRS themselves.

Conclusion: To curtail residual malaria transmission, additional interventions able to target vectors escaping IRS should be prioritized.

*Correspondence: albertsourousalako@yahoo.fr

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

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



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

RESEARCH

Open Access



Physical integrity and survivorship of long-lasting insecticidal nets distributed to households of the same socio-cultural community in Benin, West Africa

Idelphonse B. Ahogni^{1,2*}, Albert S. Salako^{1,2}, Bruno Akinro^{1,3}, Arthur Sovi⁴, Virgile Gnanguenon⁵, Roseric Azondekon^{1,6}, Jean F. Dagnon⁷, Pamela Akogbeto¹, Filémon Tokponon⁸ and Martin C. Akogbeto¹

Abstract

Background: Long-lasting insecticidal nets (LLINs) are designed to survive and sustain their physical barrier for 3 years in household conditions. However, studies have shown that most of these nets are usually torn or no longer present in the households in less than 3 years. This study was initiated in Benin to compare the survivorship and physical integrity of seven types of LLINs in a same socio-geographic area.

Methods: In August 2017, 1890 households were selected in 9 villages in the municipality of Zagnanado in central Benin. Each one of the selected households received one of the seven LLIN products: Aspirational[®], DawaPlus[®] 2.0, OlysetNet[®], PermaNet[®] 2.0, PermaNet[®] 3.0, Royal Sentry[®] and Yorkool[®]. Overall, 270 LLINs of each type were freely distributed in Zagnanado, at a rate of 30 LLINs per type per village. These bed nets have been monitored and evaluated every 6 months to identify the most resilient and preferred LLINs in the community. Net survivorship was assessed using the rate of net loss and physical condition.

Results: The survivorship of all types of LLIN was estimated at 92% (95% CI 90.33–92.96) after 6 months and 70% (95% CI 67.25–71.81) after a year of use. At 12 months, all bed nets monitored were below the NetCalc model threshold of 92.8% for an LLIN with a lifespan of 3 years. Only 1.73% of all types of LLIN had a visible loss of integrity after 6 months with a median proportionate hole index (PHI) estimated at zero. The percentage significantly increased after 12 months with 10.41% of damaged nets (all types of LLINs). The median PHI for each brand of net was 23, 196, 141, 23, 23, 121 and 72, respectively for Aspirational[®], DawaPlus[®] 2.0, OlysetNet[®], PermaNet[®] 2.0, PermaNet[®] 3.0, Royal Sentry[®] and Yorkool[®]. A significant difference was noted between the PHI at 6 and 12 months ($p < 0.0001$). After 12 months, the DawaPlus[®] 2.0, OlysetNet[®] and Royal Sentry[®] suffered significantly more damage compared to the others ($p < 0.001$).

Conclusion: The results of this study showed that after a year of use, the survivorship of the 7 LLIN products in households was lower than expected. However, all the LLIN products successfully met WHO standards for physical integrity after 12 months of use. The monitoring continues. The next steps will help to identify the most sustainable LLINs.

Keywords: LLINs, Survivorship, Physical integrity, Malaria, Benin

*Correspondence: idelphonseab2016@gmail.com

¹ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Ministry of Health, Cotonou, Benin

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



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

RESEARCH

Open Access



Entomological assessment of the risk of dengue outbreak in Abomey-Calavi Commune, Benin

Germain Gil Padonou^{1,7}, Razaki Ossè^{1,2}, Albert Sourou Salako^{1,3*}, Rock Aikpon^{1,4}, Arthur Sovi^{1,5,6}, Casimir Kpanou^{1,3}, Hermann Sagbohan^{1,3}, Yessoufou Akadiri³, Baba-Moussa Lamine⁷ and Martin C. Akogbeto¹

Abstract

Background: In May 2019, a confirmed dengue fever case was detected at the local hospital of Abomey-Calavi Commune in southern Benin. In Benin, there remains a dearth of literature concerning the distribution and biology of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue fever. This study was initiated by the Ministry of Health to partially fill this gap. The findings allowed us to assess the arboviral transmission risk incurred by the population of Abomey-Calavi to support programmatic decision-making.

Methods: Entomological assessments were conducted in 5% of the houses, meaning 314 houses selected from 11 boroughs in Abomey-Calavi Centre district and 9 villages in Hèvié district. The surveyed breeding sites were water containers located in (domestic) and around (peri-domestic) the dwellings. When a container was positive (housing larvae), a portion of the immature population was sampled with a larval dipper and poured into labeled jars. Immatures were then reared to adulthood at the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) insectary. Adult mosquitoes were morphologically identified to species level by site and, a subsample of the collected *Ae. aegypti* mosquitoes were used for WHO susceptibility tube tests.

Results: Of the 1372 adult *Aedes* specimens which emerged from the collected larvae and pupae, 1356 *Ae. aegypti* (98.83%), 10 *Ae. luteocephalus*, and 4 *Ae. vittatus* were identified. The Breteau indices were 160.2 in Abomey-Calavi Centre and 150 in Hèvié, whereas the House indices were 58.5% and 61.6% in the respective districts. WHO insecticide susceptibility tube tests showed that the mortality rates were 38.71% in Abomey-Calavi Centre and 85.71% in Hèvié for permethrin, and 72.22% in Abomey-Calavi Centre and 100% in Hèvié for deltamethrin.

Conclusion: The two districts were highly infested by *Ae. aegypti* whose breeding sites were mostly man-made. Considering this, human behavioral change to substantially reduce the number of larval habitats is necessary to control the vector populations. As *Aedes* mosquitoes are day biters, the use of repellents such as ointments and smoke coils can also be useful.

Keywords: Transmission risk, *Ae. aegypti*, Arbovirus, Abomey-Calavi Commune

* Correspondence: albertsourousalako@yahoo.fr

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

³Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin

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



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

RESEARCH

Open Access



Resistance status of *Anopheles gambiae* s.l. to insecticides following the 2011 mass distribution campaign of long-lasting insecticidal nets (LLINs) in the Plateau Department, south-eastern Benin

Arthur Sovi^{1,2,3*}, Renaud Govoétchan^{1,2}, Razaki Ossé^{1,4}, Come Z. Koukpo^{1,5}, Albert S. Salako^{1,5}, Thomas Syme^{1,3}, Rodrigue Anagonou¹, Augustin Fongnikin^{1,5}, Udoka C. Nwangwu⁶, Frédéric Oké-Agbo^{1,7}, Filémon Tokponnon⁸, Gil Germain Padonou^{1,5} and Martin Codjo Akogbeto¹

Abstract

Background: In 2011, Benin's National Malaria Control Programme (NMCP) organized a nationwide mass distribution campaign of LLINs throughout the country. Following this intervention, it was important to assess whether the level of susceptibility of malaria vectors to insecticides had remained the same as compared to the pre-intervention period. The current study investigated this.

Methods: Larval collections were conducted in Ifangni, Sakété, Pobè and Kétou districts located in Plateau department, Southeastern Benin before (2009) and after (2012–2013) LLIN distribution. *Anopheles gambiae* sensu lato (s.l.) larvae from the 4 study districts were reared to adulthood and WHO susceptibility tests were conducted. The insecticides tested were deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), bendiocarb (0.1%) and DDT (4%). Molecular species identification as well as, the characterization of the *kdr* L1014F mutation were also performed in the *An. gambiae* s.l. complex using PCR method.

Results: Overall, a significant decrease in mortality rates of *An. gambiae* s.l. to deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%) and DDT (4%) was observed post-LLIN distribution, respectively: (100% vs 80.9%, $p < 0.0001$), (77.5% vs 70%, $p = 0.01$) and, (47.8% vs 4.4%, $p < 0.0001$). By contrast, susceptibility of vectors to bendiocarb (0.1%) remained the same (100% mortality in the WHO susceptibility tube tests) pre- and post-intervention. An increase in the *kdr* L1014F frequency was observed post-LLIN distribution [$F(kdr) = 0.91$] compared to the pre-intervention period [$F(kdr) = 0.56$], $p < 0.0001$. *Anopheles coluzzii* and *An. gambiae* were the two molecular species identified in the study area.

Conclusion: The decrease susceptibility to pyrethroids and DDT as well as, the increase in the frequency of the *kdr* L1014F mutation after the intervention stressed at the time, the need for the development and implementation of effective insecticide resistance management strategies. At present, an update of the vectors resistance status in the area is also necessary for decision-making.

*Correspondence: sart52005@yahoo.fr

¹ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Ministère de la Santé, 06BP2604, Cotonou, Bénin

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



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.