



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-----

Formation Doctorale en Biologie Animale

-----000-----

Laboratoire de Biologie et de Typage moléculaire en Microbiologie

THESE

N° 401

Présentée par :

ZOUNGBEDJI Mahouton David

.....

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

Spécialité : Entomologie Médicale

THEME :

**Evaluation de l'efficacité des insecticides de nouvelle
génération sur les populations de *Anopheles gambiae*
s.l. porteuses des mutations *L1014F* et *G119S* au Bénin**

Soutenue publiquement le 04/10/2023 devant le Jury composé de :

- Président :** Lamine Said BABA MOUSSA, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.
- Rapporteur :** Kounbobr Roch DABIRE, Directeur de Recherche en Entomologie, Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Burkina Faso.
- Rapporteur :** Mawlouth DIALLO, Directeur de Recherche en Entomologie médicale, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal.
- Rapporteur :** Rock Yves AIKPON, Maître de Conférences des Universités, Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques, Bénin.
- Examineur :** Edmond SOSSOUKPE, Professeur Titulaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.
- Directeur :** Germain Gil PADONOU, Maître de Conférences des Universités, Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Année Académique : 2022 - 2023

Dédicace

*A mon Feu Père
ZOUNGBEDJI Zin Maxime,
Parti trop tôt mais qui a su me donner l'essentiel...*

Remerciements

Je voudrais avant tout rendre grâce à Dieu pour cette belle aventure pleine de défis et de rebondissements au cours de laquelle il a été présent du début et continue de l'être jusqu'aujourd'hui. Merci Seigneur pour toutes les opportunités et pour tous les miracles accomplis dans ma vie.

Ce travail ne serait possible sans l'appui et le soutien des institutions suivantes :

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), le Laboratoire de Biologie et de Typage moléculaire en Microbiologie de l'Université d'Abomey-Calavi (LBTM/UAC) 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.

Je voudrais adresser en premier mes sincères remerciements à l'endroit de mon Directeur de thèse, le Docteur (MC) Germain Gil PADONOU, Enseignant-Chercheur au Département de Zoologie de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST) et au Laboratoire de Biologie et de Typage moléculaire en Microbiologie de l'Université d'Abomey-Calavi, Directeur du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) qui m'a ouvert les portes de la recherche et qui a été pour moi un guide et un soutien constant tout au long de cette aventure. Je vous ai connu dans le cadre de mon Master et vous m'avez accueilli tel comme un père. Vous avez été toujours là dans les moments difficiles comme dans les moments de joie. Votre soutien moral et financier, votre rigueur scientifique et votre engagement dans la recherche face aux défis de notre ère en ce qui concerne les maladies à transmission vectorielle nous ont positivement impacté et ont été pour nous un levier sur lequel nous prenons appui tous les jours. Je me réserve le droit de ne pas aller trop en détail au risque de consacrer cette partie uniquement à vous décrire. Cher maitre, vous avez très tôt mis à notre disposition tout ce qu'il fallait pour faire de nous des chercheurs complets et les travaux que nous avons réalisés en si peu de temps en sont le véritable témoignage. Recevez ici l'expression de toute notre gratitude. Nous vous en saurons infiniment gré.

Mes remerciements vont également à l'endroit d'une grande figure de la lutte anti vectorielle au Bénin et en Afrique. Le Professeur Martin AKOGBETO, Directeur Honoraire du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, membre de l'académie des Arts, Lettres et Sciences. Maître de mon Directeur de thèse vous aviez été. C'est une fierté pour moi d'être

le disciple de l'un de vos disciples. Quand Ce dernier me présentait à vous en 2018, votre calme et votre simplicité faisaient ombrage à votre densité. C'est la marque des grands hommes, la marque de la sagesse. Je l'ai compris après en travaillant aussi à vos côtés. Votre écoute attentive est l'un de vos caractères qui vous distingue et dont nous avons été les plus bénéficiaires. Merci cher Papa, nous prions Dieu de vous accorder une très longue vie pour vos œuvres déjà accomplies et pour celles à venir.

Mes remerciements vont également à l'endroit des membres de jury qui malgré leurs diverses occupations se sont rendus disponible pour l'évaluation du présent travail.

J'adresse ma profonde considération et mes admirations à l'endroit du Professeur Lamine Said BABA-MOUSSA, Directeur du Laboratoire de Biologie et de Typage moléculaire en Microbiologie, Directeur de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie de l'UAC qui a présidé ce jury. Cher Professeur, recevez nos sincères remerciements pour votre disponibilité, vos conseils, votre accompagnement tout au long de ce processus de thèse.

Je voudrais dire infiniment merci au Professeur Kounbobr Roch DABIRE, au Professeur Mawlouth DIALLO et au Docteur (MC) Rock Yves AIKPON pour le fait qu'en dépit de leurs occupations et responsabilités plurielles, ils aient accepté d'être pré-rapporteurs de cette thèse et de siéger dans le jury de soutenance.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements au Professeur Edmond SOSSOUKPE pour avoir accepté évalué cette thèse en de siégeant dans ce jury en qualité d'examineur. Cher Professeur, vos différents apports ont contribué considérablement à l'amélioration de la qualité scientifique du présent travail.

Au Professeur Nicodème CHABI, recevez également mes sincères remerciements pour votre disponibilité toutes les fois que nous avons eu besoin de vous. Vos différentes corrections, apports et suggestions ont donné une touche toute particulière à ce document de thèse. Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.

Au Docteur (MC) Aziz SINAN du Laboratoire de Biologie et de Typage moléculaire en Microbiologie, Chef département de la formation Biochimie, Biologie Moléculaire et Application (BBMA) de l'UAC, recevez également nos sincères remerciements pour vos apports, vos conseils et vos différentes orientations.

Nos remerciements vont aussi à l'endroit du Docteur (MC) Razaki OSSE, Enseignant Chercheur à l'Université Nationale d'Agriculture (UNA) de Kétou, Responsable du laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du Centre de Recherche Entomologique

de Cotonou. Merci cher Docteur pour votre soutien, vos conseils et votre accompagnement au cours de l'analyse de nos données au laboratoire.

Je dis grand merci au Docteur Albert SALAKO et au Docteur (MC) Arthur SOVI pour leurs contributions intellectuelles et scientifiques à la rédaction de nos manuscrits et de notre document de thèse. Chers Docteurs, vos critiques sincères, vos commentaires et différents apports ont été d'une utilité sans pareille. Recevez ici l'expression de ma plus grande reconnaissance.

J'exprime mes profondes gratitude à l'endroit des Docteurs Daniel Impoinvil, Ahmed Saadani Hassani, Virgile Gnanguenon, Raoul Oloukoi et Patrick Condo nos collaborateurs de l'USAID qui se sont rendus disponibles pour nous malgré leurs occupations tout au long de cette aventure et dont la franche collaboration a été favorable à l'avancement de nos différentes activités.

A mon collaborateur le plus proche, cher Alphonse Keller KONKON. Grand merci pour les moments passés ensemble et pour la sincérité de nos collaborations depuis le master jusqu'aujourd'hui. Plus qu'un ami tu as été pour moi un véritable frère. C'est le moment pour moi de te le faire savoir.

A mes camarades Doctorants au CREC : Esdras Mahoutin Odjo, Serge Akpodji, Constantin Adoha et Boulais Yovogan, vos collaborations et nos différentes discussions ont été précieuses pour moi. C'est le lieu de vous dire merci chers amis pour tout.

A mes chers amis Steve Hougbe, Bruno Adjottin, David Houssou Andil Agbo-ola, Pierre Ananou avec qui j'ai réalisé la majorité de mes activités de terrain et de laboratoire, recevez ici mes remerciements signe de reconnaissance pour tous les efforts fournis dans l'accomplissement des différentes tâches qui nous ont été assignées.

A Mr Sidick Aboubakar, Juvénal Ahouandjinou, Linda Towakinou sans qui les analyses Moléculaires et Biochimiques ne seraient possibles et à Mr Bruno Akinro, Saïd Chitou qui ont été beaucoup sollicités pour les analyses statistiques de nos données, recevez chers tous l'expression de ma profonde gratitude pour toutes les tâches accomplies sans faille.

Aux Docteurs André Sominahouin, Casimir Kpanou, Hermann SAGBOHAN, Arsène Fassinou, Zinsou Come Koukpo, Ludovic N'tcha, Kefilath Badirou, Prudencienne Agboho et à Mr Olivier Oussou, je voudrais vous dire merci du fond du cœur pour le soutien et pour tous les conseils prodigués.

Mes remerciements vont également à l'endroit du service administratif et financier du CREC. Je voudrais nommer Messieurs Safiou Idrissou, Jenifer Dossou-yovo, Clémence Durand, Balbine Kindji, Marcelle Gandonou, Janelle Alohou, Arielle Atigli, Axelle Hounsou, Ikililou Congo, Kifayath Soumanou, Sébastien Koudenoukpo, Moustapha Idrissou, Richard Houssou, Faizil Kifouly, Guy Agbangla et Pascal Kpinkponsouhou pour leur sympathie et leurs différentes aides dont j'ai bénéficié au cours de la réalisation de mes différentes activités.

Je rends un vibrant hommage aux autorités politico-administratives et les populations des différentes localités que j'ai parcourues pour m'avoir rendu la tâche très facile au cours de la collecte de mes données sur le terrain.

A ma famille biologique, ma mère A. Lydia Bogninou et mon feu père Maxime Zin Zoungbedji, je n'ai pas de mots pour vous exprimer mes sincères reconnaissances pour tous les sacrifices consentis dans mon éducation. Un adage africain dit : je cite « Les parents trouvent la récompense de leur sacrifice dans la réussite de leur progéniture ». Chers parents veuillez trouver en cette thèse le début des fruits de tous les efforts investis dans mon éducation.

A mon oncle maternel Jules Bogninou qui m'a soutenu dans mon désir de poursuivre les études supérieures malgré les conditions difficiles. Votre soutien financier et vos conseils ont été très précieux pour moi au début de cette aventure. La concrétisation de cette aventure est un signe que vos efforts n'ont pas été vains. Merci pour votre disponibilité.

A mes frères et sœurs, Nathalie, Emmanuelle, Adrien, Adèle, Justine, Pascaline, Orens et jeshurun, ensemble nous avons relevé des défis. Un nouveau défi relevé est celui de cette thèse. Vous avez été témoin de prêt comme de loin de l'engagement, de l'abnégation, du courage et des sacrifices qui ont conduit à la concrétisation de ce projet. Que ces valeurs soient pour vous un levier de motivation et ne vous quittent à jamais. Faites-en votre boussole dans toutes vos entreprises.

A ma chère épouse Oke Témi Tokpè Adéfounkè, mes fils adorables Yanis et Jékhiel qui ont fait montre de compréhension pour mes absences répétées, je voudrais vous témoigner tout mon amour. Vous êtes la source de mes motivations et la raison de ma détermination.

Un grand merci à tous ceux ou celles qui de près ou de loin ont soutenu ce travail d'une manière ou d'une autre, veuillez trouver en ces quelques lignes nos mots de

remerciements signe de reconnaissance pour tous vos efforts. Puisse le tout puissant vous le rendre au centuple.

Sommaire

Dédicace.....	i
Remerciements	ii
Sommaire	vii
Résumé	ix
Abstract.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Introduction générale.....	1
Introduction générale.....	2
Partie 1 : Synthèse bibliographique.....	7
1. Synthèse bibliographique :	8
Partie 2 : Cadre, Matériels et Méthodes	33
2. Cadre d'étude	34
3. Matériels et Méthodes.....	40
3.5. Paramètres mesurés et analyses statistiques.....	48
3.6. Considérations éthiques.....	51
Partie 3 : Résultats et Discussion	52
Chapitre 1 : Caractérisation de la résistance des populations de <i>An. gambiae</i> s.l. aux pyréthrinoïdes.....	53
Statut de résistance des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. à l'alpha-cyperméthrine, la perméthrine et à la deltaméthrine, mutations <i>Kdr</i> et <i>Ace-1R</i>	54
Chapitre 2 : Sensibilité des populations résistantes de <i>An. gambiae</i> s.l. au chlorfénapyr et à la clothianidine.....	65
Evaluation de la sensibilité des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. au chlorfénapyr et à la clothianidine.....	66
Chapitre 3 : Impact du pyriproxifène sur la reproduction des populations de <i>An. gambiae</i> s.l.	71

Impact du pyriproxyfene sur la reproduction des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	72
Chapitre 4 : Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle generation sur diverses populations de <i>An. gambiae</i> s.l.	78
Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle generation sur diverses populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	79
Chapitre 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives	89
Discussion générale	90
Conclusion générale et perspectives	97
Références bibliographiques	100
Annexes	I

Résumé

La plupart des insecticides utilisés dans la lutte anti vectorielle sont neurotoxiques. Les pyréthrinoides représentent la classe la plus impliquée. Cependant, la forte résistance des vecteurs du paludisme à ces pyréthrinoides complique sérieusement les stratégies de lutte basées sur l'utilisation des Moustiquaires imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'action (MIILD) et la Pulvérisation Intra Domiciliaire (PID). Ce phénomène est très répandu en Afrique, et plus particulièrement au Bénin. Une situation due à une microévolution des populations de moustiques suite à la forte pression insecticide exercée sur ces dernières aussi bien qu'en santé publique qu'en agriculture. Cela constitue un véritable frein au contrôle du paludisme. Pour continuer à prévenir cette maladie meurtrière, il est urgent de trouver d'autres molécules ayant de différents modes d'action afin de contourner les différents mécanismes de résistance mis en exergue par ces moustiques. En 2017, le choix de l'OMS a porté sur de nouveaux insecticides candidats dont le chlorfénapyr, la clothianidine et le pyriproxyfène. Ainsi, des populations de *An. gambiae* s.l. récoltées sur le transect Sud-Nord Bénin (Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-Novo, Allada, Lokossa, Bohicon, Djidja, Glazoué, Bassila, Djougou, Gogounou, Banikoara et Malanville) ont été utilisées pour d'une part caractériser la résistance aux pyréthrinoides ; d'autre part évaluer la sensibilité des populations résistantes de *An. gambiae* s.l. aux nouveaux insecticides et enfin évaluer la bio efficacité des moustiquaires contenant ces nouveaux produits. Toutes les populations de *An. gambiae* s.l. ont montré une forte résistance aux pyréthrinoides avec une forte fréquence de la mutation Kdr : 84% (95% IC :81-87) chez *An. coluzzii*, 88% (95% IC : 85-91) chez *An. gambiae* s.s. et 75% (95% IC :35-97) chez *An. arabiensis*, accompagnée d'une surproduction d'enzymes de détoxification. Cependant, une parfaite sensibilité a été observée avec la clothianidine et le chlorfénapyr (mortalité >98%) avec une forte réduction de la fécondité et de la fertilité induite par le pyriproxyfène chez les femelles de *An. gambiae* s.l. Par ailleurs, les taux de mortalité des souches sauvages de *An. gambiae* s.l. sont significativement élevés avec Interceptor® G2, Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 et Royal Guard® par rapport aux MIILD standards Interceptor®. Ces résultats suggèrent que ces nouveaux insecticides pourraient être utilisés comme alternatif dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs au Bénin. Bien que l'on ait une idée sur les mécanismes impliqués dans la résistance des vecteurs aux insecticides, la forte intensité de ce phénomène chez *An. gambiae* s.l. nous amène à soupçonner l'implication d'autres mécanismes qui méritent d'être recherchés.

Mots clés : Paludisme, *An. gambiae* s.l., résistance, Insecticides de nouvelle génération, MIILD, Bénin.

Abstract

Most insecticides used in vector control are neurotoxic. Pyrethroids are the class most commonly used. However, the high resistance of malaria vectors to this insecticide seriously undermines the effectiveness of control strategies such as the use of Long-Acting Insecticide-Treated Nets (LLINs) and Intra-Domestic Spraying (IDS). This phenomenon is widespread in Africa, particularly in Benin. This situation is due to the microevolution of mosquito populations as a result of the high insecticide pressure exerted on them in both public health and agriculture. This is a real brake on malaria control. To prevent the disease and protect populations from mosquito bites, it is urgent to find other molecules with different modes of action to pyrethroids, in order to circumvent the various resistance mechanisms highlighted by these mosquitoes. In 2017, World Health Organization (WHO) selects new candidate insecticides including chlorfenapyr, clothianidin and pyriproxyfen. Thus, populations of *An. gambiae* s.l. collected on the South-North Benin transect (Ifangni, Akpro-Misséré, Porto-Novo, Allada, Lokossa, Bohicon, Djidja, Glazoué, Bassila, Djougou, Gogounou, Banikoara and Malanville) were used to characterize pyrethroid resistance, assess the susceptibility of resistant populations of *An. gambiae* s.l. to the new insecticides and evaluate the bioefficacy of nets containing these new products. All *An. gambiae* s.l. populations showed strong resistance to pyrethrinoids, with a high frequency of the Kdr mutation: 84% (95% CI :81-87) in *An. coluzzii*, 88% (95% CI: 85-91) in *An. gambiae* s.s. and 75% (95% CI :35-97) in *An. arabiensis*, with an overproduction of detoxification enzymes. However, full susceptibility was observed with clothianidin and chlorfenapyr (mortality >98%), with a strong reduction in fecundity induced by pyriproxyfen in *An. gambiae* s.l. females. Furthermore, mortality rates of wild strains of *An. gambiae* s.l. were significantly higher with Interceptor® G2, Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 and Royal Guard® than with standard Interceptor® LLINs, with a reduction in fertility observed with Royal Guard®. These results suggest that these new insecticides could be used as an alternative in the management of vector resistance in Benin. Although we have an idea of the mechanisms involved in insecticide resistance in vectors, the high intensity of this phenomenon in *An. gambiae* s.l. leads us to suspect the involvement of other mechanisms that deserve to be investigated.

Keywords: Malaria, *An. gambiae* s.l., resistance, new-generation insecticides, LLINs, Benin.

Liste des sigles et abréviations

An. : *Anopheles*

ATP: Adénosine triphosphate

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFP : Chlorfenapyr

CREC : Centre de Recherche Entomologique de Cotonou

CTD: Clothianidine

DDT: Dichloro Diphenyl Trichloroéthane

GTS: Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030

IA : Ingrédient actif

IG2 : Interceptor® G2

LAV: Lutte Anti Vectorielle

MERO®: Methyl ester of rapeseed oil

MFO : Monooxygénase à fonction mixte

MIILDs : Moustiquaires Imprégnées d’Insecticide à Longue Durée d’action

NAchR : Récepteur de l’acétyl choline

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PBO : Piperonyl butoxide

PCR : Polymerase Chain Reaction

PID : Pulvérisation Intra Domiciliaire

PMI : President’s Malaria Initiative

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

PPF: Pyriproxifène

RG: Royal Guard®

RGPH4 : Recensement Général de la Population et de l’habitat 4

s.l: Sensu lato

s.s: Sensu stricto

USAID: United States Agency for International Development

WHO: World Health Organization

Liste des figures

Figure 1: Incidence du paludisme dans le monde et progrès globaux vers les étapes du GST (OMS, 2022).....	11
Figure 2: Répartition géographique des 3 vecteurs dominants du paludisme en Afrique (Sinka, 2013).....	13
Figure 3: Cycle biologique des anophèles.....	15
Figure 4: État de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les vecteurs du paludisme dans le monde (WHO, 2015).....	19
Figure 5: Statut de résistance des vecteurs aux insecticides classiques en Afrique de 2010 à 2022 (WHO, 2022).....	21
Figure 6: Statut de résistance des vecteurs aux insecticides classiques au Bénin de 2010 à 2022 (WHO, 2022).....	22
Figure 7: Schéma représentatif du mode d'action des insecticides neurotoxiques chez les insectes (Araújo <i>et al.</i> , 2023)	25
Figure 8: Cinq piliers du plan mondial de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides (WHO, 2012)	26
Figure 9: Statut de résistance des vecteurs aux insecticides de nouvelle génération en Afrique et au Bénin de 2010 à 2022 (WHO, 2022).....	28
Figure 10: Implication des HJ et de l'ecdysone dans le développement des insectes	32
Figure 11: Zones d'étude.....	39
Figure 12: Collecte des larves dans différents gîtes larvaires (Cliché ZOUNGBEDJI, 2022) 40	
Figure 13: Schéma conceptuel de l'étude sur l'impact du pyriproxifène sur la fertilité chez <i>Anopheles gambiae</i> s.l. (ZOUNGBEDJI, 2022)	44
Figure 14: Schéma montrant l'impact du pyriproxifène sur la fécondité des moustiques femelles de <i>An. gambiae</i> s.l. (WHO, 2022)	46
Figure 15: Image du dispositif de réalisation du test en tunnel.....	48
Figure 16: Taux de mortalité des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. après exposition à trois insecticides pyréthrinoïdes	55
Figure 17: Expression des enzymes de détoxification chez diverses populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	62
Figure 18: Taux de mortalité après exposition au CFP des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin.....	68
Figure 19: Taux de mortalité après exposition à la clothianidine des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin	69

Figure 20: Taux de mortalité de différentes populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. exposées à différentes moustiquaires	81
Figure 21: Mortalité des populations de <i>An. gambiae</i> s.l. après le test en tunnel	85

Liste des tableaux

Tableau 1: Distribution des espèces moléculaires du complexe <i>Anopheles gambiae</i> dans différentes communes étudiées	56
Tableau 2: Fréquence des mutations <i>Kdr</i> au sein des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. étudiées.....	58
Tableau 3: Fréquence des mutations Ace-1R au sein des populations de <i>An. gambiae</i> s.l. étudiées.....	60
Tableau 4: Statut de fertilité de différentes populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. exposés à 3 différentes MIILDs (Royal guard®, Interceptor® et une moustiquaire non traitée)	74
Tableau 5: Taux de mortalité des souches de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. exposées à l'acétone et au PPF après 24h, 48h et 72h.	75
Tableau 6: Taux d'oviposition et d'inhibition de ponte des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. après exposition au PPF et à l'acétone.	76
Tableau 7: Bioefficacité de Interceptor® G2 en tunnel	83



Introduction générale

Introduction générale

Plus de 80% de la population mondiale vit dans des zones exposées aux risques de la transmission d'une maladie vectorielle (Golding *et al.*, 2015) avec près de 1 millions de décès chaque année dans le monde (WHO, 2014) dont 700 milles sont attribuables au paludisme (Roth *et al.*, 2018). Les insectes, les escargots, les rongeurs, les reptiles et d'autres animaux sont vecteurs de plusieurs maladies dont la dengue, la filariose, l'encéphalite japonaise, la leishmaniose, l'onchocercose, la schistosomiase, la trypanosomiase, le paludisme et beaucoup d'autres (WHO, 2005; Otranto, Dantas-Torres *et Breitschwerdt*, 2009). Plusieurs facteurs sont responsables de la transmission et de la propagation des maladies à transmission vectorielle: la résistance des vecteurs aux pesticides ; l'agriculture intensive ; la déforestation ; les changements climatiques ; l'urbanisation et les mouvements des populations humaines et animales (Takken *et Knols*, 2007; Caminade *et al.*, 2019). La plus connue et la plus meurtrière d'entre elles jusqu'à nos jours reste et demeure le paludisme (WHO, 2014). Il sévit depuis le deuxième siècle avant Jésus Christ, et constitue la maladie la plus courante chez les personnes démunies surtout en Afrique et dans quelques pays de l'Asie (Talapko *et al.*, 2019). L'agent causal est un protozoaire parasite unicellulaire appartenant au genre *Plasmodium* (Lawrence, 1999). Cinq espèces ont été découvertes en 1891 dont: *Plasmodium falciparum* ; *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium malariae* sont les espèces responsables de la maladie du paludisme chez l'Homme (Hommel, 2007) et *Plasmodium ovale* découverte après était beaucoup plus rare et pas très endémique que les trois premières (Stephens, 1922). La cinquième, *Plasmodium knowlesi* est reconnue comme étant un parasite du singe rhésus (*Macaca mulatta*) (White, 2008) mais également de l'homme (Cox-Singh *et al.*, 2008). L'espèce la plus prévalente et la plus virulente en région Afrique de l'OMS est *Plasmodium falciparum* (WHO, 2019) dont le principal vecteur est le moustique femelle du genre *Anopheles* qui transmet le parasite à l'homme par une simple piqûre infectée. Plus de 465 espèces sont officiellement reconnues avec 50 membres anonymes de complexe d'espèces (Sinka, 2013) et 70 espèces environ, ayant la capacité de transmettre le paludisme à l'Homme (Mike W Service *et Harold Townson*, 2017).

En 2022, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a rapporté que le nombre de cas de paludisme en 2021 dans le monde a connu une augmentation de plus de 13 millions avec une hausse de 63 000 décès depuis 2019 suite aux perturbations engendrées par la COVID 19. En somme, plus de 247 millions de cas sont estimés en 2021 dans le monde avec plus de 619 000 décès associés. La région Afrique de l'OMS est la partie la plus lourdement touchée avec 95% des cas et 96% des décès estimés au niveau mondial (WHO, 2022).

Au Bénin, plus de 2 303 503 cas de paludisme ont été enregistré dans les formations sanitaires dont plus de la moitié des cas enregistrés chez les enfants de moins de 5 ans avec au moins 3234 décès (Hounnakan *et al.*, 2019). Les enfants et les femmes enceintes, comme dans la plupart des pays endémiques constituent les couches les plus vulnérables et sont susceptibles de développer un paludisme grave (WHO, 2019), cause majeure de mortalité périnatale (Kovacs *et al.*, 2015), de faible poids à la naissance et d'anémie maternelle (Chiabi *et al.*, 2020). Plusieurs moyens de lutte dont les méthodes de lutte anti vectorielle telles que les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD), la pulvérisation intra domiciliaire à effet rémanent (PID) et la gestion des sources larvaires sont considérés comme les interventions les plus efficaces contre les maladies à transmission vectorielle (WHO, 2017). Ces méthodes de lutte ont permis de réduire entre 2000 et 2015 l'incidence palustre de plus de 27% et la mortalité de près de 51% (WHO, 2021), avec plus de 663 millions de cas cliniques évités en Afrique (Bhatt *et al.*, 2015). Quatre classes d'insecticide dont les pyréthrinoides, les carbamates, les organophosphorés et les organochlorés recommandées par l'OMS sont majoritairement utilisés dans la lutte anti vectorielle jusqu'à nos jours (WHO, 2018b). Les pyréthrinoides sont la seule classe d'insecticide indiquée pour l'imprégnation des moustiquaires en raison de leur action rapide à faible dose et de leur faible toxicité pour les mammifères (M. Zaim *et al.*, 2000). Les autres classes d'insecticides sont beaucoup plus utilisés en pulvérisation intra domiciliaire (PID)(WHO, 2011). Les gains obtenus après le déploiement de ces moyens de lutte n'ont pas duré dans le temps. Depuis près d'une décennie, une résurgence de la maladie a été observée dans plusieurs pays (WHO, 2022). Un phénomène qui pourrait être plus lié à la survenue et à la propagation de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides (WHO, 2018), particulièrement chez *Anopheles gambiae* s.l. le principal vecteur de la transmission du paludisme en Afrique subsaharienne (Rodriguez-Morales, 2016). Cette situation constitue une menace sérieuse pour la lutte contre le paludisme et risque de rendre infructueux les efforts consentis, et de faire perdre les gains obtenus jusque-là (Ranson *et Lissenden*, 2016).

Le Bénin comme la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne a déjà signalé la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides. Des études menées le long du transect sud-nord couvrant la plupart des zones agro-écologiques ont montré une forte résistance de *Anopheles gambiae* s.l aux pyréthrinoides et au DDT (Djègbè *et al.*, 2011; Djogbénou *et al.*, 2011; Agossa *et al.*, 2015 ; Ngufor *et al.*, 2015 ; Kpanou *et al.*, 2022). Elle s'est répandue aussi bien dans les milieux ruraux qu'urbains (Yadouleton *et al.*, 2010a) où le développement de

l'agriculture avec l'utilisation inappropriée d'insecticides pour la lutte contre les insectes ravageurs des cultures (coton, riz, légumes etc...) a fortement contribué à son intensification (Yadouleton *et al.*, 2009; Sagbohan *et al.*, 2021). Plusieurs études ont révélé qu'elle serait due à une surexpression de l'activité des enzymes de détoxification (Corbel *et al.*, 2007 ; Djouaka *et al.*, 2011), et/ou à des mutations génétiques observées au niveau des sites cibles des insecticides (Kdr L1014F, Kdr N1575Y, Ace-1 G119S) chez les populations de moustiques vecteurs (Chandre 1999; H. Ranson *et al.*, 2000; Djogbénou *et al.*, 2011b). Dans ce contexte de mécanismes de résistance multiples, la recherche de nouveaux outils capables d'assurer un meilleur contrôle des vecteurs s'avère nécessaire. Dans ce cadre, en 2017, l'OMS a émis une recommandation provisoire en faveur des MIILDs PBO après qu'elles aient montré une efficacité supérieure à celle des MIILDs standard à base de pyréthrinoides dans un essai contrôlé randomisé (ECR) mené en Tanzanie (Protopopoff *et al.*, 2018). Le PBO est un synergiste qui inhibe l'activité oxydasique des vecteurs, un des enzymes impliqués dans l'une des mécanismes de résistance développées par les insectes (Khot *et al.*, 2008). L'efficacité des MIILDs incorporant du PBO dans une zone donnée dépend du niveau d'activité des oxydases au sein des populations de vecteurs. Au Bénin, l'ajout du synergiste PBO n'a pas totalement restauré la sensibilité des vecteurs aux pyréthrinoides dans certains endroits (Sagbohan *et al.*, 2022). L'OMS pour renforcer cette stratégie de lutte, a fait la recommandation d'autres classes d'insecticides dont les néonicotinoïdes (clothianidine), les pyrroles (chlorfénapyr) et les inhibiteurs de croissance (pyriproxyfène), des classes d'insecticide à mode d'action différent de celui des pyréthrinoides. Des recherches récentes ont identifié ces insecticides comme des options prometteuses pour la lutte antivectorielle. Ainsi, des insecticides à base de néonicotinoïdes, tels que SumiShield® 50WG et Fludora Fusion®WP-SB, ont été développés et préqualifiés pour la PID en 2017 (WHO, 2018b). La clothianidine se lie au récepteur nicotinique, bloque la transmission de l'influx nerveux et provoque la mort de l'insecte (Elamathi *et al.*, 2014). Le chlorfénapyr perturbe les voies énergétiques des insectes dans leurs mitochondries. Ainsi, la formation d'adénosine triphosphate (ATP) est empêchée, ce qui entraîne la mort cellulaire et la mort des insectes (Raghavendra *et al.*, 2011). Le pyriproxyfène provoque des changements physiologiques et morphogéniques (Yapabandara et Curtis, 2002) spécifiques aux insectes adultes en perturbant le développement ovarien, la ponte et l'éclosion (Jaffer *et al.* 2015b; Ohba *et al.*, 2013). En raison de leur nouveau mode d'action, il est peu probable que ces nouvelles molécules présentent une résistance croisée avec les insecticides neurotoxiques standard, comme cela a été observé chez les populations de moustiques anophèles (N'Guessan *et al.*, 2009). Néanmoins, il est important d'évaluer le comportement

de ces vecteurs résistants avec ces nouveaux produits candidats qui peuvent être utilisés comme alternatif dans le cadre de la gestion de la résistance au Bénin. C'est dans cette optique que s'inscrit cette thèse intitulé « **Evaluation de l'efficacité des insecticides de nouvelle génération sur les populations de *Anopheles gambiae* s.l. porteuses des mutations *L1014F* et *G119S* au Bénin** ». Cette étude permettra non seulement de fournir des données sur le statut de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides de nouvelles générations mais aussi aidera les décideurs à prendre des décisions idoines pour une gestion efficace, fiable et durable de la résistance, un phénomène dynamique avec le temps.

Hypothèses et objectifs de l'étude

Hypothèses

Les hypothèses qui justifient ce travail sont les suivantes :

1. Une forte fréquence de la mutation *Kdr* et de la mutation *Ace-1* associée à une surexpression des enzymes de détoxification sont observées chez toutes les espèces du complexe *An. gambiae* au Bénin ;
2. Les populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. de toutes les zones agroécologiques étudiées sont sensibles à la clothianidine et au chorfénapyr ;
3. Le pyriproxifène a induit une réduction du taux de fécondité et de fertilité chez diverses populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. du Bénin ;
4. Les moustiquaires de nouvelle génération, Olyset® Plus ; PermaNet® 3.0 ; Royal Guard® et Interceptor® G2 sont efficaces comparées aux moustiquaires standards Interceptor® et PermaNet® 2.0.

Objectif général

L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer l'efficacité des insecticides de nouvelle génération : le chlorfénapyr (CFP), la clothianidine (CTD) et le pyriproxifène (PPF) sur les populations de *Anopheles gambiae* s.l. porteuses des mutations *Kdr*, *Ace-1* au Bénin.

Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques se déclinent en quatre grandes parties :

1. Connaître le statut de résistance des populations de *Anopheles gambiae* s.s et de *Anopheles coluzzii* porteuses des mutations *L1014F* et *G119S* du Sud, du Centre et du Nord du Bénin ;
2. Evaluer la sensibilité de *Anopheles gambiae* s.l. au chorfénapyr et à la clothianidine ;
3. Evaluer l'impact du pyriproxifène sur la fertilité et la fécondité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord du Bénin ;

4. Evaluer la bio-efficacité des moustiquaires de nouvelle génération (Olyset® Plus ; PermaNet® 3.0 ; Royal Guard® et Interceptor® G2) sur les populations sauvages de *Anopheles gambiae* s.l.



Partie 1 : Synthèse bibliographique

1. Synthèse bibliographique :

1.1. Contexte du paludisme dans le monde

Le paludisme est l'une des maladies à transmission vectorielle la plus meurtrière et la plus connue dans le monde au regard du nombre de victime qu'il fait chaque année et ceci jusqu'à nos jours.

1.1.1. Qu'est-ce que le paludisme :

Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle qui est transmise à l'homme par des piqûres de moustiques. Le principal vecteur est la femelle du genre *Anophèle* qui au cours de son repas sanguin transmet le Plasmodium, un parasite protozoaire responsable de la maladie (Talapko *et al.*, 2019). Il reste et demeure jusqu'à nos jours la principale cause de mortalité dans le monde et constitue la maladie la plus courante en Afrique et dans certains pays d'Asie (OMS, 2022).

1.1.2. De la découverte à une lutte acharnée depuis des siècles

L'historique de l'acquisition des connaissances et du développement de la lutte antipaludique est marquée par quatre grandes périodes à savoir :

La période empirique : Elle est marquée par la découverte du Plasmodium parasites responsables du paludisme par Alphonse Leveran en 1880 à Constantine en Algérie. Mais bien avant, au V^{ème} siècle av J-C Hippocrate avait déjà associé la maladie de la fièvre avec la présence des eaux stagnantes des marais. Ainsi, dès l'antiquité le paludisme fut reconnu comme une maladie associée à l'environnement. Des faits qui ont véritablement marqué l'histoire de la connaissance de la maladie et qui ont conduit à la découverte des Anophèles comme principaux vecteurs plus tard. La maladie conquiert le monde rapidement et fait ravage en Europe, en Amérique. Elle a beaucoup sévi dans les régions tropicales et subtropicales et surtout en Afrique le continent le plus touché. Les moyens de protection étaient limités à l'aménagement du cadre de vie (éviter la vie dans les milieux impropres et drainer les eaux stagnantes pouvant contribuer au développement de la maladie) et à l'usage naturel de l'écorce de quinquina avant que la quinine ne soit isolée pour des soins curatifs en 1820 par Pelletier et Caventou.

La période naturaliste : C'est la période au cours de laquelle le cycle du *Plasmodium* a été découvert renforçant ainsi les connaissances sur la maladie du paludisme. Cette période a duré de 1880 jusqu'à la Seconde Guerre mondiale avec un véritable essor pour les découvertes des sciences naturelles et médicales. Ces avancées ont permis aux chercheurs de comprendre le comportement du vecteur, le mode d'action des parasites et toutes les phases de développement de ces derniers allant des Anophèles jusqu'à l'homme. A partir de ce moment,

la lutte contre le vecteur et le parasite est devenue une impérative. Les premières formes de lutte étaient basées sur la destruction des larves, l'utilisation des potions naturelles à base des plantes (*Artemisia annua*), la quininisation des populations (Afrique tropicale, l'Asie du Sud-Est, l'Australie et l'Amérique du Sud) et la lutte imagocide par pulvérisation intérieure de pyréthrine qui commença en Afrique du Sud (Ross, 1936) avant que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) découvert en 1938 ne soit reconnu pour ses propriétés insecticides en 1939 (Müller, 1955). Ces différents moyens de lutte ont semblé porter leur fruit car la maladie a commencé à régresser dans plusieurs pays.

La période chimique : Cette période couvre l'ère de la seconde guerre mondiale et marque la période d'une lutte acharnée surtout contre les vecteurs de la maladie. Le succès des pyréthrines dans un essai de lutte anti vectorielle en Afrique du Sud va désormais faire d'elle une arme qui sera appuyée par le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) un autre insecticide à forte rémanence. En 1944, le DDT en pulvérisation démontrera à son tour son efficacité en essai en Afrique, aux Etats-Unis et en Asie. Dès lors, plusieurs pays ont témoigné de la réussite des opérations de lutte basée sur l'utilisation de ces insecticides avec une baisse considérable des indicateurs épidémiologiques. L'espoir de vaincre la maladie naît et la stratégie de lutte passe à l'éradication complète de la maladie avant d'être étouffée un peu plus tard par la survenue de la résistance des vecteurs en 1951 suivi de la réémergence de la maladie dans les zones autre fois exemptes du paludisme. Comme ça ne suffisait pas la résistance des plasmodies aux médicaments surtout à la chloroquine viendra renforcer les obstacles à la lutte. Au fil du temps, l'espoir d'éradiquer le paludisme s'estompe. En 1972, les discours d'éradication du paludisme ont laissé place aux discours de contrôle surtout dans les régions les plus endémiques telles que la région Africaine.

La période des incertitudes : C'est la période allant de l'échec du plan d'éradication du paludisme jusqu'à nos jours. Elle a été beaucoup plus mouvementée et plus basée sur des stratégies de contrôle. La plus récente des stratégies de contrôle du paludisme adoptée par l'OMS est le GTS : la stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme de 2016 à 2030 qui consiste à réduire de 40% de 2016 à 2020, de 75% de 2016 à 2025 et de 90% de 2016 à 2030 l'incidence de la maladie et le taux de mortalité associée. A ce jour, les objectifs de 2020 ne sont pas atteints surtout en Afrique. Plus de la moitié de la population du monde vit encore dans des régions à risque (OMS, 2019) et les regards sont maintenant tournés vers les objectifs de 2025 et de 2030. Néanmoins, il est capital de reconnaître l'importance des efforts fournis et des gains obtenus jusque-là. Depuis 2000, plus de 2 milliards de cas de paludisme ont été évités dans le monde dont 82% en Afrique de l'OMS et 10% dans l'Asie du Sud Est. Les premières interventions aussi bien contre les vecteurs que le parasite ont porté

leur fruit surtout dans les régions tempérées. Depuis 2015, la région Européenne est exempte du paludisme même si en zones tropicales et subtropicales d'Afrique, d'Amérique et d'Asie, la situation n'est encore guère reluisante. Selon le bilan de l'OMS 2022, ces trois régions concentrent à elles seules plus de 99% de la charge de la maladie dont plus de 95% sont enregistrée en région Afrique de l'OMS (OMS, 2022). Les pays dont l'Île Maurice, le Sri Lanka, le Paraguay, l'Algérie et l'Argentine, El Salvador et la Chine respectivement en 1973, 2016, 2018, 2019, 2021 sont exempts du paludisme alors que l'Iran et la Malaisie, le Cap vert et Le Belize, l'Arabie saoudite rapportent respectivement pour une quatrième, une troisième et la toute première fois et de manière consécutive zéro cas de paludisme. De façon globale, la situation du paludisme en 2021 dans le monde a connu une évolution mitigée. Des diminutions de cas par endroit et d'augmentation à d'autres ont été observées. Plusieurs facteurs dont la résistance des vecteurs aux insecticides signalées dans les pays les plus endémiques, l'invasion et la prolifération du nouveau vecteur *An. stephensi* en Afrique, la réduction des financements mettant en déclin le pouvoir décisionnel des Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) et l'apparition des crises humanitaires (famine, Covid 19, conflits etc...) ont eu raison des progrès de lutte contre la maladie. Ces derniers constituent un véritable frein s'ils persistent. A ce rythme, les objectifs du GTS fixés pour 2025 et 2030 sont loin d'être atteints surtout en ce qui concerne la région Afrique de l'OMS.

1.2. Les vecteurs du paludisme

Un vecteur est un parchemin obligatoire pour un agent pathogène pour se multiplier (virus) ou pour assurer une partie de son cycle biologique (parasite) avant de rejoindre un hôte pour sa diffusion (Pages *et al.*, 2007). Les moustiques de façon générale constituent la plus grande famille d'insectes avec de redoutables vecteurs. Les anophèles par exemple sont vecteurs des plasmodies, parasites de l'Homme dans le cas du paludisme alors que les aedes par exemple sont vecteurs des arboviroses tels que la dengue le chikungunya ou le Zika.

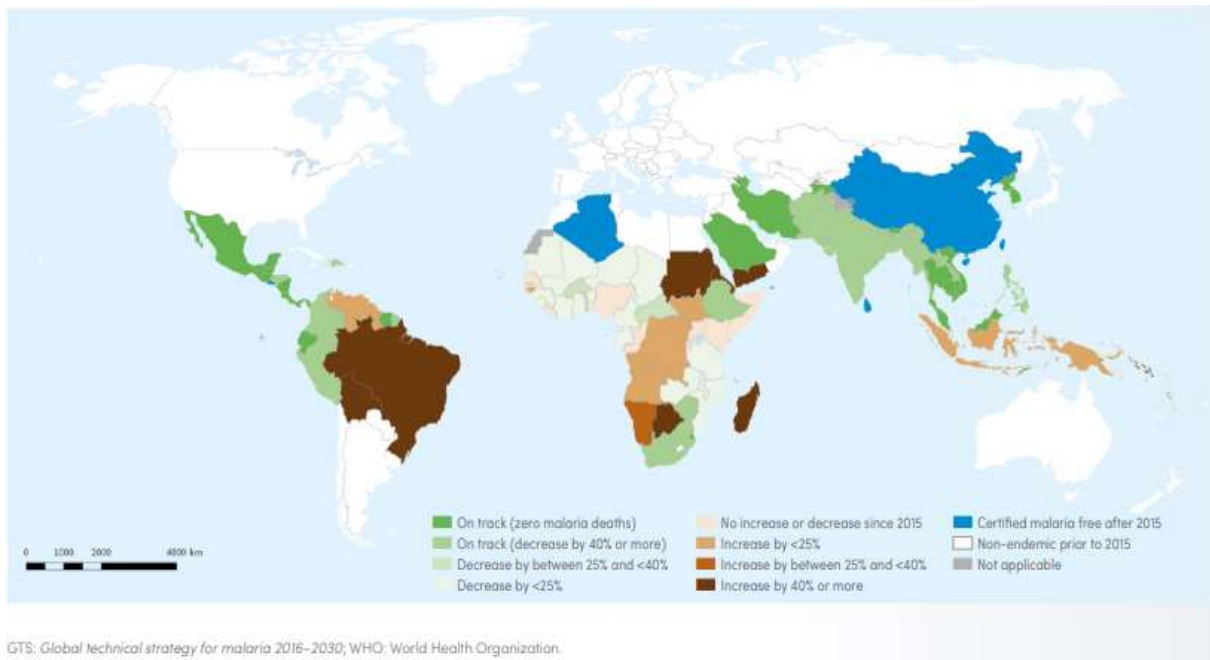


Figure 1: Incidence du paludisme dans le monde et progrès globaux vers les étapes du GST (OMS, 2022)

1.2.1. Position Systématique

Les moustiques qui transmettent le parasite à l'être humain appartiennent à l'embranchement des *Arthropoda*, aux classes des *Insecta*, à l'Ordre des *Diptera*, à la famille des *Culicidae*, au genre *Anopheles*.

La position systématique de *An. gambiae* s.l. d'après Gilles et Coetzee (1987) est la suivante :

Règne	: Animal
Embranchement	: Arthropodes
Classe	: Insectes
Sous-classe	: Ptérygotes
Section	: Oligonéoptère
Ordre	: Diptère
Sous-ordre	: Nématocère
Famille	: Culicidés
Sous-famille	: Anophèlines
Genre	: <i>Anopheles</i>
Sous-genre	: <i>Cellia</i>
Série	: <i>Pyretophorus</i>
Espèce	: <i>Anopheles gambiae</i> s.l.

1.2.2. Rappel sur la répartition géographique des anophèles

Plus de 500 espèces d'anophèles sont connues avec plus d'une cinquantaine en mesure de transmettre le paludisme (Harbach, 1994).

En Afrique, les vecteurs majeurs sont au nombre de sept : *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. merus*, *An. melas*, *An. moucheti*, *An. nili*. Trois parmi ces sept espèces sont qualifiées d'espèces vectrices dominantes : *An. gambiae* s.s, *An. arabiensis* et *An. funestus* (Sinka, 2013). Au Bénin, les travaux de Akogbéto, (1992) en milieu côtier lagunaire, de Padonou (2011) et de Djénontin (2010) dans la zone Ouidah-Kpomassè-Tori confirment l'existence de ces principaux vecteurs du paludisme dans la partie sud du pays. Au nord du Bénin, *An. nili* a été identifié comme une nouvelle espèce impliquée dans la transmission du paludisme (Ossè *et al.*, 2019). Avec les nouvelles découvertes génétiques, la systématique est en constante progression. C'est ainsi que récemment, les formes moléculaires M et S du complexe *Anopheles gambiae* ont été érigées en taxons distincts : *Anopheles coluzzii* pour la forme M et *Anopheles gambiae* pour la forme S (Coetzee *et al.*, 2013).

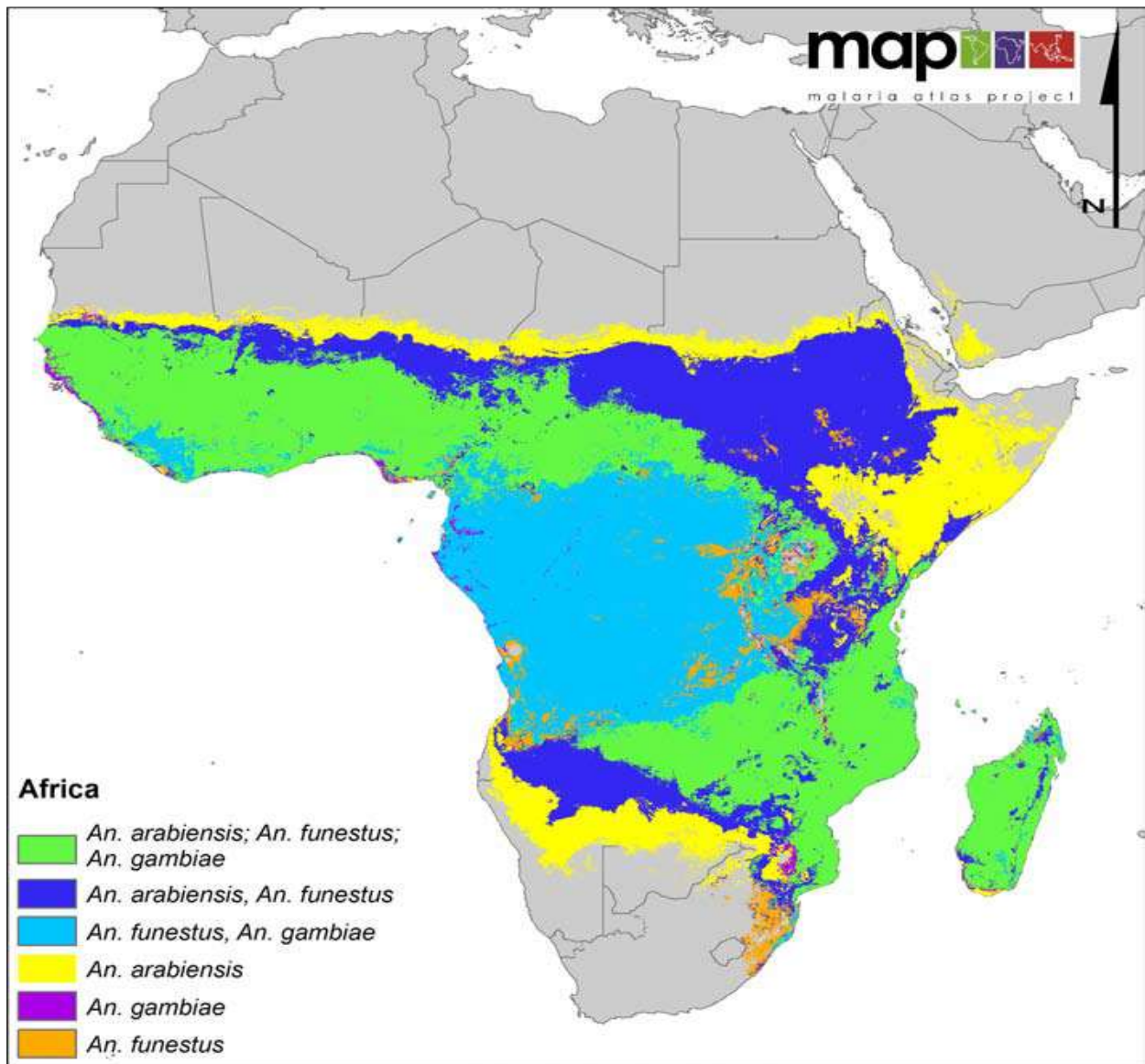


Figure 2: Répartition géographique des 3 vecteurs dominants du paludisme en Afrique (Sinka, 2013).

1.2.3. Bio-écologie des anophèles

Deux phases caractérisent le développement de l'anophèle. La première phase est constituée de la vie pré-imaginale (œuf, stades larvaires et nymphe) et est essentiellement aquatique alors que la seconde est aérienne et prend en compte l'adulte ou l'immature. Les œufs sont généralement pondus dans des gîtes pas trop profonds et pas trop sales, permanents ou semi permanents. La pluie est un facteur favorisant le développement des gîtes et donc de la reproduction des moustiques. Cependant une forte précipitation peut aussi détruire des gîtes existants. Par exemple de fortes pluies peuvent transformer des bassins en ruisseaux et entraver le développement des œufs et des larves, ou simplement les rejeter aux abords. Pour survivre, il leur faut au moins 50 ou 60 % d'humidité relative. Les moustiques se nourrissent

généralement de nectar de fleurs, de jus sucrés et d'exsudats végétaux, qui leur servent de source d'énergie pour voler. Cependant les femelles ont également besoin d'un repas de sang pour la maturation des œufs et la ponte (Klowden, 1995). Après l'accouplement, l'anophèle femelle cherche un hôte à piquer, de préférence pendant la nuit. Capables de pomper le sang à travers leur pièce buccale, les moustiques inoculent les sporozoïtes infectants par le canal salivaire. Après un ou plusieurs repas de sang (selon les espèces) puis la digestion, les anophèles femelles vont pondre dans les gîtes les plus proches. Ce cycle est appelé cycle trophogonique ou gonotrophique et se répète plusieurs fois tout au long de la vie du moustique. La durée de ce cycle est influencée par deux facteurs principaux dont l'espèce et surtout de la température externe. Chez *Anopheles gambiae* s.l. par exemple, lorsque la moyenne de température jour/nuit est de 23°C, le cycle dure 48 heures. La quantité d'œufs pondus après chaque cycle est fonction de l'espèce.

1.2.4. Cycle biologique des anophèles

Le cycle biologique est le processus au cours duquel se déroulent les différentes étapes d'évolution des stades de développement du moustique. Il s'accomplit entre 9 et 20 jours pour *Anopheles gambiae* s.l (Yaro, 2007) et de 20 à 30 jours pour *Anopheles funestus* (Hamon *et al.*, 1955) à la température de 27°C.

- ✓ A la phase aquatique ou pré-imaginale : Les anophèles femelles pondent dans l'eau, des œufs fécondés. De chaque œuf éclot une larve qui se nourrit en filtrant les débris organiques et les micro-organismes de l'eau. On distingue quatre stades de développement larvaires appelés L1, L2, L3, L4 obtenues par trois mues de croissance ou exuviation. Le stade larvaire se termine avec la formation d'une forme intermédiaire appelée nymphe.
- ✓ A la phase aérienne ou imaginale : Au bout de quelques jours, la nymphe effectue une mue particulière, la nymphose conduisant à l'imago, la forme adulte du moustique.

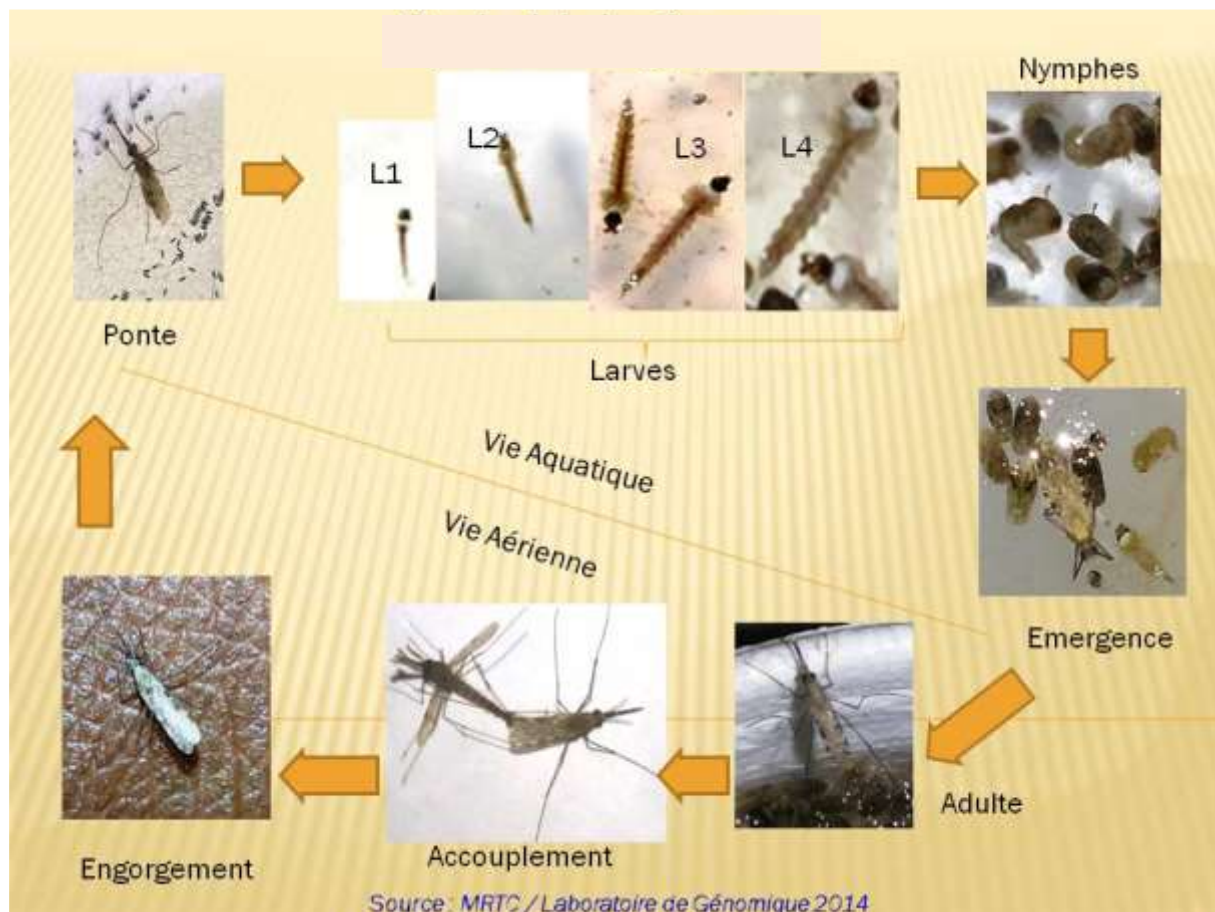


Figure 3: Cycle biologique des anophèles

1.3. Lutte contre les vecteurs du paludisme

La lutte anti vectorielle dans le cadre de la lutte antipaludique est l'ensemble de toutes les actions menées contre les moustiques dont le but est de réduire considérablement leur capacité vectorielle (OMS, 2019). Elle peut être chimique, biologique ou mécanique. Elle intervient à toutes les étapes du cycle biologique du vecteur, de la ponte des œufs jusqu'aux adultes en passant par les stades larvaires. La lutte contre les adultes est la plus connue et la plus adoptée par les programmes de lutte contre le paludisme en raison de la facilité qu'offre cette dernière en terme de pratique et de résultats.

1.3.1. Lutte contre les adultes (ou imagos)

La lutte contre les moustiques adultes est considérée aujourd'hui comme l'une des méthodes les plus sûres de prévention de la maladie du paludisme (Pryce *et al.*, 2022). Elle se repose essentiellement sur l'usage des insecticides dont le rôle est de réduire au maximum le contact Homme-vecteur en tuant les vecteurs ou en ayant un impact nocif sur le processus vital de ces derniers. Cette lutte se repose principalement sur deux moyens à savoir : la Pulvérisation Intradomiciliaire à effet rémanent (PID) et l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'action (MIILD).

1.3.2. Les différentes classes d'insecticides et leur mécanisme d'action

Plusieurs classes d'insecticides sont utilisées aujourd'hui dans le cadre de la lutte contre les vecteurs. Quatre parmi eux dont les pyréthrinoides, les organochlorés, les carbamates et les organophosphorés sont les plus connus et ont été beaucoup sollicités pour l'imprégnation des MIILDs et pour la PIR en santé publique mais parfois en agriculture comme pesticide (Tang *et al.* 2021 ; Tudi *et al.*, 2021) . Suite à l'apparition et la distribution rapide des gènes de résistance à ces différentes classes, d'autres nouvelles classes d'insecticides ont été sollicitées et recommandées par l'OMS. Il s'agit des néonicotinoïdes, des pyrroles, des buténolides, des imitateurs d'hormones juvéniles et des spinosynes (WHO, 2019).

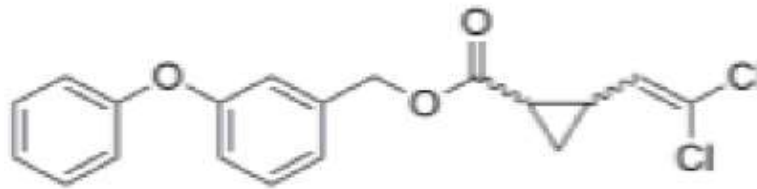
1.3.2.1. Les pyréthrinoides

Les pyréthrinoides sont des analogues synthétiques des alcaloïdes naturels : les pyréthrines naturelles qui sont extraits de la fleur jaune de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Ujihara, 2019). Depuis près d'une décennie, ils sont utilisés en remplacement aux pesticides très toxiques tels que les organochlorés et organophosphorés (Katsuda, 1999). Ce sont des insecticides de synthèse ayant un noyau structural similaire à celui des pyréthrines. Ils ont été fabriqués pour améliorer l'activité insecticide des pyréthrines par augmentation de leur stabilité en présence de la lumière et du temps de séjour dans l'environnement (Gan *et al.*, 2008). Ils se dégradent moins rapidement et maintiennent leur efficacité pendant une longue période. Ils sont classés en deux groupes, à savoir : les pyréthrinoides dits de classe I et ceux dits de classe II en fonction de leur mode d'action, leur toxicité et de leurs propriétés physiques (Breckenridge *et al.*, 2009; Gajendiran et Abraham, 2018). Les pyréthrinoides sont recommandés et sont utilisés en raison de leur efficacité à très faible dose, de leur faible toxicité chez les mammifères et de leur absence de persistance dans l'environnement. Depuis, ils sont devenus une référence dans la lutte contre les parasites et des insectes nuisibles. Ils sont utilisés dans plusieurs domaines : dans le domaine agricole pour le traitement des produits de rentes comme le coton, les céréales, le tabac les fruits et légumes etc... mais également pour usage domestique et en santé publique dans la lutte anti vectorielle contre les vecteurs du paludisme, la filariose, la trypanosomiase et beaucoup d'autres pathologies etc....

Quelques insecticides pyréthrinoides utilisés au Bénin dans la lutte anti vectorielle

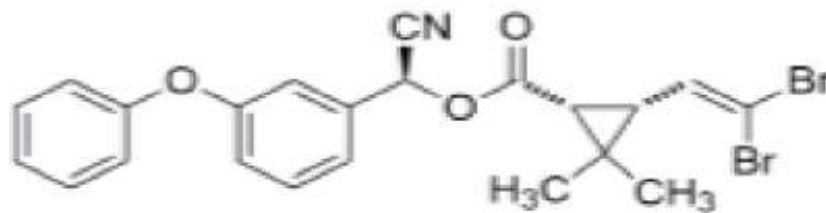
Trois insecticides pyréthrinoides plus connus en tant qu'outil de lutte anti vectoriel et recommandés par l'OMS sont utilisés au Bénin. Il s'agit de la perméthrine, de la deltaméthrine et de l'alpha-cyperméthrine utilisés pour le contrôle des insectes en raison de leur toxicité relativement faible pour les animaux et pour les humains (Chrutek *et al.*, 2018).

- ✓ **La Perméthrine**, un pyréthrinaïde du groupe I est un insecticide des Fourmis, des coléoptères, des tordeuses de la capsule, des tordeuses des bourgeons, des puces, des mouches, des poux, des mites, des moustiques, des termites et des charançons.



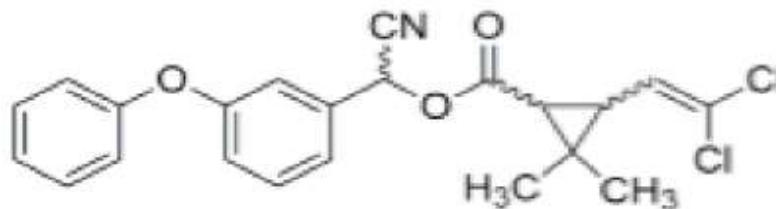
Structure chimique de la Perméthrine

- ✓ **La Deltaméthrine**, un pyréthrinaïde du groupe II est un insecticide des Pucerons, des coléoptères, des tordeuses de la capsule, des tordeuses de bourgeons, des chenilles, de la cigale et des morpions, des papillons de nuit, des papillons tortrix, des charançons et des mouches blanches.



Structure chimique de la Deltaméthrine

- ✓ **L'alphacyperméthrine**, un pyréthrinaïde du groupe II est un insecticide des Blattes, des moustiques et des mouches.



Structure chimique de Alphacyperméthrine (Gajendiran & Abraham, 2018)

Mécanismes d'action

Les pyrétrinoïdes sont des insecticides neurotoxiques qui provoquent une hyper-excitabilité neuronale. Ils agissent principalement sur les canaux sodiques membranaires des axones du système nerveux central et périphérique en modifiant la conformation stérique des protéines qui les constituent (Toshio, 1992; Soderlund, 2020). Par un mécanisme d'hyperpolarisation prolongé de la membrane ils vont déclencher un train de potentiel d'action qui sera responsable du prolongement du temps d'ouverture des canaux sodique. Il va se produire un afflux permanent d'ions sodium à l'intérieur de la membrane post-synaptique suivi d'une dépolarisation de cette dernière causant ainsi une paralysie générale de l'insecte (Soderlund, 2010). Les pyrétrinoïdes agissent également sur les récepteurs GABA et sur le complexe Ca-Mg –ATP ases membranaire / canaux calciques voltage dépendant avec une concentration plus élevée que celle suffisante pour affecter les canaux sodiques (Clark *et* Symington, 2012). Ils inhibent l'ion calcium, l'ion Magnésium, l'ATPase membranaire par augmentation du Calcium intracellulaire et de la libération de neuromédiateur provoquant la dépolarisation post-synaptique. Ils bloquent la fonction inhibitrice du récepteur GABA par inhibition des ions chlore dans la cellule. Toutes ces actions concourent aux disfonctionnement des mécanismes vitaux de l'insecte et provoquent sa mort. Mais depuis quelques années les pyrétrinoïdes semblent ne plus avoir l'effet aduicide recherché sur les insectes. Ces derniers ont acquis une forte résistance notamment chez les vecteurs du paludisme en Afrique (Kleinschmidt *et al.*, 2018) et surtout dans toute l'Afrique subsaharienne (Knox *et al.*, 2014). Une situation qui met en difficulté les principaux outils de lutte anti vectoriels à savoir les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILD) et la pulvérisation intra domiciliaire à effet rémanent (PID). Face à cette situation, des solutions urgentes ont été envisagées pour des insecticides alternatifs capables de maîtriser la résistance (Zaim *et* Guillet, 2002; Hilary Ranson *et al.*, 2011). C'est ainsi que les inhibiteurs enzymatiques comme le synergiste butoxyde de piperonyl (PBO) ou des stratégies consistant à mélanger plusieurs insecticides sont utilisés pour augmenter leur toxicité et donc leur efficacité contre les insectes. C'est le cas par exemple des moustiquaires comme Olyset® Plus imprégnée avec la Perméthrine + PBO incorporés dans un polyéthylène sur tous les côtés et le PermaNet® 3.0 imprégné avec une combinaison de deltaméthrine enduite sur polyester avec la bordure renforcée (côtés latéraux), et deltaméthrine + PBO incorporés dans le polyéthylène à la face supérieure. Ces moyens de contournement de la résistance sont renforcés dernièrement avec les insecticides dits de nouvelle génération à savoir le chlorfenapyr, la clothianidine et le pyriproxifène qui présentent tous un mode d'action différent de celui des pyrétrinoïdes.

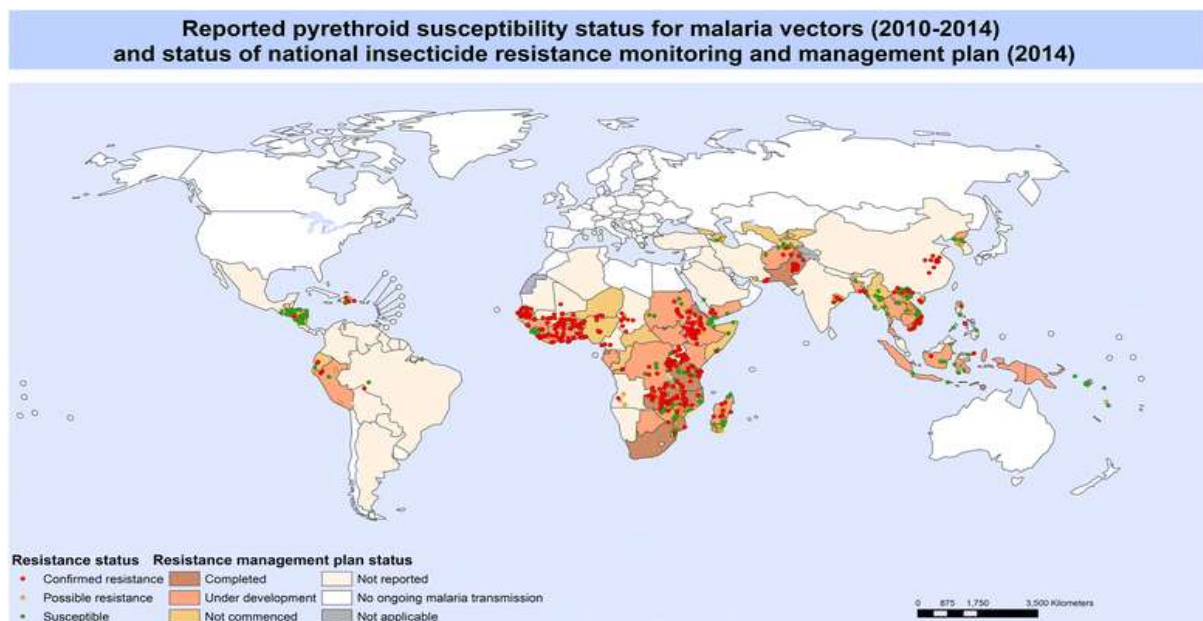


Figure 4: État de la résistance aux pyréthrinoides chez les vecteurs du paludisme dans le monde (WHO, 2015)

1.3.2.2. Les organochlorés

Les organochlorés sont des insecticides synthétiques dérivés des hydrocarbures chlorés. Ce sont les tous premiers pesticides les plus répandus utilisés dans le monde. Ils sont également sollicités dans les industries de la chimie mais également dans le domaine sanitaire. Les plus connus sont : l'endosulfan, le chlordane, le lindane, et le DDT (Dichlorodiphényltrichloro-roéthane) (Jayaraj *et al.*, 2016) reconnu comme étant un insecticide précurseur de la lutte anti vectorielle. A cause de leur toxicité très élevée, leur utilisation est aujourd'hui interdite dans plusieurs pays. Ils sont neurotoxiques et agissent sur les mêmes sites que les pyréthrinoides mais également sur les GABA récepteurs dont l'action empêche la pénétration des ions dans les neurones (Kaushik et Kaushik, 2007).

1.3.2.3. Les carbamates et les organophosphorés

Les Carbamates et les organophosphorés dérivés respectivement des acides carbamiques et des acides phosphoriques sont deux insecticides présentant une même structure chimique à la seule différence qu'ils sont constitués de base chacun d'un groupe fonctionnel doté de propriétés insecticides : le phosphore pour les organophosphorés et le groupe carbamate pour les carbamates (Gupta, 2011). Deux insecticides de la classe des carbamates dont le propoxur et le bendiocarbe sont connus en santé publique en tant qu'outil de lutte anti vectorielle. Cependant, ils sont très peu utilisés aujourd'hui en raison de leur taux de toxicité élevé pour

les mammifères (Jiang *et al.*, 2013). A l'inverse, les organophosphorés sont très peu toxiques. Le malathion, le parathion et le pirimi-phosméthyl sont quelques exemples d'organophosphorés dont la plupart est utilisée en santé publique. En raison de leur forte affinité à l'acétylcholinestérase des insectes, ces deux classes d'insecticides inhibent la liaison entre l'acétylcholine et son récepteur (l'AChE). Cette action va provoquer un afflux du neurotransmetteur dans la synapse et va provoquer la mort de l'insecte par paralysie (Rathnayake et Northrup, 2016).

1.4. Résistance des vecteurs aux insecticides

La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est l'une des raisons majeures pour laquelle le plan d'éradication du paludisme a laissé place aux stratégies de contrôle. Les organochlorés par le biais des DDT furent les premières classes d'insecticides sur qui la résistance des moustiques a été signalée. Cette résistance s'est apparue au moment même où le monde entier s'apprêtait à fêter l'éradication du paludisme. Ce fut un coup dur pour les chercheurs qui ont tourné leurs regards vers d'autres classes d'insecticide en remplacement au DDT : par les pyréthrinoides (Coetzee, 1999) en raison de leur faible taux de toxicité pour les mammifères (Elliott, 1976) et plus tard par les carbamates et les organophosphorés dans la pulvérisation intra domiciliaire (PID) (Tangena *et al.*, 2020). Quelques années après, la résistance des vecteurs a été fortement signalée aux pyréthrinoides chez *An. gambiae* s.s. principal vecteur de la transmission du paludisme en Afrique (Martinez-Torres *et al.*, 1998a) mais également aux autres classes d'insecticides. Les mécanismes de résistance croisée sont l'un des facteurs qui expliquent cette résistance (Mitchell *et al.*, 2012). C'est le cas par exemple des pyréthrinoides dont le site d'action est le même (canaux sodique voltage dépendant) que les organochlorés (Martinez-Torres *et al.*, 1999). L'autre facteur à la base de l'intensification et de la propagation rapide de la résistance est l'utilisation massive des mêmes classes insecticides utilisées en santé publique comme pesticides agricoles (Tepa *et al.*, 2022). Plusieurs études réalisées en Afrique ont d'ailleurs fait remarquer que les pratiques culturelles et le progrès de l'urbanisation sont des facteurs liés à la résistance des vecteurs (Reid et McKenzie, 2016). La culture du coton et le maraîchage sont considérés comme des pratiques culturelles commerciales en essor en Afrique qui sollicitent l'usage d'importante quantité d'insecticide ce qui pourrait expliquer la forte résistance des vecteurs du paludisme sur ce continent (P. Müller *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2013).

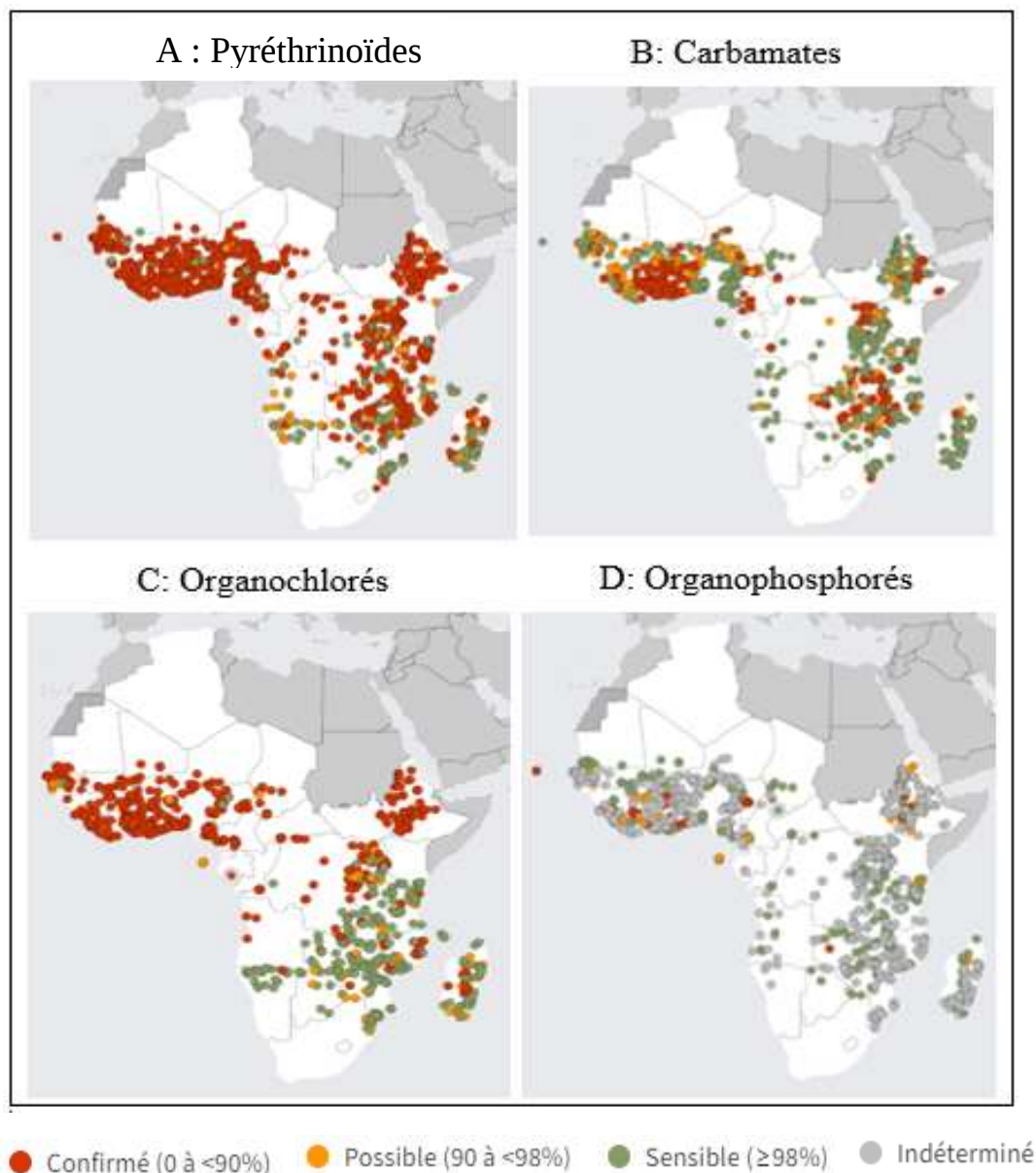


Figure 5: Statut de résistance des vecteurs aux insecticides classiques en Afrique de 2010 à 2022 (WHO, 2022)

Au Bénin, la résistance des vecteurs au paludisme est signalée depuis des décennies (Chandre *et al.*, 1999). Comme dans la plupart des pays de l'Afrique, l'utilisation incontrôlée des insecticides dans l'agriculture est le facteur le plus contributif à la résistance des vecteurs aux insecticides (Yadouleton *et al.*, 2009a; Yadouleton *et al.*, 2011) (Sagbohan *et al.*, 2022). Les pyréthrinoides et le DDT sont les insecticides les plus touchés (Sagbohan *et al.*, 2021) mais l'on note depuis quelques années une montée de la résistance aux autres classes d'insecticides (Aïkpon *et al.*, 2013).

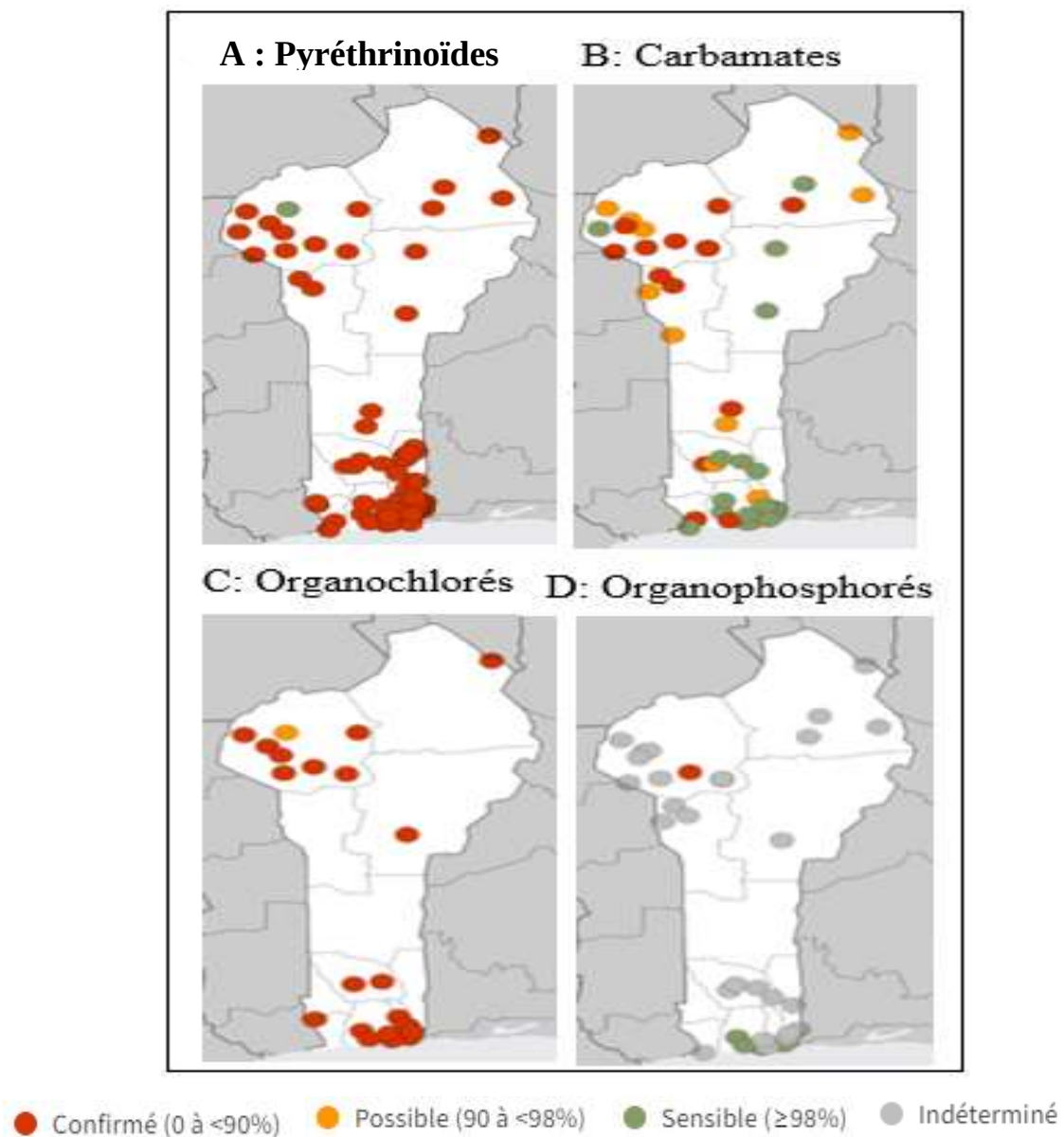


Figure 6: Statut de résistance des vecteurs aux insecticides classiques au Bénin de 2010 à 2022 (WHO, 2022)

1.4.1. Mécanisme de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides

La résistance peut être définie comme l'apparition d'individus ayant la faculté de tolérer des substances à dose diagnostique qui auraient un effet létal sur un grand nombre d'individus d'une population d'insectes normaux de la même espèce ou une diminution héréditaire de la sensibilité des individus d'une population cible à un insecticide donné (Nauen, 2007). C'est un phénomène qui apparaît dans un groupe d'individus au sein d'une population d'êtres vivants qui tentent de s'adapter de façon naturelle à la présence de produits nocifs dans leur environnement immédiat (CNEV-Ft, Fev2014). Le niveau de résistance dans les populations d'insectes vecteurs dépend non seulement du volume et de la fréquence de l'application d'insecticides utilisées contre ces dernières mais également des caractéristiques inhérentes aux espèces d'insectes concernées (Hemingway et Ranson, 2000). Deux facteurs sont essentiels dans le contrôle de la résistance chez les insectes : il s'agit de la durée du cycle de vie et de la capacité de l'espèce à avoir une progéniture abondante dans un temps record. Lorsque la durée du cycle de vie est longue et que la descendance n'est pas aussi abondante il est difficile à l'espèce de s'adapter facilement au changement des conditions de vie de son environnement. C'est le cas par exemple de la punaise et des mouches tsé-tsé longuement combattues avec la DDT et qui n'ont pas pu développer une résistance face à l'insecticide. Cependant, les vecteurs du paludisme ont un cycle de vie relativement court avec une progéniture abondante ce qui leur permet de s'adapter facilement à la présence des insecticides en développant des allèles résistants qui vont se propager de génération en génération. Plusieurs mécanismes biologiques interviennent dans le processus de la résistance des insectes aux insecticides. Il s'agit de la résistance comportementale, de la résistance cuticulaire, de la résistance liée à la séquestration des molécules toxiques, des résistances métaboliques et de la résistance liée aux mutations de cible. Un mécanisme de résistance qui permet à un insecte de résister face à un insecticide peut conférer à cet insecte une résistance à une autre classe d'insecticides : on parle de résistance croisée. Lorsque l'insecte utilise ou combine plusieurs mécanismes de résistances face à plusieurs composés chimiques, il s'agit d'une résistance multiple (Whalon *et al.*, 2008).

1.4.1.1. La résistance comportementale

C'est la première ligne de défense par laquelle les insectes évitent le contact avec les insecticides. Ils s'appuient sur trois facteurs à savoir le temps (décalage horaire), l'espace (évitement de la zone de l'insecticide) et l'alimentation (changement temporaire d'hôte) (Carrasco *et al.*, 2019). Au cours de ce processus de résistance, les moustiques prennent leur repas plus tôt le soir ou plus tard le matin c'est-à-dire à des heures où l'hôte humain n'est pas

sous protection. Les vecteurs endophiles deviennent temporairement exophiles ou zoophiles (Ferreira *et al.*, 2017).

1.4.1.2. La résistance cuticulaire

Deux mécanismes sont impliqués dans la résistance cuticulaire chez les insectes : L'épaississement de la cuticule et la modification de sa composition par la surexpression des gènes des protéines structurales, des enzymes et des transporteurs qui favorisent la translocation cuticulaire (Balabanidou, Grigoraki, et Vontas, 2018).

1.4.1.3. La résistance métabolique et la résistance liée à la séquestration des molécules

La résistance métabolique et la résistance liée à la séquestration des molécules est modulée par l'action de dégradation des enzymes dits enzymes de détoxification. Plusieurs enzymes sont impliqués dans ce processus : les estérases qui sont plus dans l'hydrolyse des molécules et la séquestration des liaisons ester, les mono-oxygénases dépendant du cytochrome P450 dans le métabolisme oxydatif et le glutathion-S-transférases dans la conjugaison et la déshydrochloration. La présence de l'un de ces enzymes chez un insecte rend compte du niveau de résistance de ce dernier aux insecticides.

1.4.1.4. La résistance liée aux mutations de cible

La résistance du site cible est le deuxième mécanisme de résistance couramment observé chez les insectes après la résistance métabolique. Le site d'action des classes d'insecticides (les DDT, les pyréthrinoides, les organophosphorés et les carbamates) se trouve au niveau du système nerveux des insectes (Corbel et N'Guessan, 2013). Plusieurs molécules du système nerveux interagissent avec les insecticides pour induire une cascade de réactions biologiques dans l'organisme de l'insecte. Les insecticides exercent leur effet adulticide sur les insectes lorsque les récepteurs de ces molécules au niveau du système nerveux de l'insecte sont accessibles à ces derniers. Une modification de la structure de ces récepteurs rend inactive l'action de l'insecticide. Ces modifications résultent souvent d'une mutation des gènes qui codent pour ces récepteurs. Les organophosphorés et les carbamates ont l'acétylcholinestérase comme site cible une enzyme indispensable dans le mécanisme de la transmission nerveuse. Plusieurs études ont rapporté que des mutations des gènes codants pour cet enzyme ont été retrouvées chez les insectes traduisant une sensibilité réduite de l'inhibition de l'enzyme par ces insecticides (Guo *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2015). Pour les vecteurs du paludisme, il s'agit d'une mutation G119S (substitution de la glycine à la sérine en position 119) (Ace-1) (Djogbénou *et al.*, 2007). Le second site cible des insecticides dont le DDT et les pyréthrinoides au niveau du système nerveux est le canal sodique voltage-dépendant. La

modification du canal sodique voltage-dépendant insensible aux insecticides est conférée par une mutation de la leucine en position 1014 par la phénylalanine (L1014F) ou par la sérine (L1014S)(Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; H. Ranson *et al.*, 2000). C'est une mutation appelée « résistance knockdown » (kdr) pour indiquer la capacité des insectes portant ces allèles à supporter une exposition prolongée d'insecticide sans être inquiétés (Donnelly *et al.*, 2009).

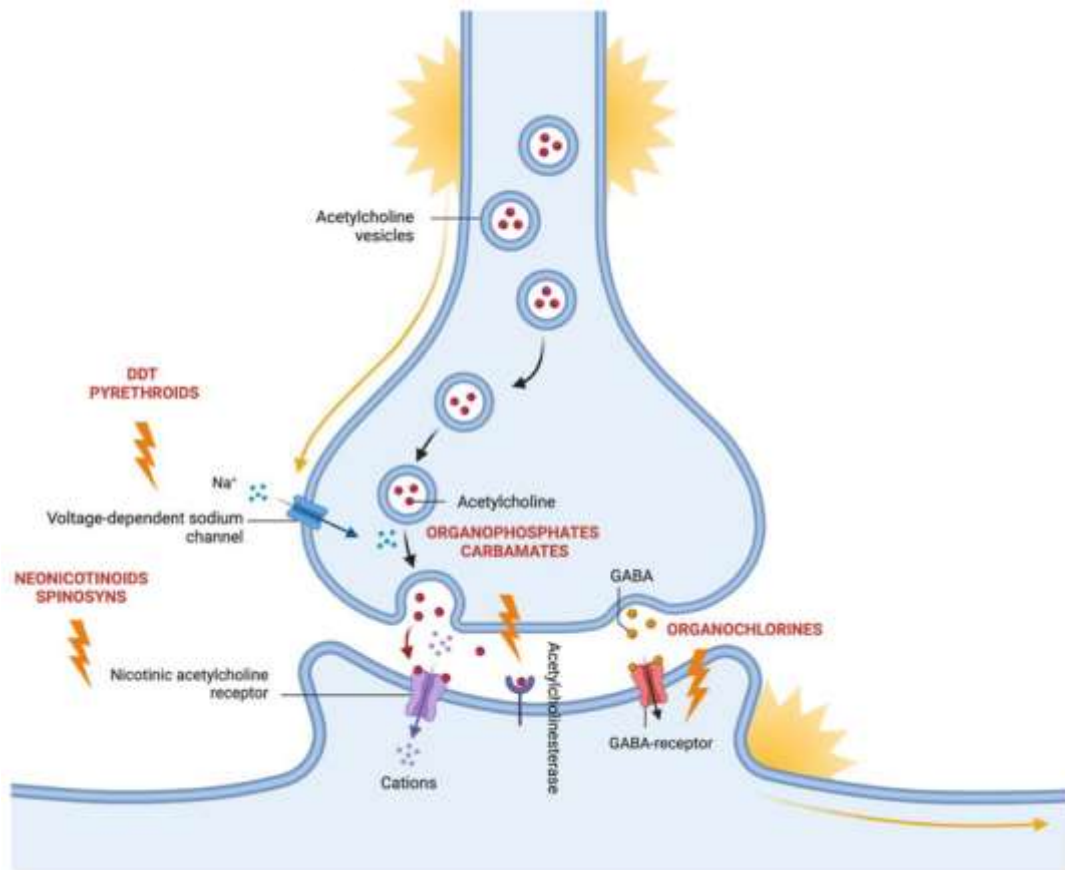


Figure 7: Schéma représentatif du mode d'action des insecticides neurotoxiques chez les insectes (Araújo *et al.*, 2023)

1.5. Plan de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme

Dans le souci de préserver les acquis obtenus face à la montée grandissante de la résistance des vecteurs aux insecticides surtout aux pyréthrinoides (WHO, 2011), des experts ont été sollicités par l’OMS en 2010 afin de réfléchir sur de nouvelles stratégies à adopter. L’objectif était de maintenir la sensibilité des principaux vecteurs impliqués dans la transmission du paludisme et d’envisager de nouvelles options de lutte antivectorielle. Au cours des assises, cinq grandes recommandations ont été faites (figure 8). De ces recommandations vont découler la sollicitation de nouveaux insecticides dits de nouvelle génération dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs.

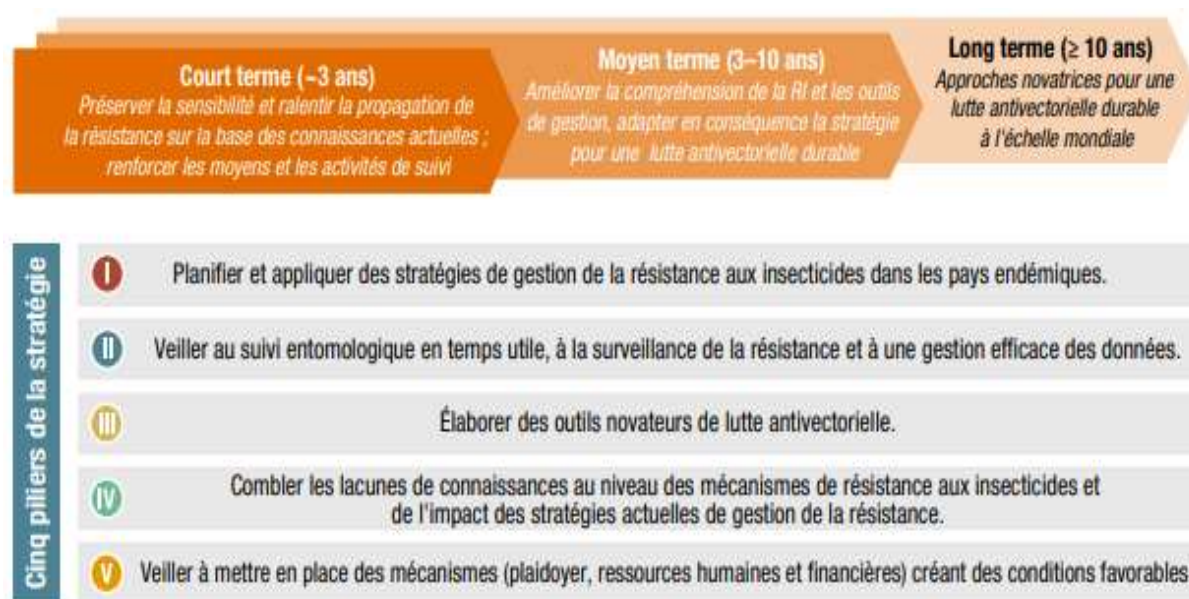


Figure 8: Cinq piliers du plan mondial de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides (WHO, 2012)

1.6. Les insecticides de la nouvelle génération

Trois grandes familles d’insecticides de nouvelle génération ont été évaluées dans cette étude dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides classiques. Il s’agit des néonicotinoides représentés par la clothianidine, des pyrroles représentés par le chlorfenapyr et des juvénoides dont le pyriproxifène. Selon le rapport OMS 2022, le statut de résistance des vecteurs du paludisme sur ces nouveaux insecticides sont soit indéterminé ou très peu documenté au Bénin et en Afrique de façon générale. Il est donc nécessaire d’avoir de plus amples informations sur le statut de résistance des vecteurs à ces nouveaux produits de lutte dont la plupart seraient utilisés en agriculture. Ces informations serviront à prendre des

décisions plus adéquates quant au déploiement des outils de lutte à base de ces nouveaux produits dans la gestion de la résistance des vecteurs du paludisme.

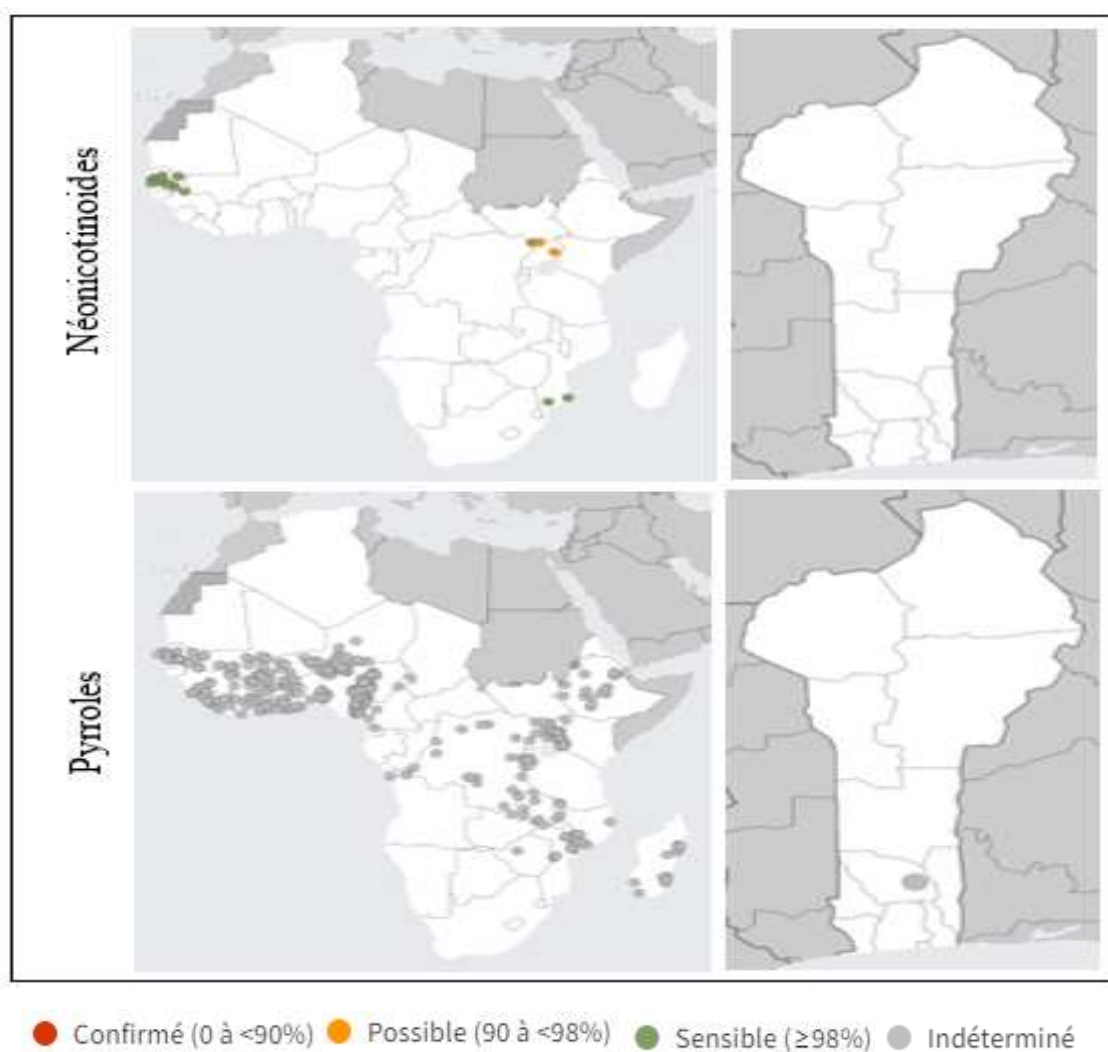


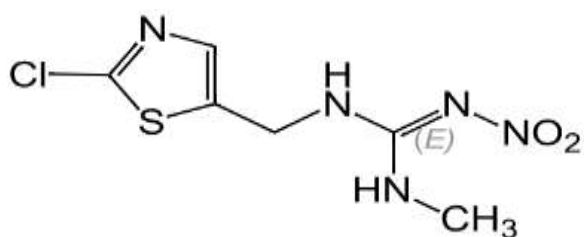
Figure 9: Statut de résistance des vecteurs aux insecticides de nouvelle génération en Afrique et au Bénin de 2010 à 2022 (WHO, 2022)

1.6.1. Les néonicotinoides

Les néonicotinoides sont des insecticides dont la structure chimique s'apparente à celle des nicotine. Ils sont beaucoup plus connus en agriculture dans la protection des plantes mais sont également utilisés pour protéger les animaux des puces et d'autres insectes nuisibles et ravageurs (Matsuda *et al.*, 2001). A faible dose, ils sont très efficaces à tuer les insectes mais sont beaucoup moins toxiques pour les oiseaux et les mammifères (Tomizawa et Casida, 2005). Cependant, ils sont prudemment utilisés à cause de leur risque de toxicité pour les insectes pollinisateurs comme les abeilles (Taillebois *et al.*, 2018). Comme la plupart des insecticides, les néonicotinoides sont neurotoxiques et agissent sur le système nerveux central des insectes grâce à leur affinité aux récepteurs nicotiques (nAChR) postsynaptiques de l'acétylcholine (Perry *et al.*, 2021; Thany, 2023). Comme exemple d'insecticides néonicotinoides, nous avons : la clothianidine, l'imidacloprid, le dinotefuran etc... (Jeschke et Nauen, 2008).

1.6.2. La clothianidine

La clothianidine est un insecticide de la famille des néonicotinoides, un dérivé de la nitroguanidine développé conjointement par deux firmes pharmaceutiques (Sumitomo Chemical et Bayer). C'est une classe d'insecticide moins active sur le système nerveux des mammifères. Autrefois utilisée dans l'agriculture pour la protection des cultures contre une grande variété d'insectes nuisibles, elle s'est montrée très efficace dans la lutte contre les Hémiptères, les Thysanoptères, les Coléoptères, les Lépidoptères et les Diptères (Uneme, 2011a).

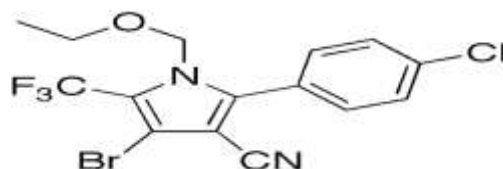


Structure chimique de la clothianidine (Uneme, 2011b)

1.6.3. Les pyrroles

Le chlorfénapyr, un nouvel insecticide de la classe des pyrroles est développé à partir de produit naturel dioxapyrrolomycine isolé de *Streptomyces fumanus*. Il est la matière active des produits à usage commercial Pylon (insecticide acaricide) et Mythic (insecticide). Il est considéré au départ comme un pesticide couramment utilisé dans l'agriculture contre les acariens et les termites mais également pour la protection des cultures (coton, fruits, légumes etc...) contre une variété d'insectes nuisibles (Pimprale *et al.*, 1997; Ullah, Shah, et Shad,

2016). C'est une molécule non dangereuse pour les mammifères avec une faible toxicité selon les critères de l'OMS (Tomlin, 2009; Ingham *et al.*, 2012). C'est un produit non neurotoxique, à action lente avec des propriétés insecticides puissantes (Athanasios *et al.*, 2014). Il perturbe les voies respiratoires et les gradients de protons par le découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Black *et al.*, 1994). Par cette action, il empêche la production d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) cellulaire et provoque la mort de l'insecte (McLeod *et al.*, 2002).

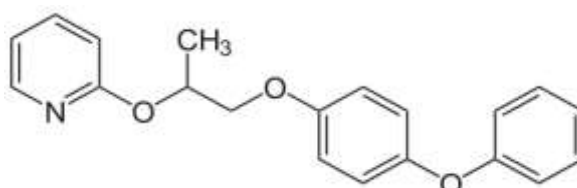


Structure chimique du chlorfénapyr (Edgar181, 2007)

1.6.4. Les juvénoides ou insecticides analogues de l'hormones juvénile

Les analogues des hormones juvéniles (AHJ) ou hormones juvénile synthétiques sont des perturbateurs endocriniens qui interfèrent avec l'activité hormonale des insectes dont l'action est d'imiter les deux hormones naturelles de croissance et de développement: la 20-hydroxyecdysone stéroïdienne (20E) et l'hormone juvénile (HJ) sesquiterpénoïde (Hu *et al.*, 2020). Ces dernières sont impliquées dans le processus biologique de la mue chez les insectes et dans d'autres fonctions dont la vitélogénèse, la production d'œufs et la reproduction chez les femelles (Lin *et al.*, 2015). Les HJ sont sécrétées dans le corpora allata et se diffuse dans tout l'organisme de l'insecte tout au long de la phase larvaire. Elles ont pour rôle principale de maintenir les caractères juveniles (larvaires) chez l'insecte. Au dernier stade larvaire, la concentration en HJ diminue progressivement pour laisser place à une autre hormone sécrétée dans le corpora cardiaca : il s'agit de l'ecdysone (Jindra et Bittova, 2020). Cette dernière est impliquée dans le processus de mue et de métamorphose conjointement avec une autre hormone appelée hormone de mue (HM) (Yamanaka, 2021). La concentration en HJ est un facteur déterminant pour la mise en place du processus de mue chez l'insecte alors que pour tout processus de métamorphose, elle doit être quasiment nulle. C'est sur ce facteur que va agir plusieurs AHJ dont le pyriproxifène dont le rôle est de maintenir les caractères juveniles chez les insectes qui meurent atrophiés (Mishra et Singh, 2022). En raison de leur mode d'action particulier et de leur faible toxicité pour les mammifères, ils sont considérés pour leurs propriétés insecticides. Ils sont aujourd'hui utilisés dans l'agriculture pour la protection des cultures contre les insectes nuisibles mais également dans les ménages contre des puces des animaux afin de prévenir les zoonoses (Nm *et al.*, 2016). Au cours de ces dernières

années, leur pouvoir insecticide est également reconnu en santé publique dans la lutte contre les moustiques vecteurs de plusieurs maladies (Fowler *et al.*, 2021).



Structure chimique du Pyriproxyfène (NEUROtiker, 2008)

Mécanisme d'action

Le pyriproxyfène est un larvicide qui tue les insectes plus lentement que les insecticides traditionnels. C'est un régulateur de croissance chez les insectes. Il contrôle le développement post-embryonnaire en s'interférant dans les différentes phases de développement de ces derniers. Deux hormones sont principalement impliquées dans la croissance et le développement chez les insectes. L'hormone juvénile sécrétée en quantité suffisante juste à l'éclosion de l'œuf est chargée d'assurer le développement larvaire de l'insecte. Au fur et à mesure que la larve grandit en taille et en volume, la quantité de HJ diminue pour disparaître au stade final du développement de la larve laissant place à l'ecdysone une autre hormone impliquée dans la métamorphose de l'insecte. Etant un analogue de HJ, le pyriproxifène imite cette dernière en maintenant les caractères juveniles chez l'insecte qui finit par mourir incapable de poursuivre son développement. De ce fait, il contrôle la vitellogénèse et l'ovogénèse chez la femelle. Le pyriproxyfène perturbe le développement larvaire en provoquant une mue prématurée des jeunes stades immatures en adulte non fonctionnel (Invest et Lucas, 2008). Tout récemment il a été démontré que le pyriproxyfène en plus de son effet sur la reproduction affecte d'autres organes comme c'est le cas chez *Ceraeochrysa claveri* par altération de l'intestin moyen, du corps gras et un stress oxydatif provoqué par la production de super oxyde mitochondrial (Scudeler *et al.*, 2022). Il a également un effet ovicide chez les insectes adultes. Il affecte soit le dépôt du vitellus dans l'ovocyte ou la formation du blastoderme (Palma *et al.*, 1993).

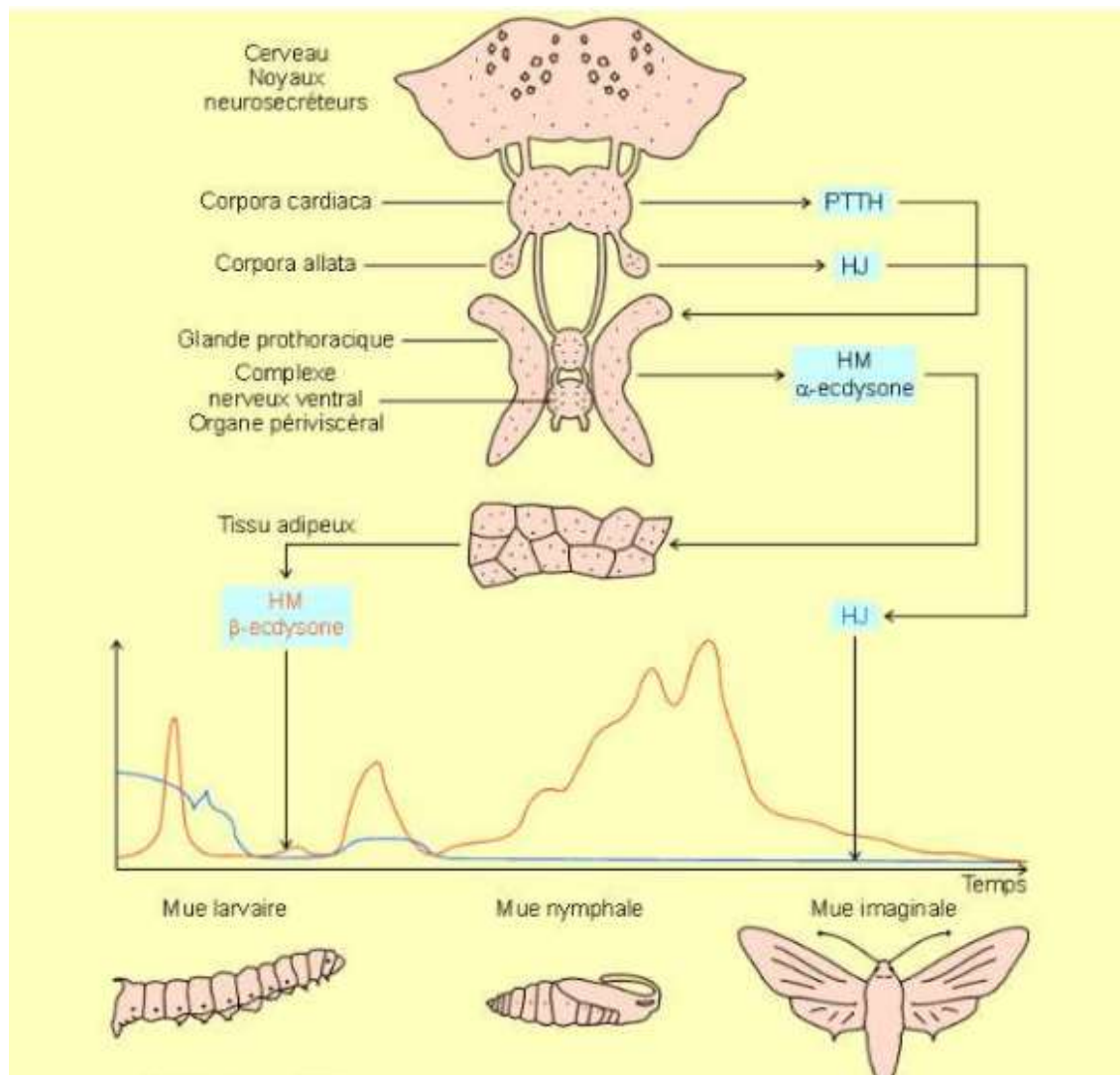
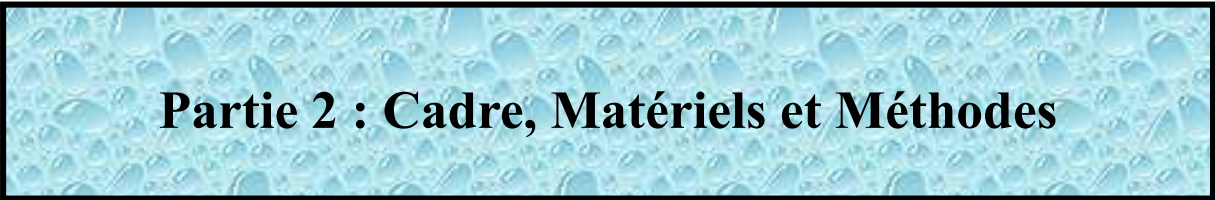


Figure 10: Implication des HJ et de l'ecdysone dans le développement des insectes



Partie 2 : Cadre, Matériels et Méthodes

2. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée au Sud, au Centre et au Nord du Bénin en raison de la généralisation de la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides (Gnanguenon *et al.*, 2015; Koukpo *et al.*, 2019). Le Bénin est caractérisé par trois principales zones climatiques réparties comme suit : le Sud caractérisé par un climat subéquatorial avec deux saisons pluvieuses (Avril - Juillet et Octobre - Novembre) et deux saisons sèches (Août - Septembre et Décembre - Mars). La température, relativement élevée varie entre 24°C et 32°C. Les précipitations sont en moyenne de 1200 mm par an. Le Centre qui est zone soudano – guinéenne jouit d'un climat tropical semi – humide avec une saison pluvieuse (Avril - Octobre) et une saison sèche (Octobre - Avril). Le Nord, caractérisé par un climat tropical humide avec une saison pluvieuse (Mai - Octobre) et une saison sèche (Novembre - Avril). Se basant sur les différentes cultures agricoles pratiquées au Bénin en relation avec ces climats, quatre principales zones agroécologiques ont été définies dans le cadre de cette étude. Il s'agit de :

- ✓ **La zone lagunaire du Sud Bénin** qui prend en compte 4 communes à savoir : Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-novo et Allada.
- ✓ **La zone Céréalière du Centre Bénin** qui comprend 3 communes à savoir : Lokossa, Bohicon et Djidja.
- ✓ **La zone rizicole** qui prend en compte 2 communes dont Glazoué et Malanville.
- ✓ **La zone cotonnière** qui regroupe 4 communes dont Djougou, Bassila, Gogounnou et Banikoara.

2.1. La zone lagunaire

La collecte des larves a été réalisée à Ita-Soumba (commune d'Ifangni) ; à Akpro-Missérété (commune de Akpro-Missérété) ; à Gbodjè (commune de Porto-Novo) dans l'arrondissement central de de Allada (commune de Allada). Ces communes ont été choisies en fonction de l'agressivité des vecteurs du paludisme et de leur résistance généralisée aux pyréthrinoides dans le sud du Bénin (Yadouleton *et al.*, 2010 ; Sovi *et al.*, 2013). Ces sites ont un climat subéquatorial avec deux saisons des pluies et deux saisons sèches. Les communes d'Ifangni et d'Allada sont situées respectivement dans les départements du Plateau et de l'Atlantique, et Akpro-Missérété et Porto-Novo dans le département de l'Ouémé. Ifangni est une commune rurale où l'agriculture, l'artisanat et le commerce sont les principales activités. La pluviométrie annuelle totale de la région est de 1217,1 mm. Elle est traversée par le fleuve Igidi à l'est, ainsi la vallée de la commune est occupée par des forêts marécageuses qui offrent à la population l'opportunité de pratiquer des cultures de contre-saison, notamment le maraîchage

(RGPH4) 2013. La pluviométrie annuelle dans la commune d'Akpro-Missérété est comprise entre 1100 et 1300mm, tandis que celle de Porto-Novo est d'environ 1200mm avec une humidité très élevée (75%). Akpro-Missérété compte quelques rivières, marais, marécages et bas-fonds qui offrent aux habitants la possibilité de pratiquer des activités telles que le maraîchage et la pisciculture. A Porto-Novo, le commerce, la pêche et l'élevage sont les principales activités pratiquées (Marius, 2006). A Allada, la ville située au centre du département de l'Atlantique, les précipitations annuelles sont en moyenne de 800 à 1000 mm. Le réseau hydrographique est composé du fleuve Couffo et du lac Ahémé. Les principales activités sont l'agriculture, l'élevage et la pêche.

2.2. La zone Céréalière

Les collectes larvaires ont été réalisées dans l'arrondissement de Bohicon I de la commune de Bohicon et dans les arrondissements centraux de Djidja et de Lokossa. Bohicon et Djidja sont deux communes du département du Zou qui jouissent d'un climat subéquatorial de transition caractérisé généralement par deux saisons de pluie (Avril-Juin et Septembre-Novembre) et deux saisons sèches (Juillet-Août et Décembre-Mars). Le mois d'Août est le mois le plus frais de l'année favorable aux maladies telles que le paludisme, les infections respiratoires, la diarrhée et d'autres affections. Avec une superficie de 139 km² et une population de 171 781 habitants (RGPH4, 2013), la commune de Bohicon est limitée au Nord par la commune de Djidja, au Sud par la commune de Zogbodomey, à l'Est par la commune de Za-Kpota et à l'Ouest par la commune d'Abomey et la commune d'Agbangnizoun. La pluviométrie est de 1025mm/an avec une température qui varie de 25 à 32°C (Houngnihin, 2006). La commune de Djidja est la plus vaste commune du Zou avec une superficie de 2 184 km². Elle est limitée au Nord par la Commune de Dassa et de Savalou, au Sud par la Commune d'Abomey et de Bohicon à l'Ouest par la commune d'Aplahoué et la République du Togo et à l'Est par la Commune de Covè. La pluviométrie est en moyenne de 1300mm/an avec 145 Km de cours d'eau dont le fleuve zou et le fleuve couffo. La principale activité pratiquée à Bohicon et à Djidja est L'agriculture avec une forte production de maïs (Akomagni, 2006). Lokossa est une commune située au Nord-Ouest du département du Mono. Elle s'étend sur une superficie de 260 Km² et limitée au Nord par la commune de Dogbo au Sud par la commune d'Athiémé, à l'Est par la commune de Bopa et à l'Ouest par le territoire togolais. La population est estimée à 77065 habitants. Le climat est de type subéquatorial avec une pluviométrie qui varie entre 900 et 1100mm caractérisée par deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. Une saison sèche allant de novembre à mars et de juillet à Août et une saison pluvieuse allant de mars à juillet et du mois d'août au mois de novembre. Les principales affections dont souffre la population sont : le paludisme et les troubles digestifs dont le choléra. La commune est

traversée par environ 5 km de cours d'eau dont le plus grand est le fleuve Mono et également par plusieurs lacs dont le lac Togbadji, le lac Toho, le lac Doukon, le lac Djètoé et de nombreux marécages. La principale activité est l'agriculture avec principalement la culture de maïs (Djenontin, 2006).

2.3. La zone rizicole

Les prospections ont été réalisées à Affécia un quartier de l'arrondissement central de la commune de Glazoué et à Malanville, l'arrondissement central de la commune de Malanville. Glazoué est une commune au cœur du département des collines. Avec une superficie de 1750 km² et une population estimée à 90475 habitants, elle est limitée au Nord par Ouèssè et Bassila, au Sud par Dassa, à l'Est par Ouèssè et Savè et à l'Ouest par Bantè et Savalou. Le climat est de type subéquatorial avec une pluviométrie annuelle moyenne comprise entre 959,56 et 1255,5mm et une température moyenne variant entre 24 et 29°C. La Commune connaît deux saisons pluvieuses dont une petite et deux saisons sèches dont une petite également. L'hydrographie est constituée d'un important cours d'eau et plusieurs villages sont arrosées par le fleuve Ouémé mais également de plusieurs bas-fonds érodés souvent fertiles et propices à la culture du riz. L'agriculture est la principale activité pratiquée avec une forte production du maïs et du riz (Capo-chichi, 2006).

Avec une superficie de 3016 km² et une population estimée à 168 641 habitants, la commune de Malanville est limitée au Nord, par la république du Niger, au Sud, par les communes de Kandi et de Ségbana, à l'Ouest, par la commune de Karimama et à l'Est par la République Fédérale du Nigéria. Le climat qui y règne est de type Soudano Sahélien marqué par une saison sèche allant de Novembre à Avril et une saison pluvieuse allant de Mai à Octobre avec une pluviométrie moyenne annuelle de 750mm. Le vent dominant est l'harmattan soufflant de Novembre en Janvier avec des écarts de température variant entre 16 et 25 °C. La commune est traversée dans sa longueur (Est -Ouest), par le fleuve Niger avec ses affluents l'Alibori, la Mékrou et la Sota qui sont en crue durant les mois d'Août et de Septembre. Le fleuve Niger regroupe des bas-fonds exploitables dont 300 ha aménagés favorables à la production du riz principale activité agricole de la ville. D'autres produits vivrières dont le sorgho, le maïs, le mil sont cultivés mais également des produits maraichers dont l'oignon, la tomate, le pomme de terre, le piment et le gombo. Le paludisme, les infections respiratoires et les infections digestives sont les maladies les plus courantes à Glazoué et à Malanville avec beaucoup de cas d'enfants anémiés (Ahoyo adjovi, 2006).

2.4. La zone cotonnière

Les prospections larvaires dans la zone cotonnière ont été réalisées dans les communes de Djougou, de Bassila, de Gogounou et de Banikoara. Djougou et Bassila sont deux communes frontalières du département de la Donga et Gogounou et Banikoara deux communes du département de l'Alibori. Le paludisme est la principale maladie dont souffrent les populations de ces différentes communes suivies d'autres affections comme : les infections des voies respiratoires, les parasitoses, la méningite, le choléra, la diarrhée, les maux de ventre, les plaies, et des morsures de serpents.

Avec une superficie qui s'étend sur près de 3966 km², la commune de Djougou est limitée au nord par les communes de Kouandé et de Péhunco, au sud par la commune de Bassila, à l'est par les communes de Sinendé, de N'dali et de Tchaourou et à l'ouest par les communes de Ouaké et de Copargo. La population est estimée à 267812 habitants. Le climat est de type soudano-guinéen avec une saison de pluies (avril à octobre) et une saison sèche (octobre à avril). La moyenne annuelle des précipitations est comprise entre 1200 et 1300 mm. L'agriculture est la principale activité pratiquée dans la localité. Après la culture des produits vivriers dont l'igname et le sorgho, la culture de rente la plus produite est le coton. La commune de Bassila s'étend sur une superficie de 5.661 km² et est limitée au nord par les communes de Ouaké et de Djougou, au sud par les communes de Bantè et de Glazoué, à l'est par les communes de Tchaourou et de Ouèssè et à l'ouest par la république du Togo. La population est estimée à 130091 habitants. Le climat est de type soudano-guinéen avec une saison de pluies allant d'avril à octobre et une saison sèche allant d'octobre à avril. La moyenne annuelle de précipitation est comprise entre 1200 et 1300 mm. L'agriculture est la principale activité de la localité avec une forte production des tubercules (manioc et igname) suivis des produits vivriers. Comme à Djougou, la culture du coton occupe la première place au niveau des cultures de rente (Biaou, 2006).

La commune de Gogounou est située à l'entrée Sud du département de l'Alibori. Avec une superficie qui s'étend sur 4910km², sa population est estimée à près de 117523 habitants. La moyenne annuelle des précipitations est de 1100 mm avec une température moyenne qui oscille entre 18°C et 38°C. Le climat est du type soudano-Guinéen marqué par une saison pluvieuse de mai à octobre et une saison sèche et l'harmattan de novembre à avril. La commune est arrosée par deux grands cours d'eau dont la Sota et l'Alibori. L'agriculture est l'activité la plus pratiquée dans la commune. Après la culture du maïs du sorgho et du mil, le coton est la culture la plus pratiquée au niveau des cultures de rente (Bani, 2006).

La commune de Banikoara quant à elle est située au Nord-Ouest du Bénin. Elle est limitée au Nord par la Commune de Karimama, au Sud par les Communes de Gogounou et de Kérou, à l'Est par la Commune de Kandi et à l'Ouest par le Burkina Faso. Elle couvre une superficie de 4383 km² et une population estimée à près de 246575 habitants. Le climat est de type soudano sahélien avec une pluviométrie moyenne de 850 mm d'eau par an. Banikoara bénéficie d'une saison pluvieuse allant de mai à octobre et d'une saison sèche allant de novembre à avril. L'agriculture est la principale activité pratiquée dominée par une forte production du coton suivie des céréales et des tubercules (Bani, 2006a).

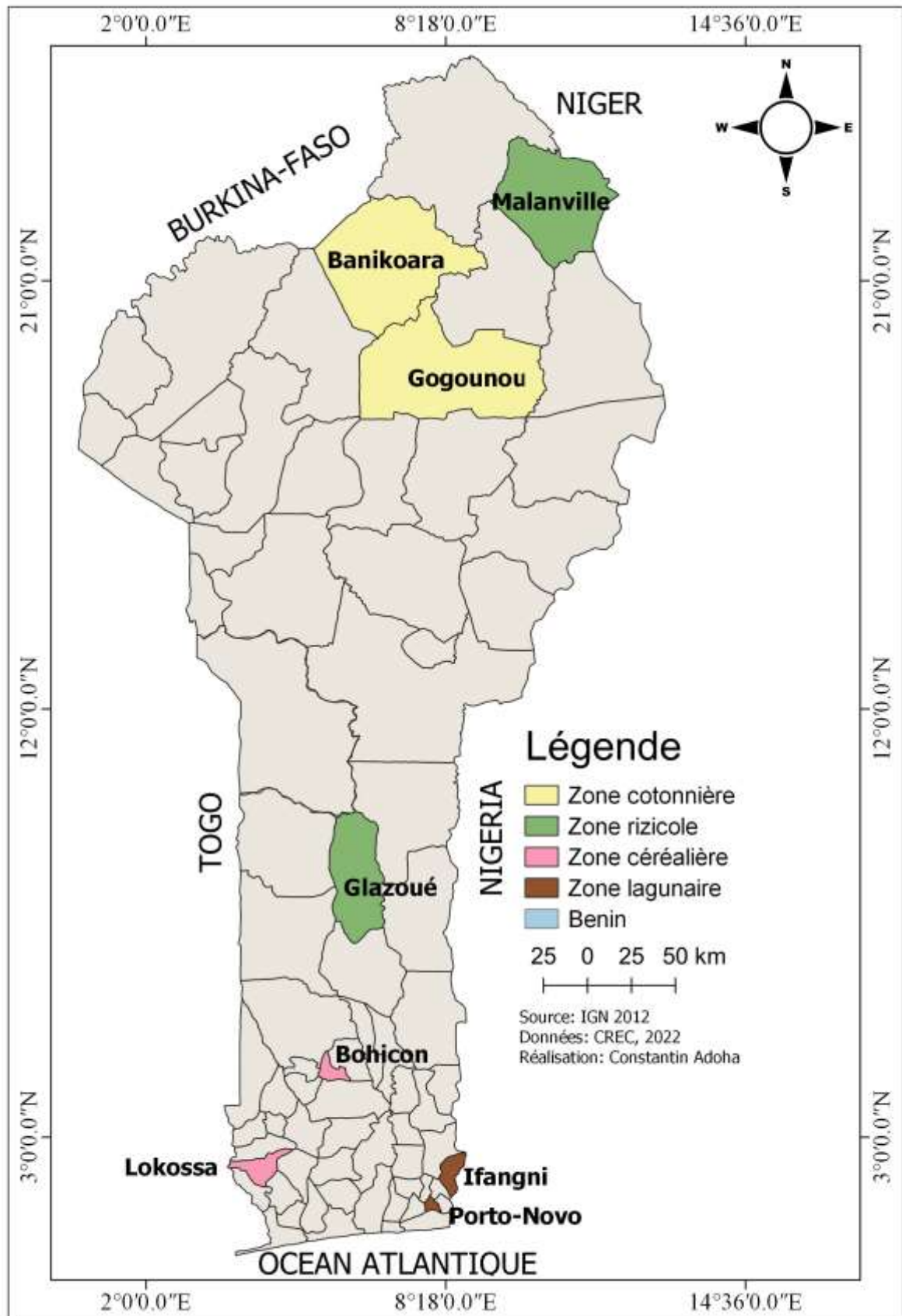


Figure 11: Zones d'étude

3. Matériels et Méthodes

3.1. Echantillonnage et élevage des vecteurs

La méthode d'échantillonnage a été essentiellement basée sur la prospection et la collecte des larves de *An. gambiae* s.l. dans toutes les zones agroécologiques étudiées.

3.1.1. Prospection larvaire

Les larves de *Anopheles gambiae* s.l. ont été collectées dans toutes les zones d'étude (figure 1) en utilisant les techniques standard de trempage (O'Malley, 1989). Elles ont été collectées dans les gîtes larvaires positifs à l'aide d'une louche (figure 3) et transportées à l'insectarium du Centre de Recherche Entomologie de Cotonou (CREC) pour élevage.



Figure 12: Collecte des larves dans différents gîtes larvaires (Cliché ZOUNGBEDJI, 2022)

3.1.2. Elevage des moustiques

Les larves obtenues au cours de la prospection sont conservées dans des bacs et nourries régulièrement au croquette de chat. Les nymphes obtenues quelques jours après la prospection larvaire ou même au cours de la prospection sont regroupées dans différentes cages et étiquetées où elles ont été élevées jusqu'à l'émergence des moustiques adultes. Ces derniers sont nourris tous les jours avec du coton imbibé de jus de sucre jusqu'à l'âge adulte, 3 à 5 jours ou même à une semaine selon l'exigence des tests à réaliser.

3.2. Caractérisation de la résistance chez *An. gambiae* s.l.

3.2.1. Tests de sensibilité en tube de l'OMS avec les pyréthrinoides

Les tests de sensibilité en tube de l'OMS ont été utilisés pour évaluer la sensibilité des populations de moustiques femelles de *Anopheles gambiae* s.l. âgés de 3 à 5 jours. Les tests ont été réalisés en exposant pendant 60 minutes, des lots de 20-25 moustiques aux papiers OMS imprégnés à la deltaméthrine 0,05%, à la perméthrine 0,75% et à l'alpha-cyperméthrine 0,05% pour évaluer la sensibilité des moustiques à ces insecticides. Des lots de 20-25 moustiques exposés à des papiers non imprégnés ont servi de témoins. Pour tous les tests effectués, le nombre de moustiques assommés par l'insecticide a été enregistré toutes les 15 minutes au cours de l'exposition. Les moustiques ont été transférés dans des tubes d'observation où ils ont été nourris avec une solution de sucre (10 %) pendant 24 heures. La mortalité a été lue 24h après exposition et les tests ont été réalisés sous une température de 25°C +/- 2 avec une humidité de 70% +/- 10 (WHO, 2017).

3.2.2. Détermination des gènes de résistance (Kdr *L1014F*, Ace-1 *G119S*) et des enzymes de détoxification au sein de la population naturelle de *An. gambiae* s.l.

3.2.2.1. Identification moléculaire des espèces au sein du complexe *An. gambiae* et des mutations Kdr et Ace-1

Des échantillons de 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*. Les génotypes des mutations Kdr *L1014F* et Ace-1 *G119S* ont été déterminés respectivement suivant les protocoles de Martinez-Torres *et al.* (1998) et de Weill *et al.* (2004). La fréquence allélique de ces deux mutations a été estimée sur chaque site suivant la formule suivante : $F = (2RR + RS) / (2(RR + RS + SS))$ afin de voir la corrélation existante avec la résistance phénotypique.

3.2.2.2. Identification des enzymes de détoxification au sein du complexe *Anopheles gambiae*

Un échantillon de 40 moustiques de *An. gambiae* s.l. de chaque localité issu directement des prospections larvaires a été utilisé pour des tests biochimiques. Après être assommés au froid, ils ont été déposés individuellement dans des plaques de 96 puits puis broyés sur de la glace afin d'empêcher la dégradation des enzymes. Le surnageant des broyats de moustique de chaque localité après centrifugation a été analysé pour la recherche des activités enzymatiques selon le protocole de Hemingway *et al.* (2004). Ainsi, les activités en Glutathion S-transférase (GST), en estérase et en Oxydases. Ces trois familles d'enzymes sont connus pour leur

activité de détoxification au sein des moustiques (Corbel *et al.*, 2007). L'activité de chaque enzyme est estimée à partir de la protéine totale et est comparée à celle de la souche sensible *Anopheles gambiae* Kisumu. A l'aide d'une pipette à multicanaux, différentes quantités du surnageant contenu dans les plaques sont prélevées en 2 répliques dans une autre microplaque pour le dosage des enzymes de détoxification. Selon l'activité enzymatique à mesurer, nous avons procédé de la façon suivante :

✓ **Détermination des oxydases**

20µl de broyat de moustiques en deux répliques ont été mis dans chaque puits. 80µl de tampon Potassium Phosphate (KHPO₄) 0,0625M pH=7,2 est ajouté au broyat de moustique puis 200µl d'une solution de tétraméthyl Benzidine (TMBZ) 0,25M pH=5,0 et 25µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène 3%. La plaque a été incubée pendant 1 heure et la lecture a été faite à 630 nm au spectrophotomètre.

✓ **Détermination des estérases non spécifiques**

10µl de broyat de moustiques en deux répliques sont mis dans chaque puits de plaque auquel sont ajoutés 90µl de tampon 1% Triton Phosphate Saline (PBS) pH=6,5. La plaque est laissée pendant 10 minutes à 25°C. 100µl d'une solution composée de alpha-Naphthyl acétate 0,3M (ou Bêta-Naphthyl acétate) et 2,5 µl de triton PBS pH=6,5 puis 7 µl d'eau ont été ajoutées. La plaque est incubée à nouveau pendant 30 minutes et a reçu 100µl d'une solution de Garnett Salt (FGBC). Après 10 minutes d'incubation à 25°C la lecture a été faite à 550nm.

✓ **Détermination des glutathion S-transférases**

10µl de broyat de moustiques en deux répliques sont mis dans chaque puits de plaque auquel sont ajoutés 200µl d'une solution de glutathion sous forme réduite (GSH) et de CDNB (1-chloro-2,4-Dinitrobenzène).

✓ **Détermination des protéines totales**

Sur la plaque, 10µl de broyat de moustique en deux répliques sont mis dans chaque puits de plaque. 200µl de solution composée de Coomassie et de Protéin Assay Reagent sont ajoutés au broyat. Après 5 minutes d'incubation de la plaque à 25°C, la lecture a été faite au spectrophotomètre à 590 nm.

3.3. Evaluation des insecticides de nouvelle génération

3.3.1. Essai biologique en bouteille CDC avec le chlorfénapyr

Le test de sensibilité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. et de la souche sensible d'*Anopheles gambiae* s.s. (Kisumu) élevée à l'insectarium a été réalisé avec le test biologique en bouteille CDC. Des bouteilles Wheaton en verre de 250 ml et leurs bouchons ont été enduites avec 1 ml d'une solution de chlorfénapyr ayant une concentration de 100 µg/ml. Une bouteille témoin a été enduite de 1 ml d'acétone et recouverte comme les bouteilles tests pendant 24h pour séchage. A l'aide d'un aspirateur mécanique, des lots de 20 à 25 moustiques ont été transférés dans les bouteilles tests et témoin pour une exposition pendant 60 minutes. L'abattement a été lu toutes les 15 minutes au cours des 60 minutes d'exposition à l'insecticide. Les moustiques ont été retransférés dans des gobelets d'observation, voilés et munis d'un coton légèrement humidifié contenant une solution de sucre à 10 %. La mortalité a été lue 1h après exposition (mortalité immédiate), 24 h, 48 h et 72h après (mortalité retardée). Les moustiques morts 1 heure après test ont été conservés dans la solution d'ARN later et stockés dans un congélateur à -80°C. Les moustiques morts après 24h, 48h et 72h ont été conservés dans des tubes Eppendorf de 1,5 contenant du coton et du gel de silice (OMS, 2022). La période de test et la température des 3 jours d'observation après l'exposition est de 26°C ± 2°C. L'humidité relative de la pièce était de 75% +/-10%.

3.3.2. Test en tube de l'OMS adapté avec la clothianidine (imprégnation de papiers filtres avec SumiShield)

SumiShield 50WG a été testé à l'aide des tests de sensibilité de l'OMS, avec des modifications mineures par rapport aux directives standard (WHO, 2022). Des papiers filtres Whatman® mesurant 12 cm sur 15 cm ont été traités avec des doses diagnostiques candidates de SumiShield 50WG (contenant 50% de CTD) diluées dans de l'eau distillée. Une solution mère a été préparée en diluant 264 mg de SumiShield 50WG dans 20 ml d'eau distillée. Deux millilitres de la solution mélangée ont été pipetés uniformément sur chaque papier filtre et conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Le papier filtre traité avec 2 ml d'eau distillée a été utilisé comme contrôle négatif. Le temps d'exposition pour la CTD a été fixé à 60 minutes. Après l'exposition, les moustiques ont été transférés dans des tubes d'observation garnis de papier non traité (25°C et 80% d'humidité) avec un libre accès au jus de sucre (solution de sucre à 10%) et changés quotidiennement. L'abattement a été enregistré à 30 min et 60 min. La mortalité a été enregistrée à 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours après l'exposition (Oxborough *et al.*, 2019).

3.3.3. Evaluation de l'impact du pyriproxifène sur la reproduction des populations de *Anopheles gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoides

3.3.3.1. Impact du pyriproxifène sur la fertilité des populations de *Anopheles gambiae* s.l.

Propriétés stérilisantes du pyriproxifène avec les tests en cône sur la moustiquaire Royal Guard

La bio efficacité de la moustiquaire Royal Guard (PPF-LLIN) a été évaluée à l'aide du test biologique en cône de l'OMS (WHO, 2022). La moustiquaire Interceptor (Alpha-cyperméthrine LLIN) a servi de témoin positif et une moustiquaire non traitée a servi de témoin négatif dans cette étude. Le test a été réalisé sur des populations adultes de *Anopheles gambiae* s.l., 12 heures après leur deuxième repas de sang. Des lots de 5 moustiques bien nourris ont été exposés pendant 3 minutes à des échantillons de chaque type de moustiquaire. Au total, 50 moustiques ont été utilisés par moustiquaire. Après exposition, les moustiques ont été transférés et nourris (jus de sucre) dans des gobelets voilés et étiquetés avec l'Identité de l'échantillon de la moustiquaire et la position (toit ou côté). La mortalité a été enregistrée 24, 48 et 72 h après l'exposition. Les moustiques survivant 72 h pour chaque type de moustiquaire ont été disséqués et les données sur l'état de développement des œufs dans les ovaires de chaque moustique selon les stades de Christopher ont été rapportées. Les moustiques fertiles, infertiles et non concluants ont été enregistrés sur une feuille d'enregistrement de données et des photographies des ovaires ont été prises avec un appareil photo (figure 4).

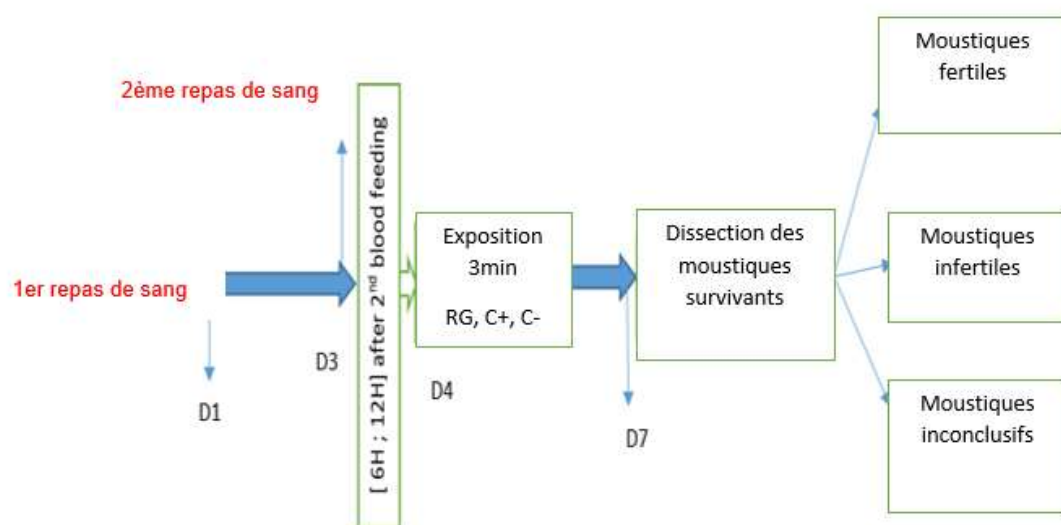


Figure 13: Schéma conceptuel de l'étude sur l'impact du pyriproxifène sur la fertilité chez *Anopheles gambiae* s.l. (ZOUNGBEDJI, 2022)

3.3.3.2. Impact du pyriproxyfène sur la fécondité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoides

La quantification de l'inhibition de la ponte des femelles d'*Anopheles gambiae* s.l. nécessite 200 moustiques collectés sur le terrain et 200 moustiques sensibles provenant d'une colonie de laboratoire (WHO, 2022). Les populations sauvages de *An. gambiae* s.l. de Ifangnin, de Djougou, de Malanville et la souche sensible Kisumu ont été utilisées. Des bouteilles Wheaton® de 250 ml avec bouchons ont été utilisées. Pour chaque souche de moustique, 4 flacons ont été recouverts de 1 ml d'acétone (pour les flacons témoins) et 4 autres de 1 ml de solution de PPF d'une concentration de 100 µg après dilution de la solution mère avec de l'acétone. Chaque flacon et son bouchon ont été étiquetés (nom, concentration d'insecticide, date), enveloppés dans du papier d'aluminium et laissés ouverts pour être séchés pendant 2 heures à l'air conditionné. Les moustiques femelles ont été laissés dans une cage pendant une semaine avec des mâles vigoureux pour favoriser une bonne insémination. Les femelles ont été nourries au sang une première fois le soir de leur septième jour et une seconde fois 48 heures après le premier repas sanguin. 12 heures de temps plus tard après leur deuxième repas de sang, les moustiques ont été introduits par lots de 20 à 25 dans les bouteilles de contrôle et de test pour une exposition d'une heure à la solution du PPF. Ils ont ensuite été transférés dans des gobelets en papier de 440 ml étiquetés, alimentés avec une solution de glucose (10 %) où la mortalité a été suivie et enregistrée toutes les 24 heures pendant 72 heures. Après la période d'attente, les moustiques vivants (contrôles et tests des deux souches) ont été transférés individuellement dans des gobelets en papier de 100 ml, (chambres de ponte contenant 30 ml d'eau distillée) recouverts d'une voile et nourris de glucose (10%). Ils ont été placés sous observation de ponte pendant 4 jours où la mortalité et les chambres de ponte positives (avec œufs) et négatives (sans œufs) ont été enregistrées pour le calcul du taux de ponte et du taux d'inhibition de la ponte. Les tests ont été réalisés sous une température de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec $75\% \pm 10\%$ d'humidité.

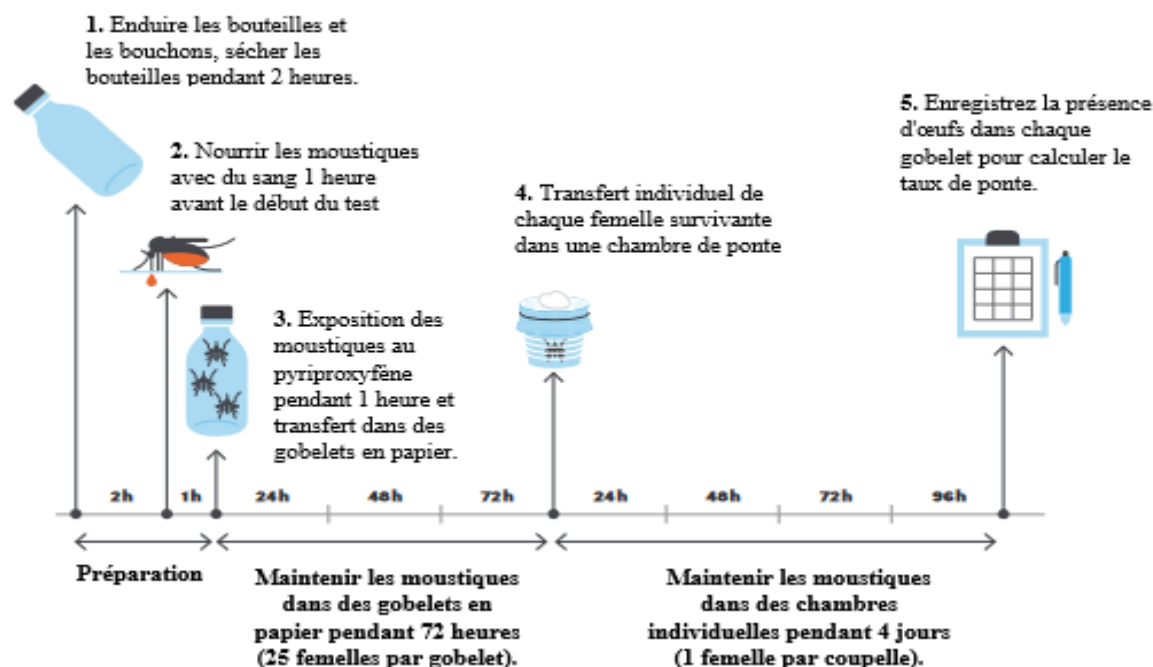


Figure 14: Schéma montrant l'impact du pyriproxyfène sur la fécondité des moustiques femelles de *An. gambiae* s.l. (WHO, 2022)

3.4. Techniques d'évaluation de la bio efficacité des moustiquaires de nouvelle génération (Olyset® Plus, PermaNet® 3.0, Royal Guard® et Interceptor® G2) sur les populations de *Anopheles gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoides.

3.4.1. Test en cône de l'OMS

Deux souches d'*Anopheles gambiae* s.l. : la souche sensible de laboratoire (Kisumu) et la souche sauvage de terrain sont utilisées pour évaluer la bio-efficacité des moustiquaires de nouvelle génération avec le test en cône de l'OMS (WHO, 2011). Dans la présente étude, 05 coupons de chaque moustiquaire ont été testés pour les moustiquaires Olyset® Plus, Royal Guard® et Interceptor® G2. Les coupons sont de 30 cm x 30 cm avec un coupon coupé sur le toit et les quatre autres sur les côtés latéraux. Pour la moustiquaire PermaNet® 3.0, 4 coupons ont été utilisés avec deux coupons sur le toit et deux sur les côtés latéraux (1 sur la longueur et 1 sur la largeur). Au total, 50 moustiques sont utilisés pour les moustiquaires Olyset® Plus, Royal Guard® et Interceptor® G2 et 40 pour PermaNet® 3.0. Chaque coupon de moustiquaire est étiqueté, emballé individuellement dans du papier d'aluminium et conservé au réfrigérateur avant le test. Deux cônes standards sont fixés à l'aide d'une plaque en plastique à chacun des coupons de moustiquaire. 05 femelles de *Anopheles gambiae* s.l. non nourries, âgées de 2 à 5 jours sont introduites dans chaque cône pendant 3 minutes. Après l'exposition, les moustiques sont retirés délicatement, transférés dans des gobelets, nourris avec du jus de sucre et placés sous observation pendant 72h. L'effet knock-down (moustiques

tombés sur le dos) a été lu toutes les 5 minutes et pendant 1 heure de temps d'observation et la mortalité après 24 h. Les tests biologiques sont réalisés à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $75\% \pm 10\%$ d'humidité.

3.4.2. Test en tunnel de l'OMS avec la moustiquaire Interceptor® G2

Les tests en tunnel ont été utilisés pour évaluer la bio efficacité de la moustiquaire Interceptor G2 (moustiquaire imprégnée avec le chlorfenapyr et l'alphacyperméthrine)(WHO, 2013). La moustiquaire Interceptor® (moustiquaire imprégnée avec l'alphacyperméthrine) a été utilisée comme control positif et une moustiquaire non traitée comme control négatif. Des moustiques femelles à jeun de *Anopheles gambiae* s.l. âgés de 5 à 8 jours ont été relâchés dans un tunnel carré de 60 cm (section carrée de $25\text{ cm} \times 25\text{ cm}$). Le tunnel est subdivisé en deux sections : la section A qui constitue les 2/3 du tunnel où s'effectueront les lâchées de moustiques et la section B qui constitue le 1/3 du tunnel où sera posé un appât immobilisé (Cobaye). A chaque extrémité du tunnel, une cage carrée de 25 cm de côté recouverte d'un filet en polyester est installée. L'échantillon de moustiquaire est placé juste après la section A. La surface de la moustiquaire disponible pour les moustiques est de 400 cm^2 ($20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$), avec neuf trous de 1 cm de diamètre. Cent (100) moustiques femelles laissés à jeun pendant au moins 6 heures de temps avant le test ont été introduits dans la cage par l'extrémité de la section A. Les tests sont réalisés dans les mêmes conditions avec trois tunnels différents. Un tunnel pour la moustiquaire IG2 ; un autre pour la moustiquaire Interceptor (control positif) et un autre pour la moustiquaire non traitée (control négatif). Après 12-15 h d'exposition, les moustiques ont été retirés de chaque section du tunnel. La mortalité et les taux de prélèvement sanguin ont été enregistrés. L'inhibition de la prise de sang est évaluée en comparant la proportion de femelles nourries au sang (vivantes ou mortes) dans les tunnels traités et les tunnels témoins. La mortalité globale est mesurée en regroupant les taux de mortalité des moustiques des deux sections du tunnel. Pendant les essais, les tunnels et les cages sont maintenus à $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $75\% \pm 10\%$ d'humidité relative, la nuit dans l'obscurité totale (WHO, 2011). Les moustiques vivants issus de chaque test sont repêchés à l'aide d'un aspirateur mécanique et introduits dans des gobelets voilés et étiquetés. Ces gobelets sont recouverts de jus de sucre et la mortalité des moustiques est suivie au bout de 72 heures.

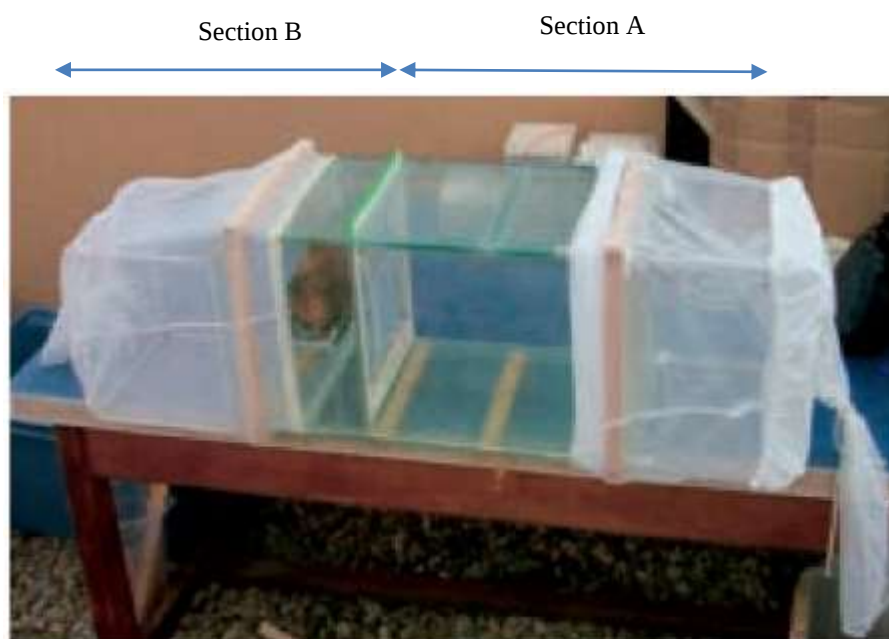


Figure 15: Image du dispositif de réalisation du test en tunnel

3.5. Paramètres mesurés et analyses statistiques

Sensibilité des différentes populations de moustiques aux insecticides :

Les taux de mortalité enregistrés 24 heures après exposition des populations de moustiques à la dose diagnostique des différents insecticides ont été interprétés selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO 2017):

- Un taux de mortalité $\geq 98\%$ compris entre 98 et 100% indique que la population de moustiques testée est sensible ;
- Un taux de mortalité inférieur entre 90 et 98% suggère une suspicion de résistance et nécessite des investigations supplémentaires ;
- Un taux de mortalité $\leq$ inférieur à 90% suggère la confirmation de l'existence de gènes de résistance dans la population testée.

Les fréquences alléliques de la mutation *Kdr* L1014F ont été déterminées par la formule suivante :

$$F = \frac{2RR + RS}{2(RR + RS + SS)}$$

Où RR est le nombre de moustiques homozygotes résistants, RS est le nombre de moustiques résistants hétérozygotes et SS est le nombre de moustiques homozygotes sensibles.

Le test binomial exact a été utilisé pour tester les fréquences de la mutation *Kdr* L1014F et calculer les intervalles de confiance pour les taux de mortalité et les fréquences de la mutation *Kdr* L1014F.

Afin de mieux évaluer la distribution des enzymes métaboliques de résistance des moustiques aux insecticides, l'approche analytique basée sur la comparaison du niveau d'expression par

zone a été utilisée. Le logiciel GraphPad Prism8 a été utilisé pour calculer les p-value et pour la réalisation des graphiques.

Sensibilité de *Anopheles gambiae* s.l. à la solution du PPF 100µg

Il a été analysé selon les critères de réalisation des tests Révisés par l’OMS en 2022.

➤ Critères de rejet des tests

Le test doit être rejeté si l'une des conditions suivantes est remplie :

- La mortalité chez les moustiques témoins de la souche sensible de laboratoire ou de la souche sauvage est $> 20 \%$ 72 heures après l'exposition.
- Le taux de ponte chez les moustiques témoins de la souche sensible de laboratoire ou de la souche sauvage est $\leq 30 \%$ à la fin du jour 7 après 1 heure d'exposition au pyriproxifène.
- L'inhibition de la ponte chez la souche sensible de laboratoire à la fin du jour 7 après 1 heure d'exposition au pyriproxifène est $< 98 \%$.

➤ Interprétation des résultats des tests

- **Résistance confirmée** : une population de vecteurs sauvages est considérée comme résistante au pyriproxifène si l'inhibition de la ponte est $< 90 \%$ à la fin du jour 7 après 1 heure d'exposition à la concentration discriminante du régulateur de croissance de l'insecte et si l'inhibition de la ponte chez la souche de moustique sensible (testé en parallèle) est $\geq 98\%$.
- **Résistance possible** : si l'inhibition de la ponte est $\geq 90 \%$ mais $< 98 \%$ à la fin du jour 7 après 1 heure d'exposition à la concentration discriminante et si l'inhibition de la ponte chez la souche de moustique sensible (testée en parallèle) est $> 98 \%$, la résistance en la souche sauvage est possible mais non confirmée. Les résultats du test doivent être confirmés en répétant le test avec un nouvel échantillon de la même population sauvage.
- **Sensibilité** : une population de vecteurs sauvages est considérée comme sensible au PPF si l'inhibition de l'oviposition après 1 heure d'exposition à la concentration discriminante est $\geq 98\%$ à la fin du jour 7 et l'inhibition de l'oviposition chez la souche de moustique de laboratoire sensible (testée en parallèle) est $\geq 98 \%$.

➤ Taux de ponte

- Le taux de ponte est la proportion de femelles qui pondent sur le nombre total de femelles chambrées après la période d'attente de 72 heures :

$$\text{Oviposition (\%)} = \frac{\text{Nombre de femelles ayant pondues d'œufs}}{\text{Nombre total de femelles mises en ponte}} \times 100$$

- La réduction du taux de ponte (inhibition de la ponte) est calculée en divisant le pourcentage de réduction du taux de ponte chez les femelles traitées par le pourcentage de réduction du taux de ponte chez les femelles témoins :

$$\text{Taux d'inhibition de ponte (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Oviposition (\%)} \text{ des femelles exposées au PPF}}{\text{Oviposition (\%)} \text{ des femelles du contrôle}} \right] \times 100$$

Classification des œufs selon Christopher's (Christophers, 1911)

Fertiles : Les œufs des femelles de *Anopheles gambiae* s.l. se sont complètement développées jusqu'au stade V de Christopher (œufs normaux en forme de bateau/saucisse avec flotteurs)

Infertiles : les œufs des femelles de *Anopheles gambiae* s.l. ne sont pas complètement développés et restent aux stades I à IV de Christopher (œufs ronds moins allongés sans flotteurs)

Non concluant : si les stades IV et V sont observés, ils ne sont pas concluants.

Bioefficacité des moustiquaires :

Les données sur la bio efficacité des moustiquaires testées avec les souches Kisumu et sauvages ont été analysées selon les critères de l'OMS avec les variables KD après 60 minutes et taux de mortalité après 24 heures.

Efficacité optimale : $KD_{60} \geq 95 \%$ ou mortalité fonctionnelle $\geq 80 \%$.

Efficacité minimale : $KD_{60} \geq 75 \%$ ou mortalité fonctionnelle $\geq 50 \%$.

Les indicateurs évalués par les tests en tunnel sont les suivants :

-Taux de gavage (%) = $(A/B) \times 100$, où A est le nombre de moustiques gavés de sang collectés dans le tunnel et B le nombre total de moustiques exposés à la moustiquaire imprégnée d'insecticide.

-Taux d'inhibition de la prise de sang (%) = $((C-D)) / C \times 100$, où C et D sont respectivement les taux de prise de sang obtenus avec les moustiquaires non traitées et les moustiquaires imprégnées d'insecticide.

-Mortalité immédiate (%) = $(E/F) \times 100$, où E est le nombre de moustiques morts collectés dans le tunnel juste après la période d'exposition de 12 heures, et F est le nombre total de moustiques exposés à la moustiquaire imprégnée d'insecticide.

-Mortalité à 24 heures (%) = $(G/H) \times 100$, où G est le nombre de moustiques morts 24 heures après l'exposition, et H, le nombre total de moustiques exposés à la moustiquaire imprégnée d'insecticide.

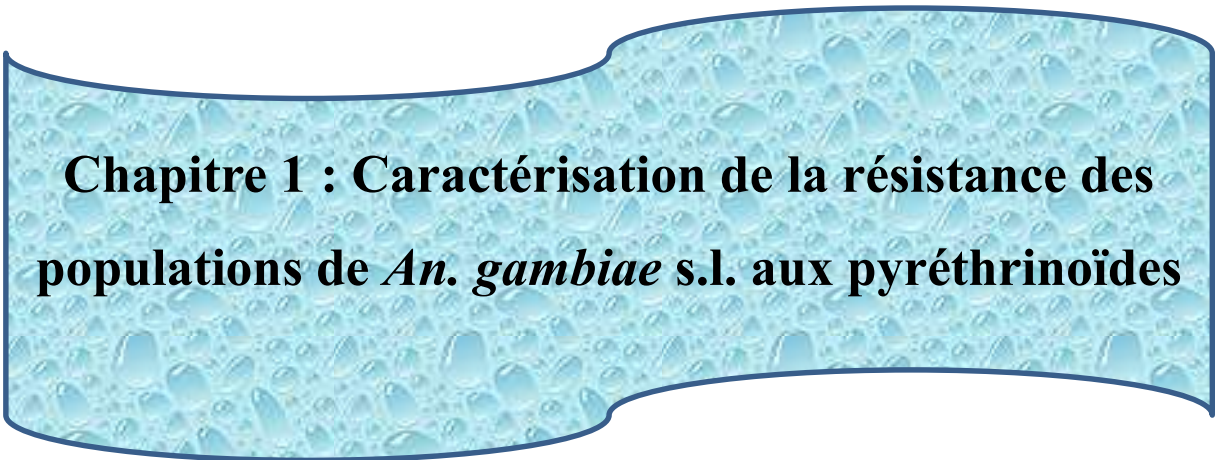
-Mortalité après 72 heures (%) = $(I/J) \times 100$, où I est le nombre de moustiques morts dans les 72 heures et J, le nombre total de moustiques exposés à la moustiquaire imprégnée d'insecticide.

3.6. Considérations éthiques

Cette étude ne présente aucun risque pour les populations des localités dans lesquelles les prospections larvaires ont été réalisées. Le matériel biologique utilisé ici est le vecteur *Anopheles gambiae* s.l. et les différents tests ont été réalisés dans le strict respect des normes de laboratoire.



Partie 3 : Résultats et Discussion



Chapitre 1 : Caractérisation de la résistance des populations de *An. gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes

Les études réalisées dans cette partie de la thèse ont été publiées dans l'**article 1** en annexe :

Article 1: Zoungbédji DM, Padonou GG, Konkou AK, Hougbe S, Sagbohan H, Kpanou C, Salako AS, Ossè R, Aïkpon R, Afoukou C, Sidick A, Akinro B, Chitou S, Gnanguénon V, Condo P, Hassani AS, Impoinvil D, Akogbéto M. Assessing the susceptibility and efficacy of traditional neurotoxic (pyrethroid) and new-generation insecticides (chlorfenapyr, clothianidin, and pyriproxyfen), on wild pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* from southern Benin. Malar J. 2023 Aug 26 ;22(1) :245. doi : 10.1186/s12936-023-04664-6. PMID : 37626366 ; PMCID : PMC10463682.

Statut de resistance des populations de *Anopheles gambiae* s.l. a l'alpha-cypermethrine a la permethrine et à la deltamethrine, mutations *Kdr* et *Ace-1R*

1. Contexte de l'étude

Au Bénin comme dans la plupart des pays endémiques, la lutte anti vectorielle (LAV) repose essentiellement sur deux principaux outils à savoir : la pulvérisation intra domiciliaire (PID) et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD). Ces deux moyens de lutte reposent sur quatre classes d'insecticides recommandés par l'OMS. A cause de leur faible toxicité pour les mammifères et de leur rapide biodégradabilité, les pyréthrinoides ont été la classe d'insecticide la plus utilisée (Elliott, 1976). Ils sont utilisés pour l'imprégnation des MIILD alors que les organochlorés, les carbamates et les organophosphorés sont connus dans la PID. Ces deux méthodes sont utilisées dans le but de limiter le contact entre l'homme et le vecteur et de réduire la durée de vie des femelles des moustiques afin de les empêcher de réussir leur cycle gonotrophique au cours duquel elles transmettent la maladie. En absence d'un vaccin sûr et efficace disponible, la PID et l'utilisation massive des MIILD ont été les deux moyens de prévention du paludisme reconnus par l'OMS et adoptés par les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Ces deux moyens ont permis de réduire le fardeau de la maladie et ont sauvé des milliers de vies en Afrique et dans le monde entier. Malheureusement, les principaux vecteurs du paludisme dont *Anopheles gambiae* s.l. sont devenus résistants aux différents insecticides utilisés. Cette résistance est beaucoup plus observée avec les pyréthrinoides, la classe d'insecticide la plus sollicitée. Plusieurs hypothèses soutiennent la survenue et la propagation rapide de ce phénomène. En dehors de celles liées à l'usage des produits insecticides en santé publique et dans les ménages, la plus incriminée est l'usage massif et incontrôlé des insecticides parfois de la même classe comme pesticide en agriculture. Une situation qui fait élargir l'aire de distribution de la résistance mettant ainsi en difficulté les stratégies de contrôle de la maladie. Deux principaux mécanismes connus et impliqués dans la résistance des vecteurs aux insecticides sont : les mutations des gènes observés au niveau des sites cibles et les mécanismes de surproduction des enzymes de détoxification des insecticides. La surveillance périodique de ces mécanismes est un impératif pour une bonne gestion de la résistance des vecteurs. Ce phénomène est signalé au Bénin il y a plusieurs années. Des études en ont déjà fait cas mais ont très peu pris en compte plusieurs et différentes zones agroécologiques. La résistance des vecteurs aux insecticides étant un phénomène dynamique, il est nécessaire dans ce premier chapitre de connaître le niveau de la fréquence des mutations *Kdr* et *Ace-1* dans différentes zones culturelles du Bénin, le niveau d'expression des oxydases,

des GST et des estérases en même temps avec le statut de résistance phénotypique des différentes populations de *Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoides. C'est dans ce cadre que trois insecticides de la classe des pyréthrinoides : l'alphacyperméthrine, la perméthrine et la deltaméthrine ont été évalués sur diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l.

2. Résultats

2.1. Sensibilité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. aux pyréthrinoides

Trois insecticides pyréthrinoides ont été utilisés dans le cadre de la surveillance de la résistance des vecteurs. Il s'agit de : l'alphacyperméthrine, de la perméthrine et de la deltaméthrine. Une diminution drastique des taux de mortalité a été observée après exposition des populations de *Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides et surtout avec la perméthrine. Ils ont varié entre 11,76% [5,79-20,57] et 53,13% [42,66-63,39] avec l'alphacyperméthrine, entre 9,89% [4,62-17,95] et 27,14% [17,20-39,10] avec la perméthrine et entre 9,20% [4,05-17,32] et 55,81% [44,70-66,52] avec la deltaméthrine. Ces différents taux (< 90%) sont très loin du seuil de sensibilité de l'OMS (>98%) pour toutes les populations testées indiquant une résistance élevée de toutes les populations d'*Anopheles gambiae* s.l. testées aux pyréthrinoides (Figure 5).

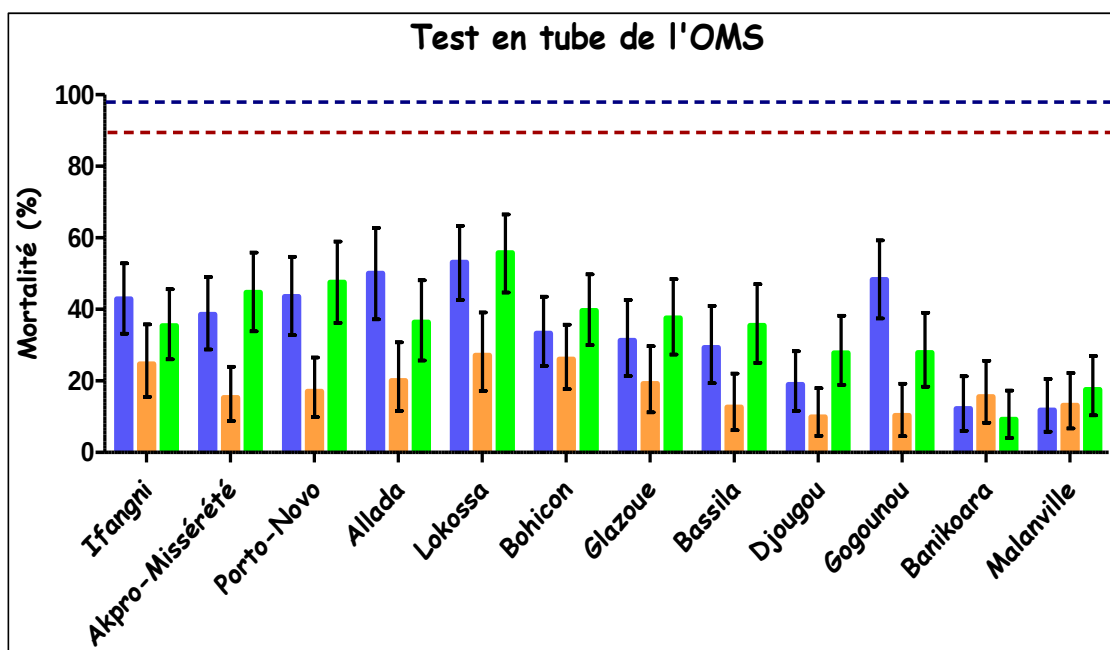


Figure 16: Taux de mortalité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. après exposition à trois insecticides pyréthrinoides

2.2. Sous espèces apparentées au complexe *Anopheles gambiae*

Trois espèces moléculaires (*Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles coluzzii* et *Anopheles arabiensis*) du complexe *Anopheles gambiae* de dix localités (Allada, Banikoara, Bassila, Djougou, Gogounou, Ifangni, Lokossa, Malanville, Akpro-Missérété et Porto-Novo) ont été identifiées dans cette étude. Sur un total de 596 *Anopheles gambiae* s.l. testés, *An. coluzzii* 50% [45,91-54,09] et *An. gambiae* s.s. 49,33% [45,24-53,42] sont les espèces les plus représentées. *An. arabiensis* 0,67% [0,18-1,71] est l'espèce la plus rare observée seulement dans deux communes et en faible proportion dans la commune de Gogounou 4% [0,49-13,71] et celle de Malanville 4% [0,49-13,71]. A Bassila, toutes les moustiques testés sont *Anopheles gambiae* s.s. alors qu'à Malanville et à Porto-Novo les moustiques testés sont composés respectivement de *Anopheles coluzzii*, de *Anopheles arabiensis* et uniquement de *Anopheles coluzzii* (Tableau 1).

Tableau 1: Distribution des espèces moléculaires du complexe *Anopheles gambiae* dans différentes communes étudiées

Communes	Nbre testé	Espèces moléculaires		
		<i>An.coluzzii</i> Nbre (%)CI	<i>An.gambiae</i> Nbre (%)CI	<i>An.arabiensis</i> Nbre (%) CI
Allada	50	12 (24) (13.06-38.17)	38 (76) (61.83-86.94)	0 (0) (0-7.11)
Banikoara	49	6 (12.24) (4.63-24.77)	43 (87.76) (75.23-95.37)	0 (0) (0-7.25)
Bassila	50	0 (0) (0-7.11)	50 (100) (92.89-100)	0 (0) (0-7.11)
Djougou	49	7 (14.29) (5.94-27.24)	42 (85.71) (72.76-94.06)	0 (0) (0-7.25)
Gogounou	50	39 (78) (64.04-88.47)	9 (18) (8.58-31.44)	2 (4) (0.49-13.71)
Ifangni	50	23 (46) (31.81-60.68)	27 (54) (39.32-68.19)	0 (0) (0-7.11)
Lokossa	99	50 (50.51) (40.27-60.71)	49 (49.49) (39.29-59.73)	0 (0) (0-3.66)
Malanville	50	48 (96) (86.29-99.51)	0 (0) (0-7.11)	2 (4) (0.49-13.71)
Akpro-Missérété	99	63 (63.64) (53.36-73.07)	36 (36.36) (26.93-46.64)	0 (0) (0-3.66)
Porto-Novo	50	50 (100) (92.89-100)	0 (0) (0-7.11)	0 (0) (0-7.11)
Total général	596	298 (50) (45.91-54.09)	294 (49.33) (45.24-53.42)	4 (0.67) (0.18-1.71)

2.3. Fréquence des mutations *Kdr* (L1014F) dans différentes populations de *Anopheles gambiae* s.l.

La mutation L1014F du gène *kdr* était très fréquente dans toutes les communes étudiées. Sur 646 moustiques collectés dans les onze localités testée, la fréquence de la mutation *Kdr* a tourné en moyenne autour de 86% [84-88] pour le complexe *Anopheles gambiae*. Aucune différence significative n'a été observée avec les espèces jumelles. Elle est de 88% [85-91] chez *Anopheles gambiae* s.s., de 84% [81-87] chez *Anopheles coluzzii* et de 75% [35-97] chez *Anopheles arabiensis*. Ces fortes fréquences observées sont médiées par la forte présence des moustiques avec les allèles homozygotes résistants montrant la forte résistance des populations d'*Anopheles gambiae* s.l. de toutes les zones agroécologiques étudiées (tableau 2).

Tableau 2: Fréquence des mutations *Kdr* au sein des populations de *Anopheles gambiae* s.l. étudiées

Communes/Espèces	Nbre testés	Génotypes <i>Kdr</i> L1014F			Fréquence <i>Kdr</i> (%)	IC
		1014F	1014F	1014L		
		1014F	1014L	1014L		
Allada	50	40	9	1	89	(81 - 94)
<i>An. coluzzii</i>	12	8	4	0	83	(63 - 95)
<i>An. gambiae</i>	38	32	5	1	91	(82 - 96)
Banikoara	49	44	4	1	94	(87 - 98)
<i>An. coluzzii</i>	6	4	2	0	83	(52 - 98)
<i>An. gambiae</i>	43	40	2	1	95	(89 - 99)
Bohicon	50	35	15	0	85	(76-91)
<i>An.coluzzii</i>	26	19	7	0	87	(74-94)
<i>An. gambiae</i>	24	16	8	0	83	(70-93)
Bassila	50	39	8	3	86	(78 - 92)
<i>An. gambiae</i>	50	39	8	3	86	(78 - 92)
Djougou	49	38	7	4	85	(76 - 91)
<i>An. coluzzii</i>	7	7	0	0	100	(77-100)
<i>An. gambiae</i>	42	31	7	4	82	(72 - 90)
Gogounou	50	40	7	3	87	(79 - 93)
<i>An. arabiensis</i>	2	1	1	0	75	(19 - 99)
<i>An. coluzzii</i>	39	31	5	3	86	(76 - 93)
<i>An. gambiae</i>	9	8	1	0	94	(73 - 100)
Ifangni	50	38	8	4	84	(75 - 91)
<i>An. coluzzii</i>	23	17	4	2	83	(69 - 92)
<i>An. gambiae</i>	27	21	4	2	85	(73 - 93)
Lokossa	99	80	13	6	87	(82 - 92)
<i>An. coluzzii</i>	50	37	8	5	82	(73 - 89)
<i>An. gambiae</i>	49	43	5	1	93	(86 - 97)
Malanville	50	35	11	4	81	(72 - 88)
<i>An. arabiensis</i>	2	1	1	0	75	(19 - 99)
<i>An. coluzzii</i>	48	34	10	4	81	(72 - 88)
Akpro-Missérété	99	73	19	7	83	(77 - 88)
<i>An. coluzzii</i>	63	45	14	4	83	(75 - 89)
<i>An. gambiae</i>	36	28	5	3	85	(74 - 92)
Porto-Novo	50	39	7	4	85	(76 - 91)
<i>An. coluzzii</i>	50	39	7	4	85	(76 - 91)
All area	646	501	108	37	86	(84-88)
<i>An. coluzzii</i>	324	241	61	22	84	(81-87)
<i>An. gambiae</i>	318	258	45	15	88	(85-91)
<i>An. arabiensis</i>	4	2	2	0	75	(35-97)

Nbre : Nombre, *An* : *Anopheles*, IC : Intervalle de confiance

2.4. Fréquence des mutations *Ace*-1R (G119S) au sein des populations de *Anopheles gambiae* s.l. étudiées

Pour ce qui concerne la distribution de la mutation *Ace*-1R, une faible fréquence de cette mutation a été observée globalement dans toutes les localités étudiées. Quelle que soit l'espèce moléculaire du complexe *Anopheles gambiae* la fréquence de la mutation *Ace*-1 tourne en moyenne autour de 5% [4 – 6] pour les deux espèces dominantes (*Anopheles gambiae* s.s. et *Anopheles coluzzii*) alors qu'elle reste encore nulle chez *Anopheles arabiensis*. Contrairement à la mutation *Kdr*, la fréquence de la mutation *Ace*-1 est médiée par des populations de moustiques avec les allèles hétérozygotes résistants. Les allèles homozygotes résistants du gène *Ace*-1 sont nuls pour tous les moustiques testés (tableau 3).

Tableau 3: Fréquence des mutations Ace-1R au sein des populations de *An. gambiae* s.l. étudiées

Districts/Species	Nbre tested	Ace1-R G119S genotypes			Ace-1R Frequency (%)	CI
		119S	119S	119G		
		119S	119G	119G		
Allada	50	0	3	47	3	(1 - 9)
<i>An. coluzzii</i>	12	0	1	11	4	(0 - 21)
<i>An. gambiae</i>	38	0	2	36	3	(0 - 9)
Banikoara	49	0	9	40	9	(4 - 17)
<i>An. coluzzii</i>	6	0	1	5	8	(0 - 38)
<i>An. gambiae</i>	43	0	8	35	9	(4 - 18)
Bassila	50	0	7	43	7	(3 - 14)
<i>An. gambiae</i>	50	0	7	43	7	(3 - 14)
Djougou	49	0	4	45	4	(1 - 10)
<i>An. coluzzii</i>	7	0	0	7	0	(0 - 23)
<i>An. gambiae</i>	42	0	4	38	5	(1 - 12)
Gogounou	50	0	7	43	7	(3 - 14)
<i>An. arabiensis</i>	2	0	0	2	0	(0 - 60)
<i>An. coluzzii</i>	39	0	7	32	9	(4 - 18)
<i>An. gambiae</i>	9	0	0	9	0	(0 - 19)
Ifangni	50	0	6	44	6	(2 - 13)
<i>An. coluzzii</i>	23	0	3	20	7	(1 - 18)
<i>An. gambiae</i>	27	0	3	24	6	(1 - 15)
Lokossa	99	0	9	90	5	(2 - 8)
<i>An. coluzzii</i>	50	0	2	48	2	(0 - 7)
<i>An. gambiae</i>	49	0	7	42	7	(3 - 14)
Malanville	50	0	4	46	4	(1 - 10)
<i>An. arabiensis</i>	2	0	0	2	0	(0 - 60)
<i>An. coluzzii</i>	48	0	4	44	4	(1 - 10)
Akpro-Missérété	99	0	6	93	3	(1 - 6)
<i>An. coluzzii</i>	63	0	6	57	5	(2 - 10)
<i>An. gambiae</i>	36	0	0	36	0	(0 - 5)
Porto-Novo	50	0	3	47	3	(1 - 9)
<i>An. coluzzii</i>	50	0	3	47	3	(1 - 9)
All area	596	0	58	538	4,87	(3,72 - 6,25)
<i>An. coluzzii</i>	298	0	27	271	4,53	(3 - 6,5)
<i>An. gambiae</i>	294	0	31	263	5,27	(3,61 - 7,4)
<i>An. arabiensis</i>	4	0	0	4	0	(0 - 0,37)

Nbre : Nombre, An : *Anopheles*, IC : Intervalle de confiance

2.5. Activités enzymatiques de diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l.

L'activité enzymatique des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. de 9 localités à savoir : Porto-Novo, Allada, Bassila, Djougou, Akpro-Missérété, Lokossa, Malanville, Gogounou et Bohicon a été déterminée en comparaison avec celle de la souche de référence sensible Kisumu.

Les oxydases

Une surproduction des oxydases a été observée dans la zone rizicole et cotonnière (Malanville, Bassila, Djougou et Gogounou) alors qu'aucune différence significative du niveau de production des oxydases n'a été observée entre les populations de *Anopheles gambiae* s.l. des zones lagunaires et céréalières (Porto-Novo, Allada, Akpro-Missérété, Lokossa et Bohicon) et celle de la souche sensible de référence Kisumu.

Les glutathion-s-transférases

Avec les GST, aucune différence significative n'a été observée entre les populations de *Anopheles gambiae* s.l. de Porto-Novo, de Djougou et de Malanville et celle de la souche sensible de référence Kisumu alors qu'on note une surproduction de cet enzyme dans la zone lagunaire (Allada et Akpro-Missérété) dans la zone céréalière (Lokossa et Bohicon) et dans la zone cotonnière (Bassila et Gogounou).

Les estérases

Une surproduction des α - estérases a été observée dans la zone lagunaire (Porto-Novo et Allada), dans la zone cotonnière (Djougou et Gogounou) et dans la zone céréalière (Bohicon). Quant au β -estérases, une surproduction a été observée dans la zone lagunaire (Porto-Novo, Allada et Akpro-Missérété), dans la zone céréalière (Lokossa et Bohicon) et dans la zone cotonnière (Djougou). Seules les populations de *Anopheles gambiae* s.l. de la zone rizicole sont épargnées de la surproduction des estérases.

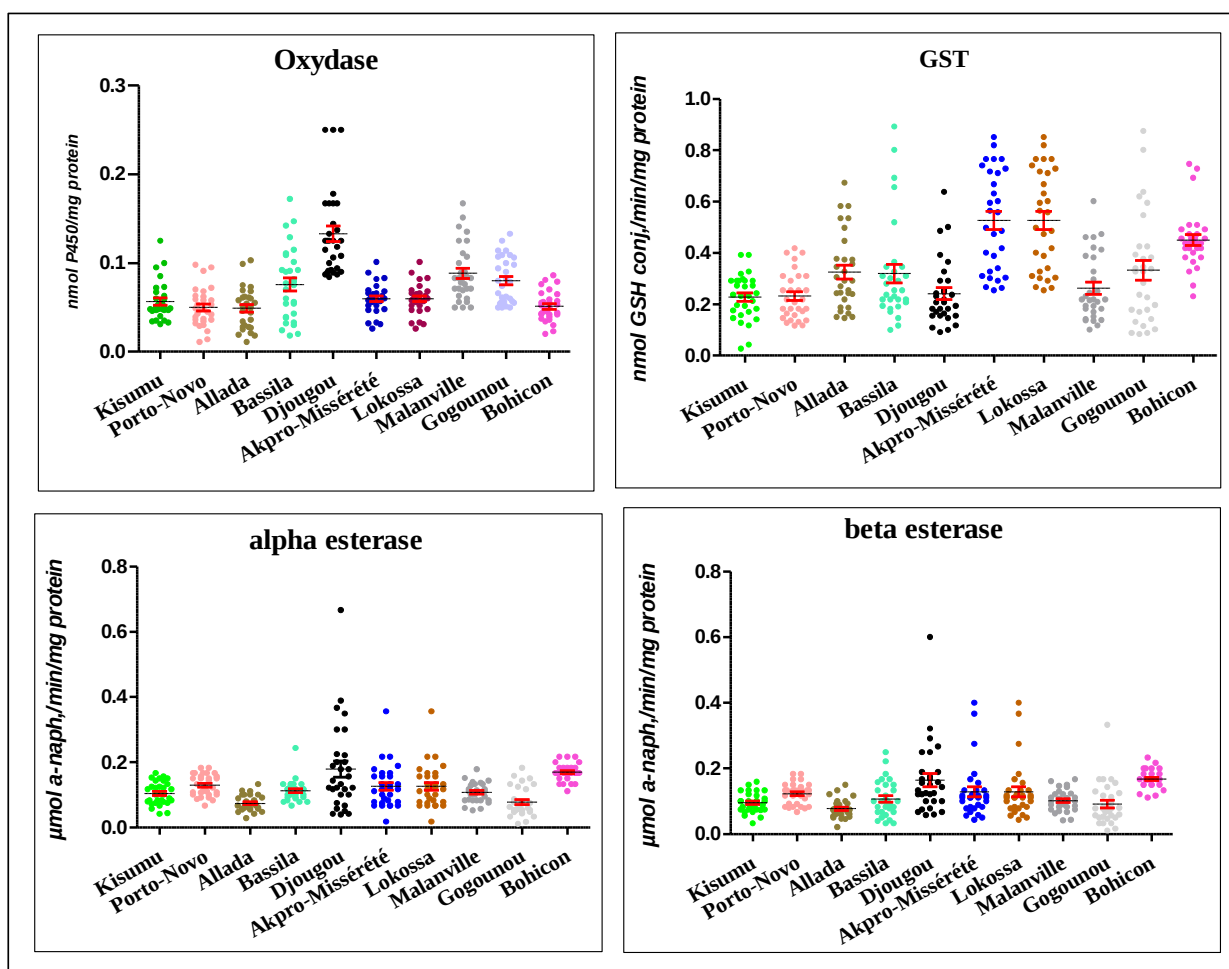


Figure 17: Expression des enzymes de détoxification chez diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l.

3. Discussion partielle

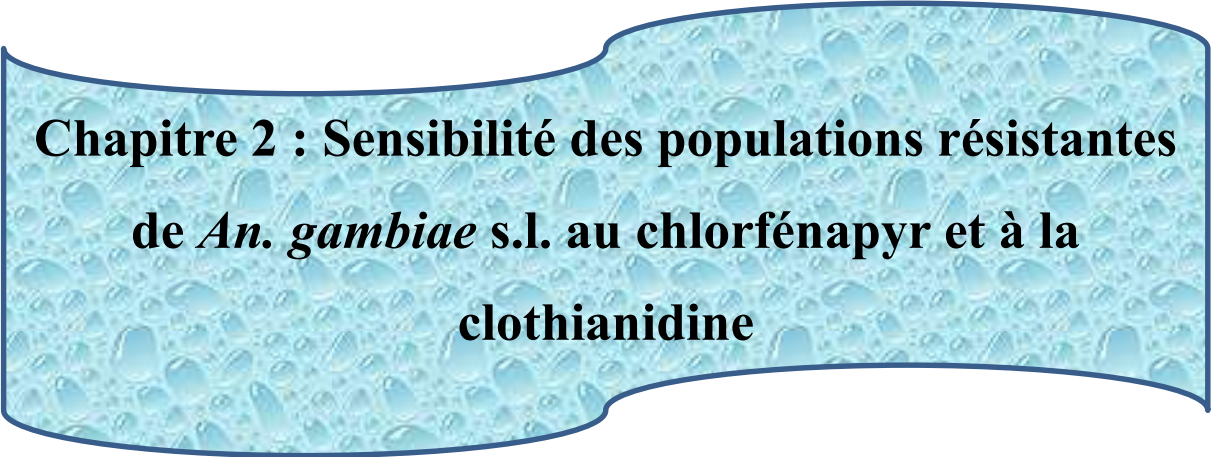
Le suivi de la résistance des vecteurs du paludisme de différentes zones agro-écologiques du Bénin a été réalisé avec trois insecticides pyréthrinoides : la perméthrine, l'alphacyperméthrine et la deltaméthrine. Les résultats de la présente étude ont montré que, quelle que soit la zone de culture considérée, la mortalité des différentes populations de moustiques observées avec ces trois insecticides pyréthrinoides était inférieure à 80 %, ce qui suggère que la résistance aux pyréthrinoides est largement répandue au Bénin, comme l'ont montré plusieurs études antérieures réalisées il y a une quinzaine d'années (Yadouleton *et al.*, 2009b; Padonou *et al.*, 2012). Des études récentes mettent en évidence l'obstacle que constitue le phénomène de résistance pour la réussite des stratégies de lutte antivectorielle (Koukpo *et al.*, 2019; Assogba *et al.*, 2020). Quatre zones de culture (lagunaire, céréalière, rizicole et cotonnière) ont été étudiées dans le cadre de la présente étude. Dans l'ensemble, les taux de mortalité dus aux insecticides pyréthrinoides étaient significativement plus faibles dans les

zones cotonnières (Banikora) et rizicoles (Malanville) que dans les autres. Cette forte intensité de la résistance des vecteurs aux insecticides pourrait s'expliquer par la forte pression insecticide que subissent ces zones dans le but de protéger les cultures contre les ravageurs et d'augmenter la productivité (Zhang *et al.*, 2011; Lamichhane, 2017; Tudi *et al.*, 2021). La forte résistance aux insecticides observée chez les vecteurs est également associée à des fréquences élevées de la mutation kdr L1014F, notamment dans les deux zones cotonnières (Banikoara : 94% et Gogounou : 87%). Des résultats similaires ont été récemment observés par Sagbohan *et al.* (2022), qui ont incriminé les pratiques culturales comme favorisant la sélection génétique et l'augmentation de l'intensité de la résistance aux insecticides. La fréquence de la mutation kdr L1014F était similaire chez *An. gambiae* et *An. coluzzii* dans toutes les zones agro-écologiques, ce qui est contraire aux travaux réalisés par Gnanguenon *et al.* (2014), et par Salako *et al.* (2018). Cette résistance observée est également renforcée par la surproduction d'oxydases dans les zones cotonnières et rizicoles (Gogounou et Malanville), ce qui suggère que les insecticides pyréthrinoides sont suffisamment utilisés dans les champs de coton et de riz (Philbert *et al.*, 2019) en santé publique et même pour des fins domestiques dans les localités concernées. Cette résistance s'est renforcée au fil du temps avec une augmentation progressive de la fréquence des mutations au sein de toutes les espèces du complexe *An gambiae*. L'utilisation des mêmes classes d'insecticides en santé publique et surtout en agriculture a été certainement l'une des principales causes de l'augmentation de la fréquence des gènes de résistance au Bénin (Gnanguenon *et al.*, 2015). La forte implication des enzymes de détoxification elargit les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides et compromet l'efficacité des MIILDs. La surproduction des oxydases dans la zone rizicole et cotonnière (Malanville, Bassila, Djougou et Gogounou) complique la performance des MIILDs imprégnée uniquement d'insecticide pyréthrinoides dans ces zones. L'expression des GST et des estérases est signe de l'implication d'autres mécanismes qui renforceraient la résistance des vecteurs aux différents insecticides utilisés. Le contact permanent des vecteurs avec la seule classe d'insecticide aurait beaucoup contribué à la sélection des gènes de résistance au sein de ces populations vectrices et la recherche de nouvelles molécules serait prometteuse pour la lutte antivectorielle.

4. Conclusion partielle

Les populations de *Anopheles gambiae* s.l. de toutes les localités étudiées sur le transect Sud-Nord du Bénin avec différentes zones agro-écologiques ont confirmé leur résistance aux différents insecticides pyréthrinoides utilisés jusqu'à présent dans la lutte antivectorielle. La résistance phénotypique a été observée avec trois insecticides pyréthrinoides (la perméthrine,

l'alphacyperméthrine et la deltaméthrine). Le taux de mortalité de *Anopheles gambiae* s.l. à ces insecticides se réduit considérablement au fil du temps. Les différents mécanismes qui sous-tendent la résistance des vecteurs sont complexes et méritent d'être étudiés en profondeur. Ceux qui ont fait l'objet de cette étude sont : les mécanismes liés à la mutation des gènes des sites cibles des insecticides (*Kdr* et *Ace-1*) et les mutations liées à la surproduction d'enzymes de détoxification. Comparativement aux études antérieures, la fréquence d'apparition de ces gènes au sein de la population vectrice a connu une augmentation fulgurante. Mieux, la forte fréquence observée chez toutes les espèces du complexe *An. gambiae* rend compte du niveau de propagation de ces gènes au sein de la population vectrice. La surproduction des oxydases, des GST et des estérases observées dans cette étude constitue un poids considérable et un support pour la résistance des vecteurs aux insecticides. Le contact massif et répété des moustiques avec les pyréthrinoides serait certainement à la base de l'émergence et de la propagation rapide des gènes de résistance. D'autres insecticides avec de nouvel mode d'action différents de celui des pyréthrinoides seraient donc nécessaires pour une meilleure gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides.



Chapitre 2 : Sensibilité des populations résistantes de *An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr et à la clothianidine

Les études réalisées dans cette partie de la thèse ont été publiées dans l'**article 2** en annexe :

Article 2 : David Mahouton Zoungbédji, Germain Gil Padonou, Alphonse Keller, Konkon, Albert Sourou Salako, Constantin Jesukèdè Adoha, Arsène Jacques YH Fassinou, Haziz Sina, Lamine Baba-Moussa, Martin Akogbéto. Evaluation of the susceptibility of *An. gambiae* s.l. to deltamethrin, chlorfenapyr and clothianidin in four agricultural areas of Benin. Int J Mosq Res 2023 ;10(3) :39-46. DOI: <https://doi.org/10.22271/23487941.2023.v10.i3a.677>

Evaluation de la sensibilité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. au chlorfénapyr et à la clothianidine

1. Contexte de l'étude

La forte résistance généralisée des vecteurs du paludisme aux insecticides est une situation préoccupante au regard des données statistiques vertigineuses que rapportent l'OMS sur la maladie chaque année. Des années d'études menées ont montré que le Bénin est caractérisé par une forte résistance des vecteurs aux insecticides (Yadouleton *et al.*, 2010; Padonou *et al.*, 2012; Kpanou *et al.*, 2021). L'exposition de diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l. à des doses d'insecticides (perméthrine, delataméthrine, alphacyperméthrine) 2 et 5 fois supérieures à la dose diagnostique n'a pas permis de tuer le nombre total de moustiques testés (Kpanou *et al.*, 2021). D'autre part, la combinaison de la dose diagnostique avec le PBO n'a que partiellement restauré la sensibilité, montrant une très forte résistance chez *An. gambiae* s.l. (Sagbohan *et al.*, 2021). Même si le phénomène de la résistance n'est pas encore cerné et compris dans son entièreté, les principaux mécanismes impliqués sont connus. Afin de préserver l'efficacité des outils de lutte anti vectorielle (LAV), il est nécessaire de maintenir sensible les principaux vecteurs impliqués dans la transmission du paludisme. Pour y parvenir, le choix des insecticides doit porter sur les insecticides ayant un site d'action différent de ceux contre lesquels les vecteurs ont déjà exprimé des gènes de résistance. En 2017, l'OMS a fait la recommandation de nouvelles molécules dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides. Parmi ces molécules figurent deux insecticides adulticides dont le chlorfénapyr et la clothianidine. Les insecticides connus dans la lutte anti vectorielle tels que les pyréthrinoides sont neurotoxiques. Le chlorfénapyr est un insecticide de la classe des pyrroles qui agit sur les voies respiratoires (Raghavendra *et al.*, 2011) de l'insecte alors que la clothianidine, un néonicotinoïde à son site d'action au niveau des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (Perry *et al.*, 2021). Ces nouveaux produits sont très peu connus en santé publique mais ont déjà fait leur preuve en agriculture. Etant donné que ces produits sont utilisés en agriculture et que les vecteurs du paludisme résistants peuvent partager les mêmes ères écologiques que les autres insectes, une résistance croisée pourrait se développer chez les moustiques. Dans cette étude, nous avons évalué la sensibilité de diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoides à ces deux molécules candidates afin de fournir assez de données sur le comportement des vecteurs en contact de ces nouveaux insecticides.

2. Résultats

2.1. Sensibilité des populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin au chlofénapyr

En raison du mode d'action lent du chlofénapyr, la mortalité après exposition des populations de *Anopheles gambiae* s.l. a été suivie pendant 3 jours contrairement aux autres insecticides classiques qui nécessitent une observation de 24h. Treize populations de *Anopheles gambiae* s.l. (Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-Novo, Allada, Lokossa, Bohicon, Djidja, Glazoué, Bassila, Djougou, Gogounou, Banikoara, Malanville) et la souche sensible kisumu ont été utilisées dans l'évaluation de cette molécule. Une parfaite sensibilité de toutes les populations de *Anopheles gambiae* s.l. a été observée après exposition à l'insecticide. Le seuil de la sensibilité (mortalité > 98%) est atteint déjà 24h après exposition avec la souche Kisumu 100% [96,38-100] et presque dans toutes les localités, à Ifangni 99% [94,55-99,97], à Porto-Novo 100% [96,45-100], à Allada 100% [96,23-100], à Lokossa 100% [96,61-100], à Bohicon 100% [96,38-100], à Djidja 100% [96,38-100], à Banikoara 100% [96,9-100], à Gogounou 100% [96,84-100], à Malanville 100% [96,15-100], à Glazoué 100% [96,61-100] et à Djougou 100% [96,82-100] avec la souche de terrain. La mortalité à Akpro-Missérété et à Bassila était respectivement de 97% [91,48-99,38] et de 96,88% [91,14-99,35] après 24H avant que la sensibilité ne s'observe après 48H (mortalité = 100%) pour ces deux localités et de ce fait pour toutes les localités étudiées (Figure 18).

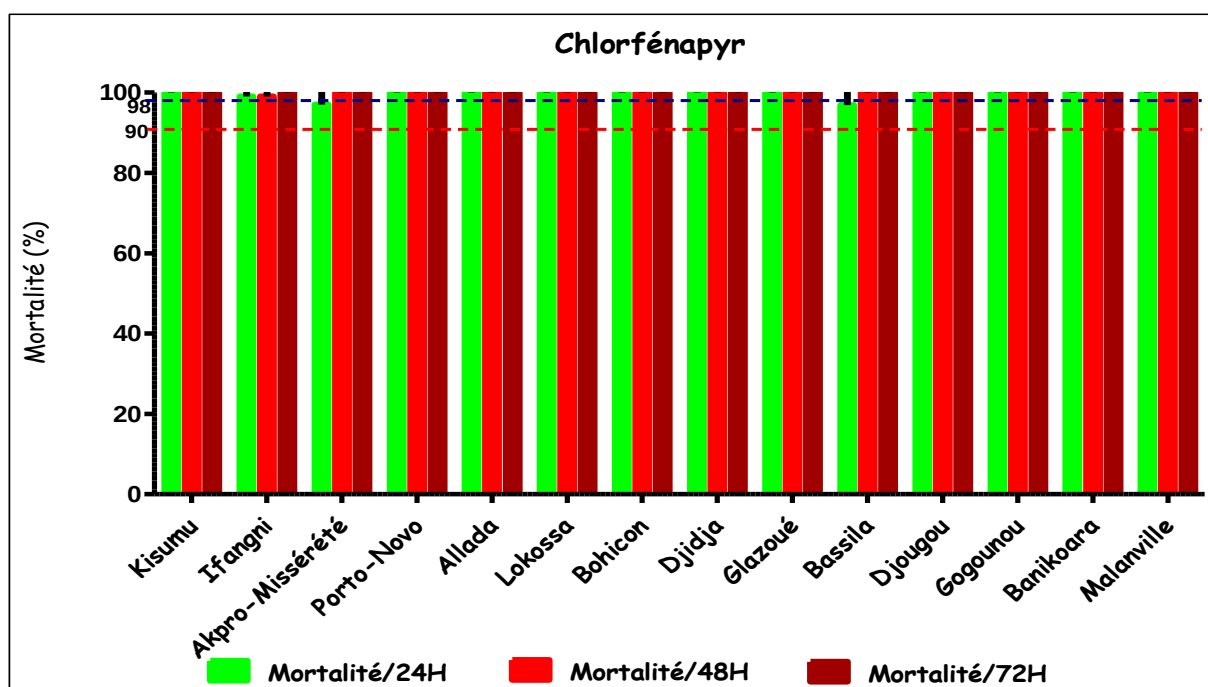


Figure 18: Taux de mortalité après exposition au CFP des populations de *Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin

2.2. Sensibilité des populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin à la Clothianidine (CTD)

Avec la clothianidine, la mortalité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. (Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-Novo, Allada, Lokossa, Bohicon, Djidja, Glazoué, Bassila, Djougou, Gogounou, Banikoara, Malanville) et de la souche sensible kisumu a été suivie pendant 7 jours après exposition. 24h après, le taux de mortalité a varié de 21,98% [13,97-31,88] à 89,66% [81,27-95,16] pour la souche sensible et pour toutes les populations sauvages. Cette mortalité va évoluer progressivement au deuxième et au troisième jour avant que la sensibilité ne s'observe au quatrième jour à Akpro-Missérété 98,99% [94,5-99,979], à Porto-Novo 98,89% [93,96-99,97], à Ifangni 100% [95,89-100], à Allada 100% [96,23-100] et à Bohicon 100% [95,85-100]. Au cinquième jour, la sensibilité va s'observer à Djidja 100% [95,38-100], à Gogounou 100% [96,55-100] et à Malanville 100% [96,48-100], au sixième jour à Glazoué 100% [96,03-100], à Djougou 100% [95,98-100], à Bassila 100% [95,65-100], à Banikoara 100% [96,03-100] et au septième jour à Lokossa 99,01% [94,61-99,97] (mortalité > 98%) et de ce fait pour toutes les localités étudiées (Figure 19).

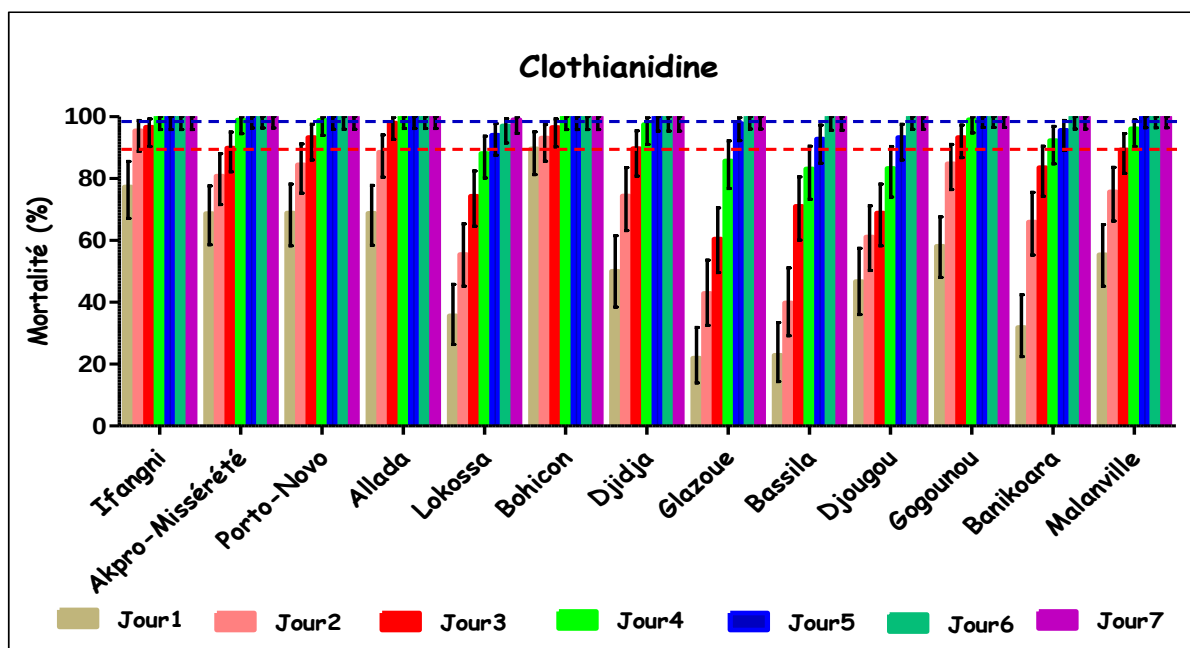


Figure 19: Taux de mortalité après exposition à la clothianidine des populations de *Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin

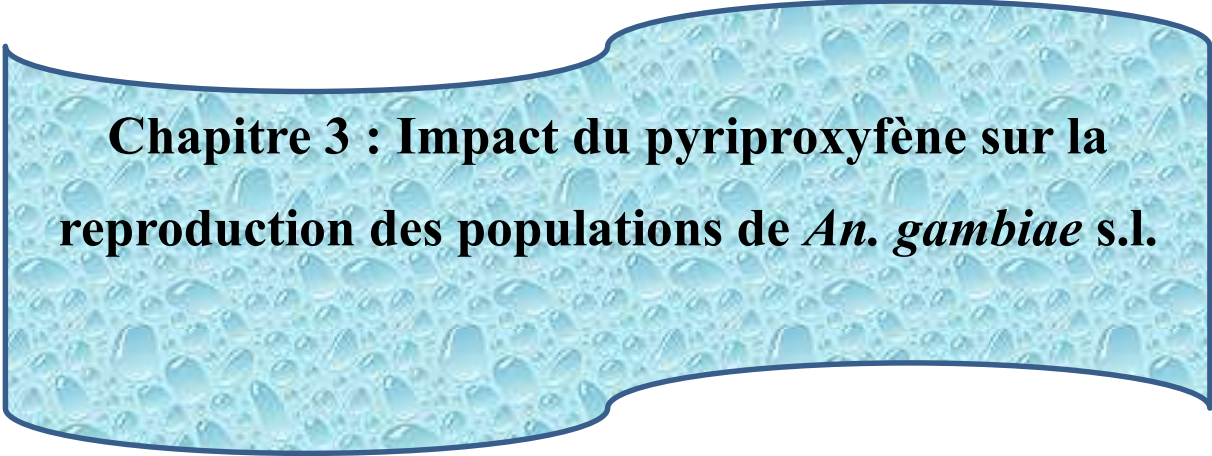
3. Discussion partielle

La clothianidine et le chlorfénapyr deux nouveaux insecticides respectivement de la classe des néonicotinoides et des pyrroles ont été recommandés en 2017 par l'Organisation mondiale de la santé dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides. Toutes les populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. de toutes les zones agroécologiques ont montré une parfaite sensibilité à ces deux insecticides (mortalité > 98 %). Cela pourrait être dû au mode d'action différent de ces insecticides (Raghavendra *et al.*, 2011). Alors que les pyréthrinoides sont neurotoxiques, le chlorfénapyr est un découpleur de la phosphorylation oxydative qui empêche la formation du principal réservoir d'énergie, l'ATP, dans les mitochondries des insectes (McLeod *et al.*, 2002; Athanassiou *et al.*, 2014). Bien que la clothianidine soit un insecticide neurotoxique, elle a son site d'action sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (Perry *et al.*, 2021; Thany, 2023) alors que les pyréthrinoides agissent sur les canaux sodiques voltage-dépendant des neurones (Clark et Symington, 2012; Gajendiran et Abraham, 2018b). Etant donné que ces nouveaux insecticides sont également utilisés comme pesticide, la sensibilité de toutes les populations de *An. gambiae* s.l. observées dans cette étude écarte l'hypothèse d'une éventuelle résistance croisée des vecteurs avec ces deux produits. Des résultats similaires montrant une parfaite sensibilité des vecteurs aux nouveaux insecticides ont été observés avec la clothianidine par Oxborough *et al.* (2019) dans des zones de forte résistance des vecteurs du paludisme en Afrique. Selon

les auteurs, la sensibilité des populations sauvages de *An. gambiae* s.l. à la clothianidine a été observée dans 11 pays africains. Cependant, ils ont souligné qu'au moins un site dans 5 pays présentait des mortalités vectorielles inférieures à 98 %. Deux ans plus tard, dans une étude similaire, le même auteur a montré une parfaite sensibilité des populations sauvages de *An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr à une concentration de 100 µg/ai/bouteille dans 10 pays africains (Oxborough *et al.*, 2021). Toutes ces informations répondent aux appels à combiner ces nouveaux produits aux pyréthrinoides dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides (N'Guessan *et al.*, 2007a). Deux nouveaux outils nouvellement recommandés par l'OMS répondent déjà à cet appel : il s'agit des moustiquaires à double principe actif Interceptor G2 et la nouvelle formulation insecticide fludora fusion. Interceptor G2 est une nouvelle moustiquaire contenant du chlorfénapyr et un insecticide pyréthrinoidé (alphacyperméthrine) alors que fludora fusion est composé de clothianidine et de deltaméthrine. La parfaite sensibilité des vecteurs résistants à ces nouvelles molécules est un bon signe qui prédit déjà sur l'efficacité de ces outils après leur déploiement dans la communauté.

4. Conclusion partielle

Les populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord du Bénin sont sensibles au chlorfénapyr et à la clothianidine. Ces deux insecticides malgré qu'ils soient suffisamment sollicités par les agriculteurs dans la lutte antiparasitaire ont montré une très bonne efficacité sur les populations de *Anopheles gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoides. Cependant, un suivi permanent de la sensibilité des vecteurs responsables de la transmission du paludisme à ces nouveaux insecticides est nécessaire pour un bon contrôle de la maladie.



Chapitre 3 : Impact du pyriproxyfène sur la reproduction des populations de *An. gambiae* s.l.

Article : Impact du pyriproxyfène sur la reproduction des populations de *An. gambiae* s.l. (**En cours de rédaction**)

Impact du pyriproxyfène sur la reproduction des populations de *Anopheles gambiae* s.l.

1. Contexte de l'étude

La plupart des insecticides utilisés en santé publique dans la lutte anti vectorielle sont des adulticides et le taux de mortalité était l'indicateur considéré pour leur évaluation. Leur rôle principal est de réduire la densité de la population des moustiques qui meurent lorsque ces derniers se retrouvent en contact avec les différentes surfaces auxquelles ils sont appliqués. Les pyréthrinoides et les organochlorés ont leur récepteur au niveau de l'axone des neurones alors que les carbamates et les organophosphorés interfèrent avec l'acétylcholinestérase, une enzyme impliquée dans la transmission synaptique. Toutes ces actions ont un effet léthal sur le moustique qui succombe au bout de quelques minutes après contact avec l'insecticide. Des résistances observées chez les vecteurs du paludisme ont donné lieu aux mutations L1014F (Kdr) au niveau de l'axone et G119S (Ace-1) au niveau de l'acétylcholinestérase. Pour une bonne gestion de la résistance des vecteurs du paludisme, il est indispensable que les choix de nouvelles molécules portent sur celles qui ont un mode d'action différent. Contrairement au Chlorfénapyr et à la clothianidine, deux insecticides adulticides, le pyriproxyfène est aussi l'un des insecticides nouvellement recommandés par l'OMS qui répond bien à ce critère. C'est un imitateur de l'hormone juvénile qui empêche le développement des œufs mais aussi des larves chez les insectes. C'est aussi un insecticide bien connu en agriculture où il a fait ces preuves sur plusieurs insectes ravageurs des cultures mais très peu connu en santé publique. Dans cette étude, le pyriproxyfène a été évalué afin de fournir des données de base sur la sensibilité des populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. à ce nouveau produit.

2. Résultats

2.1. Impact du pyriproxyfène avec la moustiquaire Royal guard® sur la fertilité des populations de *An. gambiae* s.l. de Bohicon, de Ifangni et de Lokossa

Le tableau 4 présente les résultats de fertilité des moustiques femelles de *Anopheles gambiae* s.l. de Bohicon, d'Ifangni, et de Lokossa exposés à 3 types de moustiquaires : Royal guard® (une moustiquaire imprégnée avec le pyriproxyfène et l'alpha-cyperméthrine), Interceptor (une moustiquaire imprégnée uniquement avec l'alpha-cyperméthrine (contrôle positif)) et une moustiquaire non traitée (contrôle négatif). Toutes les populations d'*Anopheles gambiae* s.l. exposées à la moustiquaire Royal guard® étaient infertiles (100% infertile). Aucun œuf n'a atteint le stade V de Christopher (la majorité est restée bloquer au stade III) alors que la plupart des œufs d'*Anopheles gambiae* s.l. exposés au contrôle positif (Interceptor) 56.7%

sont fertiles c'est-à-dire qu'ils ont atteint le stade V de Christopher et 15.46% sont inconclusifs c'est à dire qu'ils ont atteint en même temps le stade IV et V de Christopher. Avec le contrôle négatif (moustiquaire non traité), 57.14% sont fertiles et 19.64% sont inconclusifs. Aucune différence significative n'a été observée avec le contrôle positif et le contrôle négatif (Tableau 4).

Tableau 4: Statut de fertilité de différentes populations de *Anopheles gambiae* s.l. exposés à 3 différentes MIILDs (Royal guard®, Interceptor® et une moustiquaire non traitée)

Localités	Moustiquaires	Nombre de moustique exposé	Différents stades d'évolution des œufs						%F(n)	IC	%IC(n)	IC	%IF(n)	IC
			I	II	III	IV	IV-V	V						
Bohicon	Royal Guard®	28	7	8	11	2	0	0	0 (0)	(0 - 12,3)	0 (0)	(0 - 12,3)	100 (28)	(87,7 – 100)
	Interceptor®	18	4	0	3	3	4	4	22,2 (4)	(6,4 - 47,6)	22,2 (4)	(6,4-48)	55,6 (10)	(30,8 - 78,5)
	MIILD non traitée	20	3	2	2	6	3	4	20 (4)	(5,7 - 43,7)	15 (3)	(3,2 – 38)	65 (13)	(40,8 - 84,6)
	Total	66	14	10	16	11	7	8	12,1 (8)	(5,4-22,5)	10,7 (7)	(4,4-21)	77,3 (51)	(65,3-86,7)
Ifangni	Royal Guard®	14	5	3	5	1	0	0	0 (0)	(0-23,2)	0 (0)	(0-23,2)	100 (14)	(76,8-100)
	Interceptor®	31	0	0	3	4	1	23	74,19 (23)	(55,4-88,1)	3,23 (1)	(0,1-17)	22,6 (7)	(9,6-41,1)
	MIILD non traitée	42	0	0	1	1	9	31	73,8 (31)	(57,96-86)	21,4 (9)	(10,3-37)	4,8 (2)	(0,6-16,2)
	Total	87	5	3	9	6	10	54	62,1 (54)	(51,03-72)	11,49 (10)	(5,7-20)	26,44 (23)	(17,6-37)
Lokossa	Royal Guard®	45	3	11	30	1	0	0	0 (0)	(0-7,9)	0 (0)	(0-7,9)	100 (45)	(92,1-100)
	Interceptor®	48	2	5	3	0	10	28	58,3 (28)	(43,2-72,4)	20,8 (10)	(10,5-35)	20,8 (10)	(10,5-35)
	MIILD non traitée	50	1	1	4	5	10	29	58 (29)	(43,2-71,8)	20 (10)	(10,03-34)	22 (11)	(11,5-36)
	Total	143	6	17	37	6	20	57	39,9 (57)	(31,8-48,4)	13,99 (20)	(8,8-20,8)	46,2 (66)	(37,8-54,7)
Total général	Royal Guard®	87	15	22	46	4	0	0	0 (0)	(0-4.15)	0 (0)	(0-4.15)	100 (87)	(95.85-100)
	Interceptor	97	6	5	9	7	15	55	56.7 (55)	(46.25-66.73)	15.46 (15)	(8.92-24.22)	27.8 (27)	(19-37.9)
	MIILD non traitée	112	4	3	7	12	22	64	57.14 (64)	(47.45-66.45)	19.64 (22)	(12.74-28.22)	23.2 (26)	(15.7- 32.1)
	Total général	296	25	30	62	23	37	119	40.2(119)	(34.57-46.03)	12.5(37)	(8.96-16.82)	47.3(140)	(41 -53.1)

%F : pourcentage de femelle fertiles ; %IC : pourcentage de femelle inconclusives ; % IF : pourcentage de femelle infertiles ; n : nombre ; IC : intervalle de confiance

2.2. Impact du pyriproxyfène (100µg) sur la fécondité des populations de *Anopheles gambiae* s.l.

Le taux de mortalité de différentes populations de *Anopheles gambiae* s.l. (population sauvage et souche sensible Kisumu) exposées au PPF et à l'acétone a été suivi pendant 72h. Ce taux n'a pas excédé les 20% pour aucune des souches. Pour la population sauvage testée, le taux de mortalité était de 4,1% à Ifangni ; de 10,38 % à Djougou ; de 1,2% à Malanville avec le PPF, de 11,3% à Ifangni ; de 8,13% à Djougou ; de 1,2% à Malanville avec l'acétone. Pour la souche sensible Kisumu, il était de 10% avec le PPF et de 2,1% avec l'acétone (Tableau 5).

Tableau 5: Taux de mortalité des souches de *Anopheles gambiae* s.l. exposées à l'acétone et au PPF après 24h, 48h et 72h.

Localités	Souche	Solutions	Nombre testé	%Mortalité/24h	%Mortalité/48h	%Mortalité/72h
Ifangni	Sauvage	PPF (100µg)	97	1,03	2,1	4,1
		Acetone	97	3,1	6,2	11,3
Djougou	Sauvage	PPF (100µg)	77	6,49	10,38	10,38
		Acetone	86	2,33	5,81	8,13
Malanville	Sauvage	PPF (100µg)	89	0	1,2	1,2
		Acetone	83	1,2	1,2	1,2
Laboratoire	Kisumu	PPF (100µg)	100	8	9	10
		Acetone	94	0	0	2,1

Hrs : heures ; % : pourcentage

Le tableau 6 montre le taux d'oviposition et le taux d'inhibition de ponte des populations sauvages et de la souche sensible d'*Anopheles gambiae* s.l. après exposition au PPF et à l'acétone. Le taux d'oviposition après 4 jours de chambrage des populations sauvages était de 1,1% (0,03-5,9) après exposition au PPF et de 79,1% (69-87,1) après exposition à l'acétone à Ifangni, de 1,66% (0,04-8,5) après exposition au PPF et de 91,1% (82,6-96,4) après exposition à l'acétone à Djougou, de 0% (0 - 4,1) après exposition au PPF et de 52,4% (41,1-63,6) après exposition à l'acétone à Malanville. Quant à la souche sensible kisumu, le taux d'oviposition était de 1,1% (0,03-6,04) après exposition au PPF et de 99% (94,1-100) après exposition à l'acétone. Le taux d'inhibition de la ponte calculé à partir des taux d'oviposition a montré que les populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. d'Ifangni (98,7%), de Djougou (98,3%), de Malanville (100%) et de la souche sensible kisumu 99% ont atteint le seuil de sensibilité au PPF (Inhibition de ponte > 98% après exposition au PPF) (Tableau 6).

Tableau 6: Taux d'oviposition et d'inhibition de ponte des populations de *Anopheles gambiae* s.l. après exposition au PPF et à l'acétone.

Localités	Souche	Solutions	Nombre de chambre /96h	% d'oeufs/96 hrs (IC)	% d'oeufs /120 hrs (IC)	% d'oeufs /144 hrs (IC)	% Oviposition /168hrs (IC)	% d'inhibition de ponte
Ifangni	Sauvage	PPF(100µg)	93	0(0-3,89)	0(0 - 3,89)	1,08(0,03-5,89)	1,1(0,03-5,9)	98.64
		Acétone	86	0(0-4,2)	14(7,4-23,1)	61,6(50,5-71,9)	79,1(69-87,1)	
Djouougou	Sauvage	PPF(100µg)	63	0(0-5,69)	0(0 - 5,7)	1,6(0,04-8,5)	1,6(0,04-8,5)	98,3
		Acétone	79	16,5(9,1-26,5)	38(27,3-50)	60,8(49,1-71,6)	91,1(82,6-96,4)	
Malanville	Sauvage	PPF(100µg)	88	0(0-4,11)	0(0-4,1)	0(0-4,11)	0(0 - 4,1)	100
		Acétone	82	6,1(2-13,7)	24,4(15,6-35,1)	40,2(29,6- 51,7)	52,4(41,1-63,6)	
Laboratoire	Kisumu	PPF(100µg)	90	0(0-4,02)	0(0 - 4,02)	1,1(0,03-6,04)	1,1(0,03-6,04)	98.88
		Acétone	92	66,3(55,7-75,8)	82,6(73,3-89,7)	87(78,3-93,07)	99(94,1-100)	

3. Discussion partielle

Le PPF est un régulateur de croissance des insectes avec un mode d'action unique qui affecte la physiologie et la morphogenèse spécifiques aux insectes, ainsi que la reproduction et l'embryogenèse. Les résultats de plusieurs études ont montré son efficacité à arrêter le développement des larves de moustiques dans plusieurs études dans les pays asiatiques (Yapabandara *et* Curtis, 2002). L'impact stérilisant des femelles d'*Anopheles gambiae* s.l. exposées au PPF a été observé dans l'étude actuelle où la totalité des moustiques exposés à Royal Guard étaient infertiles avec aucun œuf atteignant le stade V de Christopher alors que la majorité des œufs d'*Anopheles gambiae* s.l. exposés à la moustiquaire contrôle ont pleinement développé leurs œufs jusqu'au stade V de Christopher. Par ailleurs, d'après le taux d'inhibition de ponte (taux d'inhibition de ponte >98% pour les populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. comme pour la population sensible d'*Anopheles gambiae*, Kisumu), les populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. d'Ifangni, de Djougou et de Malanville ont atteint le seuil de sensibilité au PPF. Pour (Ohashi *et al.*, 2012 ; Koffi *et al.*, 2015), le PPF en plus de son effet stérilisant, a réduit la durée de vie d'*Anopheles gambiae* s.l. Mieux encore, pour (Jaffer *et al.*, 2015), le PPF seul ou en combinaison sur des moustiquaires traitées a produit une réduction significative de la fertilité chez *Anopheles gambiae* s.l. en Côte d'Ivoire. De même, des populations sauvages d'*Anopheles gambiae* s.l. collectées dans des foyers où des moustiquaires traitées au PPF étaient utilisées ont montré que le PPF induisait non

seulement l'infertilité chez *Anopheles gambiae* s.l. mais réduisait également la longévité et le nombre d'œufs pondus par femelle (Grisales *et al.*, 2021).

4. Conclusion partielle

Les populations résistantes d'*Anopheles gambiae* s.l. du Sud, du Centre et du Nord du Bénin sont sensibles au pyriproxyfène. Tous les moustiques exposés à la moustiquaire Royal guard sont infertiles et il a été observé une inhibition de ponte chez presque toutes les populations d'*Anopheles gambiae* s.l. exposées à la dose diagnostique du PPF (100ug). La plupart des insecticides utilisés en santé publique pour le contrôle des vecteurs du paludisme jusqu'à nos jours sont neurotoxiques. Le pyriproxyfène avec un nouveau mode d'action complètement différent pourrait être un bon candidat dans la gestion de la résistance des moustiques vecteurs du paludisme.



Chapitre 4 : Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle generation sur diverses populations de *An. gambiae* s.l.

Les données relatives à ce chapitre sont présentées dans l'**article 3** en annexe, soumis dans Heliyon. Son statut actuel est : **Accepté avec révisions**. Lesdites révisions sont faites et soumises.

Article 3 : David Mahouton Zoungbédji^{1,2}, Germain Gil Padonou^{1,2}, Arthur Sovi^{1,5,6}, Alphonse Keller Konkon^{1,2}, Albert Sourou Salako¹, Aboubakar Sidick¹, Juvénal Minassou Ahouandjinou¹, Linda Towakinou¹, Razaki Ossè^{1,4}, Rock Aïkpon^{3,7}, Cyriaque Afoukou³, Lamine Baba Moussa^{2,8} and Martin Akogbéto¹. Bioefficacy of Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 and Interceptor® G2 on pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* s.l. in preparation for a distribution campaign of new generation nets in Benin, West Africa

Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle generation sur diverses populations de *Anopheles gambiae* s.l.

1. Contexte de l'étude

Les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILDs) sont l'un des principaux outils de lutte antivectorielle. La plupart des moustiquaires recommandées par l'OMS sont imprégnées d'insecticides pyréthrinoides. Ces moustiquaires sont distribuées aux populations sur toute l'étendue du territoire national du Bénin par le PNLP tous les trois ans. Elles ont été le moyen de lutte le plus accessible au cours de ces dernières décennies. Elles ont été d'une grande importance en santé publique avec la réduction du taux d'infection palustre au Bénin, en Afrique et dans le monde. Elles ont été largement utilisées comme mesure préventive de lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne (ASS). Leur mise à l'échelle massive a permis de réduire considérablement la charge du paludisme dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne. Au Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme effectue tous les trois ans une distribution massive de nouvelles moustiquaires pour une large couverture. Afin de préserver l'efficacité de cet outil face à la survenue de la résistance des vecteurs, l'OMS a opté pour d'autres stratégies de lutte visant à renforcer le pouvoir insecticide des pyréthrinoïdes. C'est alors qu'a vu le jour les moustiquaires dites de nouvelle génération imprégnées soit avec un pyréthrinoides en combinaison avec un synergisant, le butoxyde de pipéronyle (PBO) (Olyset Plus et Permanet 3.0) ou en combinaison avec un autre ingrédient actif : le chlorfénapyr (Interceptor® G2) ou le pyriproxifène (Royal guard®). Dans cette étude, ces nouvelles moustiquaires sont évaluées au laboratoire afin d'observer le comportement des populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. en présence de ces nouveaux outils.

2. Résultats

2.1. Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle génération avec le test en cône de l'OMS

La bio efficacité des moustiquaires de nouvelle génération (Olyset® Plus, PermaNet® 3.0, Royal Guard® et Interceptor® G2) a été évaluée avec les populations sauvages de moustique de Akpro-Missérété, de Porto-Novo, de Bohicon, de Lokossa, de Allada et de Djougou. La souche sensible de laboratoire (Kisumu) a été utilisée comme témoin. Olyset® Plus est une moustiquaire imprégnée avec la perméthrine et un synergiste (PBO) sur tous les côtés, PermaNet® 3.0 avec la deltaméthrine et un synergiste (PBO) uniquement sur le toit, Royal

guard® est imprégnée avec l'alphacyperméthrine et le pyriproxifène et Interceptor® G2 avec l'alphacyperméthrine et le chlorfénapyr. Deux moustiquaires dont PermaNet® 2.0 imprégnée uniquement de deltaméthrine et Interceptor® imprégnée uniquement de alphacyperméthrine ont servi de témoin pour cette évaluation. Les moustiquaires témoins Interceptor® et PermaNet® 2.0 ont montré une efficacité optimale avec la souche sensible *An. gambiae* s.l. Kisumu (mortalité $\geq 80\%$) alors que la mortalité observée avec les souches sauvages de *An. gambiae* s.l. de Akpro-Missérété, de Porto-Novo, de Bohicon, de Lokossa, de Allada et de Djougou est restée inférieure à 50%. La même tendance a été observée avec Interceptor® G2, Royal guard®, Olyset® Plus et PermaNet® 3.0 qui ont également montré une efficacité optimale avec les souches de laboratoire (Kisumu). En ce qui concerne les populations sauvages de *An. gambiae* s.l. de Akpro-Missérété 96,08% (86,54-99,52), de Porto-Novo 83,33% (70,71-92,08), de Bohicon 84,62% (71,92-93,12), de Lokossa 91,07% (80,38-97,04), de Allada 96% (86,29-99,51) et de Djougou 81,03% (68,59-90,13), les taux de mortalités les plus élevés observées ont été avec Olyset® Plus suivi de PermaNet® 3.0 et de Royal guard® (figure20).

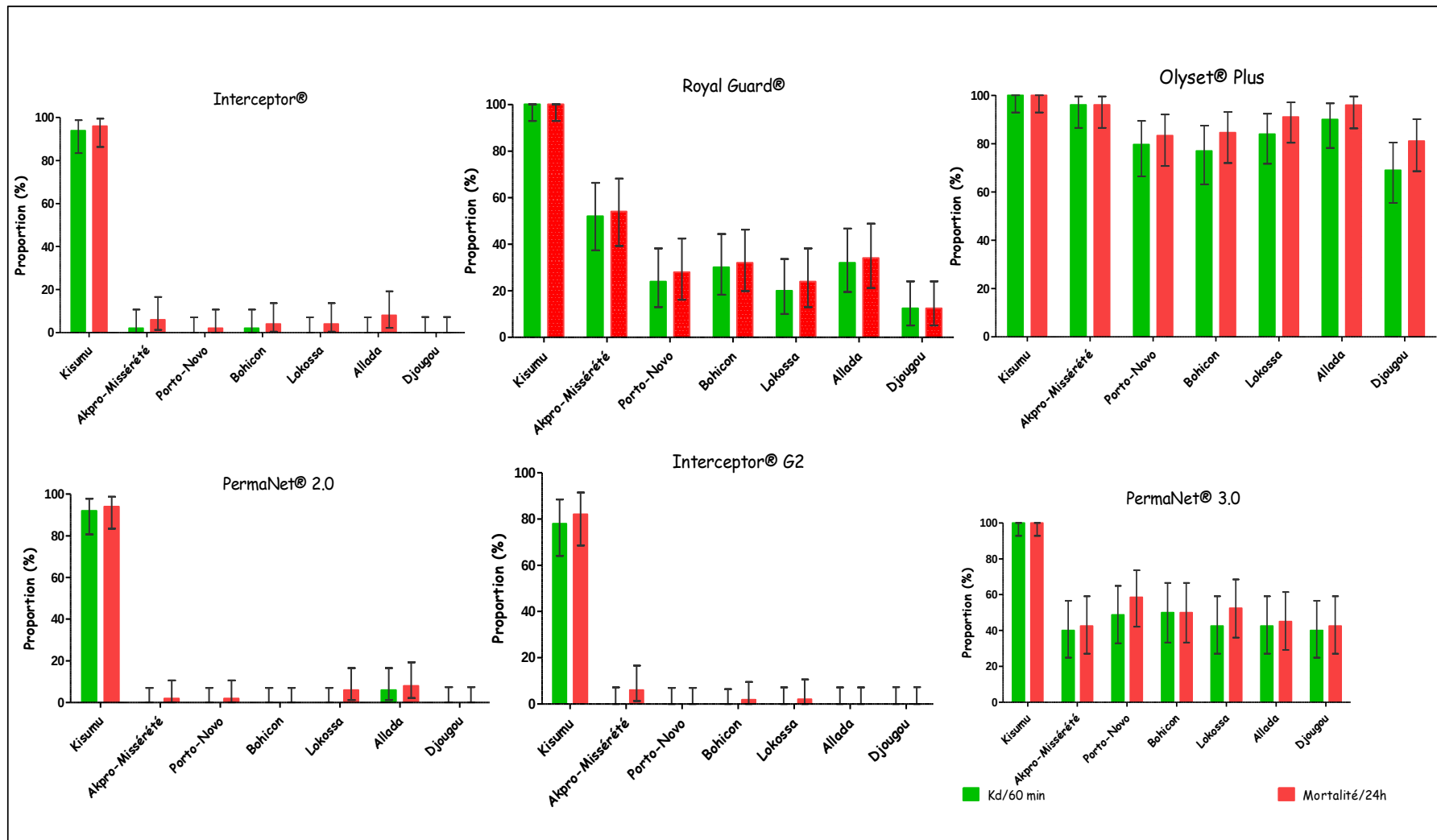


Figure 20: Taux de mortalité de différentes populations de *Anopheles gambiae* s.l. exposées à différents moustiquaires

2.2. Bio efficacité de Interceptor® G2 avec le test en tunnel de l'OMS

Avec le test en tunnel, Interceptor® G2 a montré une meilleure efficacité comparée à Interceptor® en terme de mortalité et d'inhibition de l'alimentation sanguine avec les populations sauvages de *An. gambiae* s.l. de Porto-Novo, de Bohicon et d'Allada. Les taux de mortalité immédiate observés après 12h d'exposition à Interceptor® sont respectivement de 11% (5.62-18.83), 37,5% (26.92-49.04) et 35% (24.67-46.48) contre respectivement 69% (58.97-77.87), 92.5% (84.39-97.2) et 72.5% (61.38-81.9) après exposition à Interceptor® G2 à Porto-Novo, Bohicon et Allada. Quant au taux d'alimentation sanguine des différentes populations, il est respectivement de 22% (14.33-31.39) à Porto-Novo, 31,25% (21.35-42.59) à Bohicon et de 22,5% (13.91-33.21) à Allada. Par contre, ce taux est inférieur à 10% chez toutes les populations testées avec Interceptor® G2. L'inhibition de l'alimentation sanguine induite par les MIILD Interceptor® G2 chez les moustiques est élevée comparée à celle des MIILD Interceptor®. Elle est respectivement de 60%, 51,92% et 59,09% avec Interceptor® contre 89,09%, 90,38% et 100% avec Interceptor® G2 respectivement à Porto-Novo, Bohicon et Allada (Tableau 7).

Tableau 7: Bioefficacité de Interceptor® G2 en tunnel

Communes	Moustiquaires	Nombre de moustiques testés	Mortalité immédiate % (IC)	Taux de pénétration % (IC)	Taux d'alimentation sanguine % (IC)	Taux d'inhibition de l'alimentation sanguine (%)
Porto-Novo	MIILD non traitée	100	1 [0.03-5.45]	53 [42.76-63.06]	55 [44.73-64.97]	60
	Interceptor®	100	11 [5.62-18.83]	33 [23.92-43.12]	22 [14.33-31.39]	
	MIILD non traitée	100	1 [0.03-5.45]	53 [42.76-63.06]	55 [44.73-64.97]	89,09
	Interceptor® G2	100	69 [58.97-77.87]	16 [9.43-24.68]	6 [2.23-12.6]	
Bohicon	MIILD non traitée	80	3.75 [0.78-10.57]	56.25 [44.7-67.32]	65 [53.52-75.33]	51,92
	Interceptor®	80	37.5 [26.92-49.04]	38.75 [28.06-50.3]	31.25 [21.35-42.59]	
	MIILD non traitée	80	3.75 [0.78-10.57]	56.25 [44.7-67.32]	65 [53.52-75.33]	90,38
	Interceptor® G2	80	92.5 [84.39-97.2]	16.25 [8.95-26.18]	6,25 [2.06-13.99]	
Allada	MIILD non traitée	80	2.5 [0.3-8.74]	60 [48.44-70.8]	55 [43.47-66.15]	59,09
	Interceptor®	80	35 [24.67-46.48]	26.25 [17.04-37.29]	22.5 [13.91-33.21]	
	MIILD non traitée	80	2.5 [0.3-8.74]	60 [48.44-70.8]	55 [43.47-66.15]	100
	Interceptor® G2	80	72.5 [61.38-81.9]	7.5 [2.8-15.61]	0 [0-4.51]	

La mortalité des différentes populations de *An. gambiae* s.l. exposés respectivement aux MIILD Interceptor® et Interceptor® G2 a été suivie 24h, 48h et 72h après le test. Les résultats ont révélé qu'aucune augmentation significative du taux de mortalité n'a été observée pour toutes les populations de moustiques exposées aux MIILD Interceptor® au bout des 72h d'observation. La mortalité a varié de 11% à 17% à Porto-Novo, de 37,5% à 41,25% à Bohicon et de 35% à 41,25% à Allada. Par contre avec Interceptor® G2, on note une augmentation significative de la mortalité après 24h d'observation. Au bout de 60 min d'exposition, la mortalité immédiate était de 69%, 92,5% et 72,5% respectivement à Porto-Novo, Bohicon et Allada contre respectivement 89%, 100% et 92,5% après 24h d'exposition.

Après 48h et 72h d'observation, les mortalités observées ne diffèrent pas significativement de celles obtenues après 24h (Figure 21).

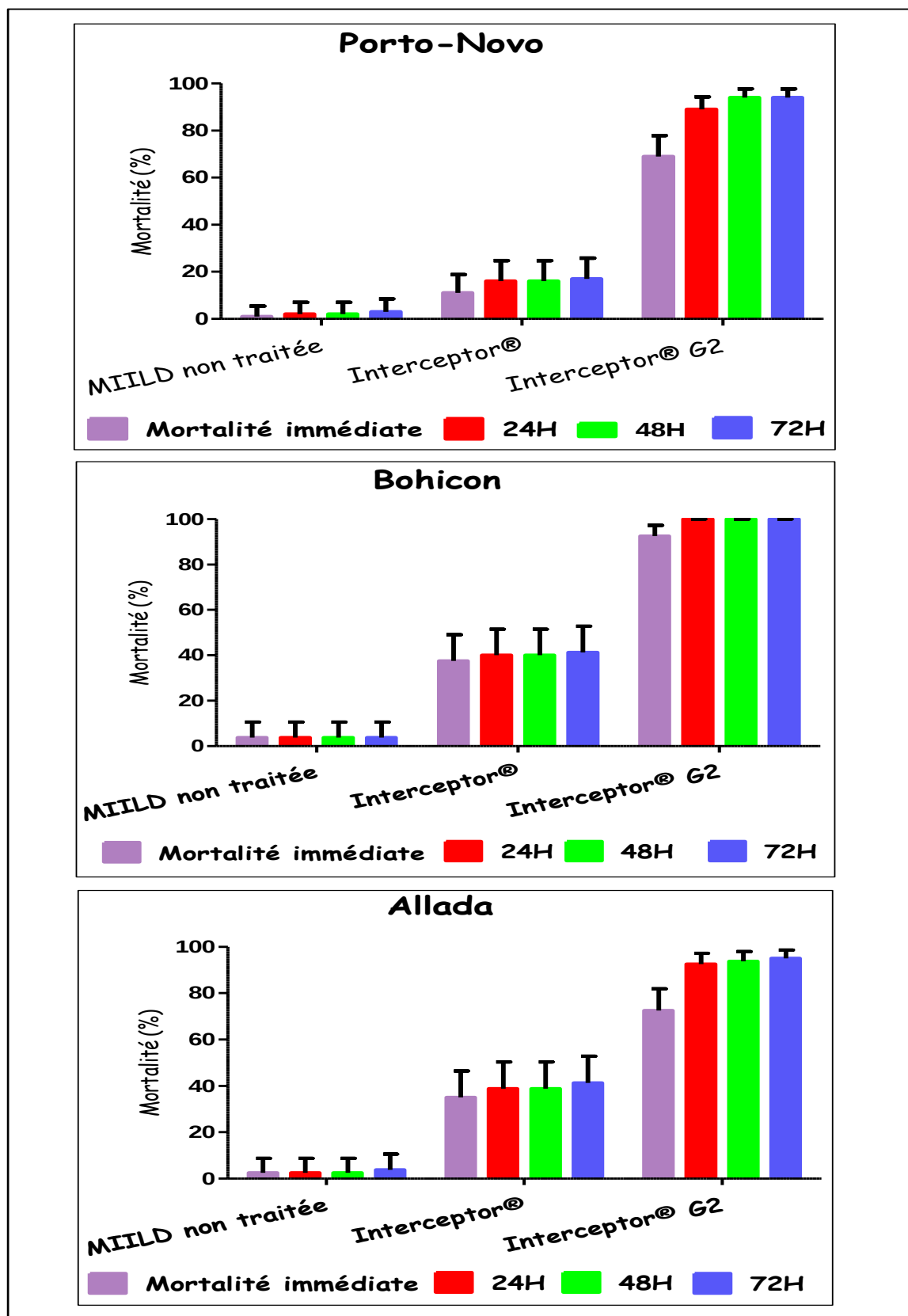


Figure 21: Mortalité des populations de *An. gambiae* s.l. après le test en tunnel

3. Discussion partielle

Les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) sont considérées comme l'un des moyens les plus efficaces de lutte anti vectorielle. Elles sont largement utilisées comme mesure préventive dans la lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne (ASS) (Tizifa *et al.*, 2018) et ont contribué à assurer la protection des enfants et des femmes enceintes contre la maladie. Leur mise à l'échelle massive a permis de réduire considérablement la charge du paludisme dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne (Wanzira et Rubahica, 2016 ; Bennett *et al.*, 2012). Mais la propagation rapide des vecteurs résistants aux pyréthrinoides la seule classe d'insecticide utilisé pour l'imprégnation des moustiquaires constitue un frein pour leurs efficacités (Yadouleton *et al.*, 2010 ; Ranson *et al.*, 2011 ; Innocent *et al.*, 2017). Au Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme distribue tous les trois ans des moustiquaires afin d'assurer la protection de la population. De même, dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV), des moustiquaires sont gratuitement offertes aux femmes enceintes et aux nouveaux nés afin de renforcer cette lutte. Une première mesure prise par l'OMS est d'associer aux pyréthrinoides un synergiste (le PBO) impliqué dans le mécanisme de contournement de l'action des oxydases. Cette mesure a été restrictive car d'autres mécanismes sont impliqués dans la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides d'où l'arrivée des moustiquaires à double ingrédients actifs. Dans les mêmes conditions d'évaluation, les moustiquaires de nouvelle génération dont PermaNet® 3.0, Olyset® Plus (moustiquaires PBO) ont montré une nette augmentation du taux de mortalité des populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. comparé aux moustiquaires standards (Interceptor® et PermaNet® 2.0). Cette information suggère que les MILD PBO seraient très efficaces dans des régions où l'on observe une surproduction des oxydases à Djougou par exemple. La commune de Djougou comme d'autres communes dans le nord du Bénin est caractérisée par une forte production agricole surtout cotonnière et parfois céréalière. Des pratiques culturelles souvent accompagnées d'utilisation d'insecticides pyréthrinoides pour protéger les cultures contre les insectes nuisibles qui justifieraient la surproduction des oxydases dans la région. Les MILD PBO seraient des outils de lutte efficaces dans cette région. Par ailleurs, l'évaluation des MILD à double ingrédients actifs (Interceptor® G2, Royal Guard®) dans les mêmes conditions que les MILD standards ne permet pas d'observer l'impact de ces nouveaux outils sauf avec Royal guard dont le taux de mortalité des populations de *Anopheles gambiae* a significativement augmenté comparé aux MILD standards. De plus, on peut également observer l'effet du pyriproxyfène avec les moustiquaires Royal Guard® qui ont induit une inhibition du développement ovarien et de

ponte d'oeufs dans la population de *Anopheles gambiae* s.l. résistante aux pyréthrinoides. Ces résultats sont en sympathie avec les travaux réalisés en Tanzanie où la réduction du taux de reproduction observé chez les moustiques était due à l'action d'inhibition de ponte du PPF contenu dans les moustiquaires évaluées (Jaffer *et al.*, 2015b). Avec la moustiquaire IG2, l'on a observé une augmentation significative des taux de mortalité des populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. avec les tests en tunnel de L'OMS 72h après exposition. Le chlorfénapyr étant un produit à action lente qui agit sur les voies respiratoires de l'insecte, il a fallu observer les taux de mortalité pendant 72h après exposition pour constater l'impact de la MIILD IG2 sur les moustiques. Ces informations justifient bien l'importance des résultats issus des études en phase II et III réalisées au Bénin qui ont prouvé l'efficacité des MIILD IG2 comparée aux MIILD standards (Yovogan *et al.*, 2021 ; Accrombessi *et al.*, 2021). Aussi, il est important de noter qu'une étude réalisée en Côte d'Ivoire sur les MIILD PBO et IG2 a permis d'observer une réduction des taux de mortalité des moustiques exposées aux MIILD PBO (Kouassi *et al.*, 2020). Il serait donc important de suivre la durabilité de ces moustiquaires dans le temps une fois qu'elles aient été mises à la disposition de la population. Les résultats de ces différentes évaluations augurent de beaux jours pour la lutte antivectorielle. Le taux de couverture des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action en Afrique et dans le monde a potentiellement augmenté ces dix dernières années. Il serait donc utile que les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme fassent le nécessaire pour le déploiement de ces nouveaux outils au moment où les populations commencent à en accorder d'importance.

4. Conclusion partielle

Les moustiquaires de nouvelle génération ont tous montré une bonne efficacité contre les populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. de diverses localités étudiées. Les taux de mortalité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. observés avec les coupons de moustiquaires PBO (Olyset® Plus et PermaNet® 3.0) sont significativement supérieurs à ceux observés avec les moustiquaires standards PermaNet® 2.0 et Interceptor®. Avec les moustiquaires à double ingrédients actifs, Royal guard® en plus de rendre stérile les moustiques a significativement augmenté la mortalité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. Le pyriproxifène semble jouer un rôle synergiste pour l'alphacyperméthrine. Quant à la moustiquaire imprégnée de chlorfénapyr (Interceptor® G2), des taux de mortalités retardés ont été significativement observés en tunnel au cours des 72h après exposition. Une bonne évaluation de l'efficacité de ces nouvelles moustiquaires doit prendre en considération le

mode d'action des insecticides contenus dans ces différents outils de lutte. Les tests d'évaluation de la bio efficacité des moustiquaires doivent être bien adaptés pour une bonne mesure de l'impact de ces nouveaux produits sur les vecteurs du paludisme résistants aux pyréthrinoides.



Chapitre 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives

Discussion générale

L'efficacité potentielle du chlorfénapyr, de la clothianidine et du pyriproxyfène a été évaluée contre les populations sauvages de *An. gambiae* s.l. résistantes aux pyréthrinoides dans plusieurs localités du Bénin sur le transect Sud-Nord. Les résultats des tests de sensibilité aux insecticides ont montré que toutes les populations de *An. gambiae* s.l. sont résistantes aux pyréthrinoides mais totalement sensibles au chlorfénapyr et à la clothianidine (mortalité $\geq 98\%$), et que le pyriproxyfène était efficace pour inhiber l'oviposition de ces vecteurs (taux d'inhibition de l'oviposition $\geq 98\%$).

La résistance étant un phénomène dynamique, dans le premier chapitre de notre étude nous avons fait l'état des lieux sur le statut de résistance de *An. gambiae* s.l. aux pyréthrinoides. La résistance aux pyréthrinoides observée dans les populations de moustiques sur le terrain n'est pas une situation surprenante car depuis quelques années, elle a été déjà signalée au Bénin (Yadouleton *et al.*, 2010a; Sagbohan *et al.*, 2022). Cela peut compromettre les efforts de démoustication basés sur l'utilisation d'outils à base de pyréthrinoides uniquement (N'Guessan *et al.*, 2007). Les mécanismes impliqués dans la résistance aux pyréthrinoides incluent la mutation Kdr L1014F dont les fréquences étaient supérieures à 80%, et similaires à la fois chez *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* trois espèces sœurs identifiées chez le complexe *An. gambiae* dans toutes les communes étudiées. Ces résultats rappellent les conclusions de Sagbohan *et al.* (2021) dans certains districts du sud du Bénin, et suggère que cette mutation est proche de la fixation. Cela pourrait être dû à une forte pression sélective exercée par l'utilisation incontrôlée de cette classe d'insecticide à des fins domestiques, de santé publique et agricoles. Par ailleurs, une surexpression de MFOs, une enzyme impliquée dans la détoxification des pyréthrinoides chez les insectes a été observée dans la zone rizicole et cotonnière (Malanville, Bassila, Djougou et Gogounou). L'absence de surexpression de cette enzyme dans les autres sites doit faire l'objet d'études plus approfondies bien que l'on puisse émettre l'hypothèse que cela soit dû à un coup génétique qui interagirait avec la résistance induite par les oxydases (Taylor et Feyereisen, 1996; Bergé *et al.*, 1998). L'activité élevée des GST dans la zone lagunaire (Allada et Akpro-Missérété) dans la zone céréalière (Lokossa et Bohicon) et dans la zone cotonnière (Bassila et Gogounou) et celle des estérases dans la zone lagunaire (Porto-Novo, Allada et Akpro-Missérété), dans la zone céréalière (Lokossa et Bohicon) et dans la zone cotonnière (Djougou et Gogounou) est une situation préoccupante car ces enzymes contribueront certainement à élargir la gamme des mécanismes de résistance aux insecticides. Toutes ces informations confirment l'hypothèse selon laquelle

les populations de *Anopheles gambiae* s.l. de toutes les zones agroécologiques étudiées sont résistantes aux pyréthrinoides et tous les mécanismes sous jacents sont encore très peu cernés. En raison de la généralisation de cette résistance aux pyréthrinoides observée chez les vecteurs du paludisme, ainsi que les mécanismes de résistance impliqués, l'efficacité des MIILDs à base de pyréthrinoides uniquement pour protéger les communautés béninoises contre les piqûres de moustiques nocturnes est remise en cause. Depuis 2007, des appels ont été lancés pour concevoir de nouvelles générations de moustiquaires qui pourraient être utilisées dans les communautés afin d'atténuer ce problème qui prend de l'ampleur non seulement au Bénin mais également dans la plupart des pays de la sous région Africaine et d'ailleurs (N'Guessan *et al.*, 2007). Répondre à cette exigence requiert des dispositions préalables dont la plus importante est de rétablir la sensibilité des vecteurs aux insecticides. La toute première option auquel a opté l'OMS est d'associer aux insecticides pyréthrinoides le synergiste PBO dont le mérite a été prouvé par plusieurs études (Ekerette et Ebere, 2022). Ainsi, plusieurs MIILDs synergistes dont les MIILDs Olyset® Plus et PermaNet® 3.0 par exemple ont été conçues à cet effet. Cependant, il est important de noter que l'efficacité des MIILDs synergistes n'est pas sans limite au regard des résultats présentés par notre étude et ceux des études antérieures. En effet, le synergiste PBO est impliqué dans le contrôle de l'expression des oxydases (Khot *et al.*, 2008), une enzyme impliquée dans la détoxification des insecticides pyréthrinoides. Pour contourner ce mécanisme de résistance aux insecticides, les MIILD synergistes (Olyset® Plus et PermaNet® 3.0) seraient les plus adaptées à assurer la protection des populations contre les piqûres de moustiques dans les zones rizicoles et cotonnière où nous avons observé une surproduction de cette enzyme. Etant donné que la gamme des mécanismes de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides est beaucoup plus diversifiée, il conviendrait de renforcer cet outil par d'autres stratégies dans le but d'une bonne prise en charge du phénomène. Dans le même ordre d'idée, l'OMS en 2017 a fait la recommandation de nouveaux insecticides dits insecticides de nouvelle génération dont le chlorfénapyr, la clothianidine et le pyriproxyfène. Cette fois ci, l'objectif a été de mélanger ces produits insecticides aux pyréthrinoides dans le but de renforcer l'efficacité des principales mesures de lutttes dont les MIILD et la PID.

Pour une optimisation de l'efficacité des mesures de lutte contenant ces nouvelles molécules, la sensibilité de diverses populations de *An. gambiae* s.l. résistantes au chlorfénapyr, à la clothianidine et au pyriproxyfène a été évaluée dans les chapitres 2 et 3 de notre étude.

La parfaite sensibilité de toutes les populations résistantes de *An. gambiae* s.l. au chlorfénapyr observée dans cette étude est déjà un bon signe pour l'efficacité des MIILDs contenant ces produits. Des résultats similaires ont été récemment observés par Oxborough *et al.* (2021) dans plusieurs pays africains de forte endémicité dans lesquels les vecteurs sont hyper résistants aux pyréthrinoides. Cette sensibilité des vecteurs au chlorfénapyr pourrait s'expliquer par le mode d'action de ce produit différent de celui des pyréthrinoides sur les insectes. En effet, contrairement aux pyréthrinoides qui ont leur site d'action au niveau des canaux sodiques voltage dépendant des neurones, le chlorfénapyr agit sur les réserves énergétiques des insectes en empêchant la formation d'adénosine triphosphate (ATP) dans les mitochondries (Ohba *et al.*, 2013). Les mêmes observations ont été faites avec la clothianidine un autre insecticide adulticide de nouvelle génération évalué dans cette étude. Même si la clothianidine est un insecticide neurotoxique tout comme les pyréthrinoides, elle agit sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine ce qui expliquerait la sensibilité des vecteurs résistants à ce produit. Une étude menée en Inde sur la pulvérisation intradomiciliaire de CTD s'est révélée efficace, réalisable sur le plan opérationnel, sûre et efficace pendant une période pouvant aller jusqu'à six mois (Uragayala *et al.*, 2018). Une autre étude récente menée au Bénin a abouti à des résultats similaires, montrant que la CTD utilisée dans le cadre d'une campagne de pulvérisation permettait de lutter contre le paludisme transmis par des populations de moustiques résistants aux pyréthrinoides pendant une période pouvant aller jusqu'à 8 ou 9 mois (Ngufor *et al.*, 2017). Au cours d'une campagne de pulvérisation intradomiciliaire résiduelle utilisant le SumiShield® 50 WG (CTD 300 CS) dans l'Alibori et la Donga (nord du Bénin), Odjo *et al.* (2021) ont montré une diminution du taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. gambiae* s.l. et *An. gambiae* s.s. (Kisumu) avec des taux de mortalité de plus de 80% sur les murs traités et 75% de la souche sauvage sur le terrain, cinq mois après la date de pulvérisation et après 24 heures d'observation. Un an auparavant, des bioessais sur des murs traités réalisés dans la même région avec Fludora® Fusion (mélange de clothianidine et de deltaméthrine) ont montré que cette formulation reste efficace avec un taux de mortalité supérieur à 90% sur la souche sensible de Kisumu, 4 mois après la date de pulvérisation (Odjo *et al.*, 2023). Pendant cette période de bio-efficacité de Fludora® Fusion, les auteurs ont observé une forte réduction de certains indicateurs comme la densité de repos à l'intérieur, l'indice sporozoïtique, et l'EIR ainsi qu'une forte exophagie de *Anopheles gambiae* s.l. dans la plupart des districts traités par rapport aux zones de contrôle. Cependant, dans une autre étude réalisée par Oxborough *et al.* (2019), il a été observé que sur les 11 pays couverts par l'étude, au moins un site de 5 pays a montré des mortalités inférieures au seuil de

sensibilité reconnu par l'OMS (98%). Un an après, Fouet *et al.* (2020) ont observé des résistances chez *An. gambiae* s.s. dans une zone agricole où les néonicotinoides sont fortement utilisés dans la lutte antiparasitaire. Toutes ces informations indiquent que même si la clothianidine a montré son efficacité dans plusieurs études, un suivi rigoureux de la sensibilité des vecteurs à cet insecticide s'avère nécessaire avant toute adoption de stratégies de lutte basées sur des formulations à base de clothianidine.

Une des innovations de cette la présente étude a été l'évaluation du pyriproxifène un immitateur de l'hormone juvenile dont les propriétés insecticides sont reconnues pour entraver considérablement la reproduction chez les moustiques (Jaffer *et al.*, 2015b; Kawada *et al.*, 2014) mais également pour inhiber le développement des larves de *An. gambiae* s.l. (Yapabandara et Curtis 2002; Mbare *et al.*, 2014 ; Nampelah *et al.*, 2022). Toutes les trois populations de *An. gambiae* s.l. testées (Ifangni, Djougou et Malanville) et la souche sensible Kisumu ont atteint le seuil de sensibilité au PPF défini par l'OMS (taux d'inhibition de ponte $\geq 98\%$). Cette étude montre l'importance de la quête de nouveaux produits insecticides ayant d'autres sites d'action que ceux des insecticides utilisés jusque là.

Au regard des résultats prometteuses observés après exposition des vecteurs résistants aux nouvelles molécules recommandées par l'OMS, nous avons abordé dans le chapitre 4 de notre étude la bioefficacité des MIILD de nouvelle de nouvelle génération. A cet effet, les tests en cône de l'OMS réalisés avec *An. gambiae* (souche Kisumu) ont révélé que les moustiquaires de nouvelle génération (MIILD synergistes, RG et IG2) ont montré une efficacité optimale, car elles ont affiché des taux de mortalité sur 24 heures $\geq 80\%$. Cependant, avec les souches de *An. gambiae* s.l. de terrain, les MIILDs synergistes (Olyset® Plus, PermaNet® 3.0) semblent avoir un taux de mortalité élevé que ceux des MIILD standards (PermaNet® 2.0 et Interceptor®) et ceux des MIILD à double ingrédients actifs (Royal Guard® et Interceptor® G2). Etant donné que la moustiquaire Interceptor® G2 est incorporée avec du chlorfenapyr (un insecticide à action lente), il aurait été plus intéressant de vérifier la mortalité jusqu'à 72 heures avec les tests en cône de l'OMS. Ceci constitue une limite à la présente étude. En revanche, les données des tests en tunnel qui ont évalué les taux de mortalité immédiats, l'inhibition de l'alimentation sanguine et les taux d'entrée des moustiques ont montré que les MIILD Interceptor® G2 étaient plus performantes que les MIILD Interceptor®. Le faible taux de mortalité des populations de *Anopheles gambiae* s.l. observé dans cette étude en évaluant la MIILD Interceptor® G2 avec le test en cône de l'OMS serait dû au mode d'action différent du chlorfénapyr contenu dans la moustiquaire. Cette observation a été déjà faite par

Oxborough *et al.* (2015) qui ont fini par conclure que les tests en tunnel restent les tests les plus fiables pour évaluer l'efficacité des MIILD de nouvelle génération. Selon Oxborough *et al.* (2015) et Kibondo *et al.* (2022), le mode d'action du chlorfénapyr (un insecticide non neurotoxique) est compatible avec le rythme d'activité circadien des anophèles, car ces derniers sont très actifs pendant la nuit mais pas dans la journée. Cela pourrait justifier les taux de mortalité élevés observés lors des tests en tunnel au cours desquels les moustiques ont été exposés pendant toute la nuit à des morceaux de MIILD Interceptor® G2. En effet, lors des tests en tunnel, les moustiques tenteraient de passer à travers les moustiquaires déchirées pour chercher l'hôte, ce qui augmenterait le contact moustiquaire-vecteur et entraînerait l'action perturbatrice du chlorfénapyr sur les voies respiratoires des moustiques.

Nos résultats ont aussi révélé que le taux d'inhibition de ponte pour toutes les populations sauvages de *Anopheles gambiae* s.l. étudiées a atteint le seuil de sensibilité au PPF défini par l'OMS. En effet, l'impact stérilisant des femelles de *An. gambiae* s.l. exposés au PPF a été observé lorsque tous les moustiques exposés à la moustiquaire Royal Guard® étaient infertiles. Aucun œuf des moustiques exposés, observés après dissection n'a atteint le stade V de Christopher, alors que la plupart des œufs de *An. gambiae* s.l. exposés aux moustiquaires de contrôle se sont complètement développés jusqu'au stade V de Christopher. Alors que les résultats de cette étude suggèrent que Royal guard® ou d'autres produits à base de pyriproxifène peuvent potentiellement conduire à une réduction significative de la transmission du paludisme, des études dans des essais de contrôle randomisés en Tanzanie (Mosha *et al.*, 2022) et au Bénin (Accrombessi *et al.*, 2023) ont démontré que les moustiquaires imprégnées de PPF (Royal Guard®) n'ont pas plus d'impact sur les indicateurs épidémiologiques que les moustiquaires imprégnées d'insecticide standard à base de pyrèthrinoides uniquement. Les tests de résistance aux insecticides effectués après l'intervention dans le cadre de l'essai de contrôle randomisé au Bénin ont également montré que l'exposition de *An gambiae* s.l. de la zone d'étude au pyriproxifène a entraîné une forte réduction du taux de fécondité (plus de 70 %) au cours des deux années qui ont suivi la distribution de la moustiquaire par rapport aux moustiques de contrôle non exposés (Accrombessi *et al.*, 2023). Puisque le taux d'inhibition de l'oviposition de *An. gambiae* s.l. après exposition au pyriproxifène était $\geq 98\%$ pour toutes les populations étudiées, on pourrait espérer un plus grand impact des moustiquaires imprégnées d'insecticide à base de pyriproxifène dans ces régions. Il n'est pas clair si la variation géographique dans l'affaiblissement de la fécondité après l'exposition au pyriproxifène au laboratoire se

traduirait par des résultats entomologiques et épidémiologiques variables après le déploiement des MIILD au pyriproxifène. D'autres études seraient nécessaires pour le déterminer. Il a été suggéré que si le pyriproxifène semble réduire les indicateurs entomologiques de la transmission du paludisme, cette réduction n'est peut-être pas assez importante pour se traduire par une réduction des indicateurs épidémiologiques humains de la transmission du paludisme (Mosha *et al.*, 2022; Accrombessi *et al.*, 2023). Au vu de ces résultats, le rôle que devrait jouer le pyriproxifène dans la lutte antivectorielle n'est pas encore clair. Le pyriproxifène devrait peut-être être associé à d'autres classes d'insecticides, car les populations adultes sauvages de *An. gambiae* s.l. ont établi une résistance généralisée aux pyréthrinoïdes. Il pourrait être plus efficace de coupler le pyriproxifène avec le chlorfénapyr ou d'autres nouveaux insecticides afin d'augmenter l'efficacité ou de ralentir l'apparition de la résistance aux insecticides dans les populations de moustiques sauvages. Cependant, il serait important de 1) déterminer si les chimies des insecticides sont compatibles pour rester sur les moustiquaires imprégnées d'insecticide à effet rémanent ; 2) déterminer si l'insecticide peut fonctionner en synergie pour réduire la capacité vectorielle, ralentir la résistance à l'un ou l'autre insecticide, ou les deux ; et 3) déterminer si la combinaison de ces deux insecticides est plus efficace que d'autres combinaisons de double ingrédients actifs (IA) qui incluent des pyréthroïdes. Par ailleurs, étant donné que le pyriproxifène est utilisé à l'origine comme larvicide, il se peut que les moustiquaires imprégnées d'insecticide ne soient pas les mieux adaptées à la méthode d'administration de l'IA pour tuer les moustiques.

Bien que cette étude ajoute à la base des connaissances sur la résistance aux insecticides au Bénin et a fourni des preuves de l'efficacité en phase 1 des MIILDs chlorfénapyr-pyréthrinoïdes, des MIILD pyriproxifène-pyréthrinoïdes et des MIILDs PBO-pyréthrinoïdes sur les populations de moustiques résistants, certaines limites sont notées. Il est important de noter que les écarts par rapport aux récentes directives de l'OMS et aux SOP sont dus au fait que l'étude a été réalisée avant la publication des mises à jour pour les insecticides clothianidine et chlorfénapyr, et les tests de bio-efficacité. Dans cette étude, le protocole (WHO, 2022) utilisant la clothianidine ou le chlorfénapyr avec l'ester méthylique de l'huile de colza (MERO®) n'a pas été utilisé au moment de l'étude pour faute de non disponibilité. Le SumiShield® a été imprégné sur du papier filtre et utilisé comme source de clothianidine dans le test en tube de l'OMS (WHO, 2022b), car il s'agit d'un produit stable formulé pour rester sur les surfaces et qui permet d'évaluer directement la réaction des moustiques sauvages à un produit commercial formulé. Les essais biologiques en bouteille ont été enduits de

chlorfénapyr sans MERO. Il n'est actuellement pas recommandé d'utiliser les essais biologiques sur cônes de l'OMS pour les MII à double IA. On ne sait pas exactement comment ces déviations de test ont pu affecter la mesure de la résistance aux insecticides. Bien que ces résultats puissent encore suggérer la sensibilité de ces populations aux insecticides, il sera important de répéter les tests avec la clothianidine et le chlorfénapyr en utilisant les protocoles appropriés. De même, seules des MIILD neuves et non lavées ont été utilisées dans le test biologique du cône de l'OMS et le test en tunnel de l'OMS. D'autres études ont rapporté que les moustiquaires lavées et non lavées étaient similaires dans le test biologique (Bayili *et al.*, 2017). Par conséquent, cette étude fait partie des toutes premières réalisées au Bénin dont les résultats aideront à comprendre la réponse du principal vecteur du paludisme (*An. gambiae* s.l.) aux nouveaux insecticides et aux nouvelles moustiquaires imprégnées d'insecticide au Bénin.

Conclusion générale et perspectives

La présente étude a permis d'avoir une idée générale sur le statut de résistance de *An. gambiae* s.l. principal vecteur de la transmission du paludisme au Bénin mais aussi une appréhension sur l'efficacité des insecticides dites de nouvelle génération recommandés par l'OMS dans le cadre de la gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides. Du Nord au Sud en passant par le Centre du pays, toutes les localités prospectées ont montré une forte résistance du vecteur aux insecticides pyréthrinoides. Cette résistance est beaucoup plus médiée par des mutations du gène Vgsc avec un fort taux observé chez *An. coluzzii* comme chez *An. gambiae* s.s. dans toutes les localités étudiées. De plus, une surproduction des enzymes de détoxification dont le cytochrome P450 beaucoup plus observée dans les zones cotonnières, les glutathion-S-transférases dans les zones céréalières et les carboxyl/choline estérases presque dans toutes les localités a fortement contribué à la résistance de ces vecteurs. Ces informations suggèrent que la distribution des gènes de résistance au Bénin est bien généralisée et nous donne un aperçu sur l'impact que pourrait avoir cette situation sur les outils de lutte antivectorielle. La forte dose d'insecticides utilisée pour la protection des productions agricoles (cotonnières, céréalières et maraichères) constitue la principale cause. A cela, va s'ajouter le développement du maraichage dans les grandes villes du pays pratiqué par plusieurs jeunes comme activités génératrices de revenus où l'utilisation d'insecticides pour la protection des légumes serait maintenant une réalité. Fort heureusement, la lutte antivectorielle a encore de beaux jours pour ce qui concerne l'efficacité des outils de lutte. Il ressort de cette étude que toutes les populations résistantes de *Anopheles gambiae* s.l. ont montré une parfaite sensibilité aux insecticides de nouvelle génération. La mortalité observée avec le chlorfénapyr et la chlothianidine deux insecticides dont le mode d'action est différent de celui des pyréthrinoides est largement supérieur à 98%. Quant au pyriproxifène, le taux d'inhibition de ponte avoisine les 100% pour toutes les populations résistantes de *An. gambiae* s.l. exposées. Par ailleurs, l'étude de la bio efficacité des moustiquaires de nouvelle génération a montré une bonne performance en thème de mortalité avec les moustiquaires synergistes (Olyset® Plus, PermaNet® 3.0). Alors qu'avec le test en cône de l'OMS les résultats n'étaient pas concluants, le test en tunnel a été celui qui a favorablement répondu à l'évaluation de l'efficacité de la moustiquaire IG2 dont les mérites ont été prouvés dans une étude en phase II et en phase III réalisée au Bénin et en Tanzanie. Au regard de ces différents résultats, Il est possible de dire que les insecticides de nouvelle génération pourraient valablement remplacer les pyréthrinoides dans la gestion de la résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides au Bénin. Néanmoins, malgré la disponibilité de nouveaux

insecticides efficaces, une vigilance continue serait nécessaire car l'usage des insecticides dans la lutte contre les insectes ravageurs des cultures en agriculture est un autre frein pour la lutte anti vectorielle en santé publique. Pour cela, avec la forte implication des enzymes de détoxification dans la résistance des vecteurs, approfondir les études sur les différents gènes impliqués dans la surproduction de ces enzymes serait un atout pour une meilleure prise en charge de la résistance des vecteurs au Bénin. En raison de l'implication des oxydases dans la résistance des vecteurs aux insecticides, nous suggérons au PNLP pour une distribution équitable et efficace des MIILD de prendre en considération les mécanismes de résistance observés dans chaque région. Il serait souhaitable que les MIILD PBO (Olyset® Plus, PermaNet® 3.0) soit réservées pour les régions du nord où une surproduction des oxydases a été beaucoup plus observée (Djougou, Bassila, Gogounou et Malanville). Les résultats de cette étude sont ceux obtenus sur des MIILD neuves non lavées et donc pas en condition naturelle d'utilisation en communauté. Une étude sur la durabilité des MIILD de nouvelle génération doit accompagner la distribution de ces outils afin de voir leur efficacité dans le temps et dans l'espace. Aussi, il est important de suivre rigoureusement le profil entomologique des vecteurs dans les zones de distributions de ces moustiquaires afin de voir l'impact de ces nouveaux outils sur l'agressivité des vecteurs et sur la transmission des plasmodies. Le PPF ayant montré son efficacité à inhiber la fertilité et la fécondité chez les vecteurs au laboratoire montre quand même que cet insecticide a une plu-value pour ce qui concerne la lutte antivectorielle. Il serait donc intéressant d'évaluer les propriétés larvicides de cet insecticide sur *An. gambiae* s.l. Ces différentes études doivent être envisagées pour une mesure efficace de l'impact de ces outils sur la résistance des vecteurs aux insecticides au Bénin. Enfin, même si de nos jours le taux d'utilisation des MIILD est beaucoup plus élevé comparé aux années antérieures, il est important que des communications sur l'utilité des moustiquaires soient renforcées davantage afin de ramener à la raison ceux qui continuent d'en faire d'autres usages.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Accrombessi M, Cook J, Dangbenon E, Yovogan B, Akpovi H, Sovi A, Adoha C et al. 2023. « Efficacy of Pyriproxyfen-Pyrethroid Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and Chlorfenapyr-Pyrethroid LLINs Compared with Pyrethroid-Only LLINs for Malaria Control in Benin: A Cluster-Randomised, Superiority Trial ». *The Lancet* 401 (10375): 435-46.
2. Accrombessi M, Cook J, Ngufor C, Sovi A, Dangbenon E, Yovogan B, Akpovi H et al. 2021. « Assessing the efficacy of two dual-active ingredients long-lasting insecticidal nets for the control of malaria transmitted by pyrethroid-resistant vectors in Benin: study protocol for a three-arm, single-blinded, parallel, cluster-randomized controlled trial ». *BMC Infectious Diseases* 21 (1): 194.
3. Agossa FR., Gnanguenon V, Anagonou R, Azondekon R, Aïzoun N, Sovi A, Oké-Agbo F, Sèzonlin M et Akogbéto MC. 2015. « Impact of Insecticide Resistance on the Effectiveness of Pyrethroid-Based Malaria Vectors Control Tools in Benin: Decreased Toxicity and Repellent Effect ». Édité par Matthew Bogyo. *PLOS ONE* 10 (12): e0145207.
4. Ahoyo adjovi NR. 2006. « Monographie de la commune de malanville - PDF Téléchargement Gratuit ». 2006. <https://docplayer.fr/43994625-Monographie-de-la-commune-de-malanville.html>.
5. Aïkpon R, Agossa F, Ossè R, Oussou O, Aïzoun N, Oké-Agbo F et Akogbéto M. 2013. « Bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Atacora department in Benin, West Africa: a threat for malaria vector control ». *Parasites & Vectors* 6 (1): 192.
6. Akomagni. 2006. « Monographie de la commune de djidja - PDF Téléchargement Gratuit ». 2006. <https://docplayer.fr/33313979-Monographie-de-la-commune-de-djidja.html>.
7. Assogba BS, Pasteur N, Makoundou P, Unal S, Baba-Moussa L, Labbé P et Weill M. 2020. « Dynamic of Resistance Alleles of Two Major Insecticide Targets in *Anopheles Gambiae* (s.l.) Populations from Benin, West Africa ». *Parasites & Vectors* 13 (1): 134.
8. Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Arthur FH et Throne JE. 2014. « Residual Efficacy of Chlorfenapyr for Control of Stored-Product Psocids (Psocoptera) ». *Journal of Economic Entomology* 107 (2): 854-59. <https://doi.org/10.1603/EC13376>.

9. Balabanidou V, Grigoraki L et Vontas J. 2018. « Insect Cuticle: A Critical Determinant of Insecticide Resistance ». *Current Opinion in Insect Science*, Pests and resistance Behavioural ecology, 27 (juin): 68-74.
10. BANI G. 2006a. « Monographie de la commune de banikoara - PDF Free Download ». 2006. <https://docplayer.fr/57187812-Monographie-de-la-commune-de-banikoara.html>.
11. BANI G. 2006b. « Monographie de la commune de gogounou - PDF Free Download ». 2006. <https://docplayer.fr/141718748-Monographie-de-la-commune-de-gogounou.html>.
12. Bayili K, N'do S, Namountougou M, Sanou R, Ouattara A, Dabiré RK, Ouédraogo AG, Malone D et Diabaté A. 2017. « Evaluation of Efficacy of Interceptor® G2, a Long-Lasting Insecticide Net Coated with a Mixture of Chlorfenapyr and Alpha-Cypermethrin, against Pyrethroid Resistant *Anopheles Gambiae* s.l. in Burkina Faso ». *Malaria Journal* 16 (1): 190.
13. Bergé J, Feyereisen R et Amichot M. 1998. « Cytochrome P450 Monooxygenases and Insecticide Resistance in Insects ». Édité par I. Denholm, J. A. Pickett, et A. L. Devonshire. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353 (1376): 1701-5.
14. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle KE et al. 2015. « The Effect of Malaria Control on *Plasmodium Falciparum* in Africa between 2000 and 2015 ». *Nature* 526 (7572): 207-11.
15. Biaoou CF. 2006. « Monographie de la commune de djougou - PDF Téléchargement Gratuit ». 2006. <https://docplayer.fr/57187781-Monographie-de-la-commune-de-djougou.html>.
16. Black BC, Hollingworth RM, Ahammadsahib KI, Kukel CD et Donovan S. 1994. « Insecticidal Action and Mitochondrial Uncoupling Activity of AC-303,630 and Related Halogenated Pyrroles ». *Pesticide Biochemistry and Physiology* 50 (2): 115-28.
17. Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, Weiner M, Sheets L, Sargent D, David MS et al. 2009. « Evidence for a Separate Mechanism of Toxicity for the Type I and the Type II Pyrethroid Insecticides ». *NeuroToxicology*, Pyrethroid Supplement, 30 (novembre): S17-31.

18. Caminade C, McIntyre KM et Jones AE. 2019. « Impact of Recent and Future Climate Change on Vector-Borne Diseases ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1436 (1): 157-73.
19. Capo-chichi YJ. 2006. « Monographie de la commune de glazoue - PDF Free Download ». 2006. <https://docplayer.fr/130884542-Monographie-de-la-commune-de-glazoue.html>.
20. Carrasco D, Lefèvre T, Moiroux N, Pennetier C, Chandre F et Cohuet A. 2019. « Behavioural Adaptations of Mosquito Vectors to Insecticide Control ». *Current Opinion in Insect Science*, Vectors and medical and veterinary entomology • Social insects, 34 (août): 48-54.
21. Chandre F, Darrier F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J et Guillet P. 1999. « Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. » *Bulletin of the World Health Organization* 77 (3): 230-34.
22. Chandre F. 1999. « 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 ». 1999.
23. Chiabi A, Djimafo ANM, Nguefack S, Mah E, Dongmo FN et Angwafo F. 2020. « Severe Malaria in Cameroon: Pattern of Disease in Children at the Yaounde Gynaeco-Obstetric and Pediatric Hospital ». *Journal of Infection and Public Health* 13 (10): 1469-72.
24. Christophers SR. 1911. « The development of the egg follicles in anophelines ». *Paludism* 2: 73-88.
25. Chrustek A, Hołyńska-Iwan I, Dziembowska I, Bogusiewicz J, Wróblewski M, Cwynar A et Olszewska-Słonina D. 2018. « Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides ». *Medicina* 54 (4): 61.
26. Clark JM et Symington SB. 2012. « Advances in the Mode of Action of Pyrethroids ». In *Pyrethroids: From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*, édité par Noritada Matsuo et Tatsuya Mori, 49-72. Topics in Current Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer.
27. « CNEV-Ft-Fev2014-Rapport_Utilisation_insecticides_gestion_resistance.pdf ». s. d. Consulté le 2 août 2022. https://www.anses.fr/fr/system/files/CNEV-Ft-Fev2014-Rapport_Utilisation_insecticides_gestion_resistance.pdf.

28. Coetzee M, Hunt R, Wilkerson R, della Torre A, Coulibaly M et Besansky N. 2013. « *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex ». *Zootaxa* 3619 (février): 246-74.
29. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard JM et Rowland M. 2007. « Multiple Insecticide Resistance Mechanisms in *Anopheles Gambiae* and *Culex Quinquefasciatus* from Benin, West Africa ». *Acta Tropica* 101 (3): 207-16.
30. Corbel V et N'Guessan R. 2013. *Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*. IntechOpen.
31. Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ et Singh B. 2008. « *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening ». *Clinical Infectious Diseases* 46 (2): 165-71.
32. Djègbè I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, Akogbéto M et Corbel V. 2011. « Dynamics of Insecticide Resistance in Malaria Vectors in Benin: First Evidence of the Presence of L1014S Kdr Mutation in *Anopheles Gambiae* from West Africa ». *Malaria Journal* 10 (1): 261.
33. Djenontin I. 2006. « monographie communale de lokossa - association nationale des ... » yumpu.com. 2006. <https://www.yumpu.com/fr/document/read/5978877/>
34. Djogbénou L, Pasteur N, Akogbéto M, Weill M et Chandre F. 2011a. « Insecticide Resistance in the *Anopheles Gambiae* Complex in Benin: A Nationwide Survey ». *Medical and Veterinary Entomology* 25 (3): 256-67.
35. Djogbénou L, Pasteur N, Akogbéto M, Weill M et Chandre F. 2011b. « Insecticide Resistance in the *Anopheles Gambiae* Complex in Benin: A Nationwide Survey ». *Medical and Veterinary Entomology* 25 (3): 256-67.
36. Djogbénou L, Weill M, Hougard JM, Raymond M, Akogbéto M et Chandre F. 2007. « Characterization of Insensitive Acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Resistance Levels and Dominance ». *Journal of Medical Entomology* 44 (5): 805-10.
37. Djouaka R, Irving H, Tukur Z et Wondji CS. 2011. « Exploring Mechanisms of Multiple Insecticide Resistance in a Population of the Malaria Vector *Anopheles funestus* in Benin ». *PLOS ONE* 6 (11): e27760.

38. Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS et Black WC. 2009. « Does Kdr Genotype Predict Insecticide-Resistance Phenotype in Mosquitoes? » *Trends in Parasitology* 25 (5): 213-19.
39. Edgar181. 2007. *Français : Structure chimique du chlorfénapyr créée avec ChemDraw.* Propre travail.
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorfenapyr.png>.
40. Ekerette IB et Ebere N. 2022. « Health insecticides and piperonyl butoxide synergist in mangrove vegetation of rivers state, Nigeria ».
41. Elamathi N, Verma V, Sharma VP, Sreehari U et Raghavendra K. 2014. « Neonicotinoids in Vector Control: In Silico Approach. » *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4 (39): 25-29.
42. Elliott M. 1976. « Properties and applications of pyrethroids. » *Environmental Health Perspectives* 14 (avril): 1-2.
43. Ferreira CP, Lyra SP, Azevedo F, Greenhalgh D et Massad E. 2017. « Modelling the impact of the long-term use of insecticide-treated bed nets on Anopheles mosquito biting time ». *Malaria Journal* 16 (1): 373.
44. Fouet C, Ashu AF, Ambadiang MM, Tchapga W, Wondji CS et Kamdem C. 2020. « Resistance of Anopheles Gambiae to the New Insecticide Clothianidin Associated with Unrestricted Use of Agricultural Neonicotinoids in Yaoundé, Cameroon ». bioRxiv.
45. Fowler MT, Lees RS, Fagbohoun J, Matowo NS, Ngufor C, Protopopoff N et Spiers A. 2021. « The Automatic Classification of Pyriproxyfen-Affected Mosquito Ovaries ». *Insects* 12 (12): 1134.
46. Gajendiran A et Abraham J. 2018a. « An Overview of Pyrethroid Insecticides ». *Frontiers in Biology* 13 (2): 79-90.
47. Gajendiran A et Abraham J. 2018b. « An Overview of Pyrethroid Insecticides ». *Frontiers in Biology* 13 (2): 79-90.
48. Gan J, Spurlock F, Hendley P et Weston DP, éd. 2008. *Synthetic Pyrethroids: Occurrence and Behavior in Aquatic Environments*. Vol. 991. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society.
49. Gnanguenon V, Agossa FR, Badirou K, Govoetchan R, Anagonou R, Oke-Agbo F, Azondekon R et al. 2015. « Malaria vectors resistance to insecticides in Benin: current trends and mechanisms involved ». *Parasites & Vectors* 8 (1): 223.

50. Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Ossè R, Oke-Agbo F, Azondekon R, Sovi A et al. 2014. « Transmission patterns of Plasmodium falciparum by Anopheles gambiae in Benin ». *Malaria Journal* 13 (1): 444.
51. Golding N, Wilson AL, Moyes CL, Cano J, Pigott DM, Velayudhan R, Brooker SJ, Smith DL, Hay SI et Lindsay SW. 2015. « Integrating vector control across diseases ». *BMC Medicine* 13 (1): 249.
52. Grisales N, Lees RS, Maas J, Morgan JC, Wangrawa DW, Guelbeogo WM, N’Fale S, Lindsay SW, McCall PJ et Ranson H. 2021. « Pyriproxyfen-treated bed nets reduce reproductive fitness and longevity of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions ». *Malaria Journal* 20 (1): 273.
53. Guo D, Luo J, Zhou Y, Xiao H, He K, Yin C, Xu J et Li F. 2017. « ACE: an efficient and sensitive tool to detect insecticide resistance-associated mutations in insect acetylcholinesterase from RNA-Seq data ». *BMC Bioinformatics* 18 (1): 330.
54. Gupta RC. 2011. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Academic Press.
55. Harbach RE. 1994. « Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research ». *Bulletin of Entomological Research* 84 (3): 331-42.
56. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L et Ranson H. 2004. « The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology, Molecular and population biology of mosquitoes*, 34 (7): 653-65.
57. Hemingway J et Ranson H. 2000. « Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease ». *Annual Review of Entomology* 45 (1): 371-91.
58. Hien AS, Soma DD, Maiga S, Coulibaly D, Diabaté A, Belemvire A, Diouf MB et al. 2021. « Evidence Supporting Deployment of next Generation Insecticide Treated Nets in Burkina Faso: Bioassays with Either Chlorfenapyr or Piperonyl Butoxide Increase Mortality of Pyrethroid-Resistant *Anopheles Gambiae* ». *Malaria Journal* 20 (1): 406.
59. Hommel M. 2007. « Morphologie, biologie et cycle des Plasmodium parasites de l’homme ». *Bulletin de l’Académie Nationale de Médecine* 191 (7): 1235-46.
60. Hounghinin. 2006. « monographie de la commune de bohicon - Association Nationale ... » [yumpu.com](https://www.yumpu.com/fr/document/read/28423274/monographie-de-la-commune-de-bohicon-association-nationale-). 2006.
<https://www.yumpu.com/fr/document/read/28423274/monographie-de-la-commune-de-bohicon-association-nationale->.

61. Hounnakan AC, VISSOH Ayadji AP, Vodungbo V, Hounkpe E, Gbekan P, Wadochedohoun P, Doumeffio HE, Dossou Yovo SJ, Kokode S et Segnonnan Affo G. 2019. « Annuaire des statistiques sanitaires année 2019 », 244.
62. Hu XL, Tang YY, Kwok ML, Chan KM et Chu KH. 2020. « Impact of Juvenile Hormone Analogue Insecticides on the Water Flea *Moina Macrocopa*: Growth, Reproduction and Transgenerational Effect ». *Aquatic Toxicology* 220 (mars): 105402.
63. Ingham PE, McNeil SJ et Sunderland MR. 2012. « Functional Finishes for Wool-Eco Considerations ». *Advanced Materials Research* 441: 33-43.
64. Invest JF et Lucas JR. 2008. « Pyriproxyfen as a mosquito larvicide », 8.
65. Jaffer A, Protopopoff N, Mosha FW, Malone D, Rowland MW et Oxborough RM. 2015a. « Evaluating the Sterilizing Effect of Pyriproxyfen Treated Mosquito Nets against *Anopheles gambiae* at Different Blood-Feeding Intervals ». *Acta Tropica* 150 (octobre): 131-35.
66. Jaffer A, Protopopoff N, Mosha FW, Malone D, Rowland MW et Oxborough RM. 2015b. « Evaluating the Sterilizing Effect of Pyriproxyfen Treated Mosquito Nets against *Anopheles Gambiae* at Different Blood-Feeding Intervals ». *Acta Tropica* 150 (octobre): 131-35.
67. Jayaraj R, Megha P et Sreedev P. 2016. « Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment ». *Interdisciplinary Toxicology* 9 (3-4): 90-100.
68. Jeschke P et Nauen R. 2008. « Neonicotinoids-from Zero to Hero in Insecticide Chemistry ». *Pest Management Science* 64 (11): 1084-98.
69. Jiang Y, Swale D, Carlier PR, Hartsel JA, Ma M, Ekström F et Bloomquist JR. 2013. « Evaluation of Novel Carbamate Insecticides for Neurotoxicity to Non-Target Species ». *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Special Issue: Advances in Vector and Urban Pest Management and Resistance, 106 (3): 156-61.
70. Jindra M et Bittova L. 2020. « The Juvenile Hormone Receptor as a Target of Juvenoid “Insect Growth Regulators” ». *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 103 (3): e21615.
71. Katsuda Y. 1999. « Development of and Future Prospects for Pyrethroid Chemistry ». *Pesticide Science* 55 (8): 775-82.
72. Kaushik P et Kaushik G. 2007. « An Assessment of Structure and Toxicity Correlation in Organochlorine Pesticides ». *Journal of Hazardous Materials* 143 (1): 102-11.

73. Kawada H, Dida GO, Ohashi K, Kawashima E, Sonye G, Njenga SM, Mwandawiro C et Minakawa N. 2014. « A Small-Scale Field Trial of Pyriproxyfen-Impregnated Bed Nets against Pyrethroid-Resistant *Anopheles Gambiae* s.s. in Western Kenya ». Édité par Takafumi Tsuboi. *PLoS ONE* 9 (10): e111195.
74. Khot AC, Bingham G, Field LM et Moores GD. 2008. « A novel assay reveals the blockade of esterases by piperonyl butoxide ». *Pest Management Science* 64 (11): 1139-42.
75. Kibondo UA, Odufuwa OG, Ngonyani SH, Mpelepele AB, Matanilla I, Ngonyani H, Makungwa NO et al. 2022. « Influence of testing modality on bioefficacy for the evaluation of Interceptor® G2 mosquito nets to combat malaria mosquitoes in Tanzania ». *Parasites & Vectors* 15 (1): 124.
76. Kleinschmidt I, Bradley J, Knox TB, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, Ismail BA et al. 2018. « Implications of Insecticide Resistance for Malaria Vector Control with Long-Lasting Insecticidal Nets: A WHO-Coordinated, Prospective, International, Observational Cohort Study ». *The Lancet Infectious Diseases* 18 (6): 640-49.
77. Klowden MJ. 1995. « Blood, Sex, and the Mosquito ». *BioScience* 45 (5): 326-31.
78. Knox TB, Juma EO, Ochomo EO, Jamet HP, Ndungo L, Chege P, Bayoh NM et al. 2014. « An Online Tool for Mapping Insecticide Resistance in Major *Anopheles* Vectors of Human Malaria Parasites and Review of Resistance Status for the Afrotropical Region ». *Parasites & Vectors* 7 (1): 76.
79. Koffi AA, Ahoua Alou LP, Djenontin A, Kabran JPK, Dosso Y, Kone A, Moiroux N et Pennetier C. 2015. « Efficacy of Olyset® Duo, a Permethrin and Pyriproxyfen Mixture Net against Wild Pyrethroid-Resistant *Anopheles Gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire: An Experimental Hut Trial ». *Parasite* 22.
80. Koffi AA, Ahoua Alou LP, Kabran JPK, N'Guessan R et Pennetier C. 2013. « Re-Visiting Insecticide Resistance Status in *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire: A Nation-Wide Informative Survey ». *PLOS ONE* 8 (12): e82387.
81. Kouassi BL, Edi C, Tia E, Konan LY, Akré MA, Koffi AA, Ouattara AF et al. 2020. « Susceptibility of *Anopheles Gambiae* from Côte d'Ivoire to Insecticides Used on Insecticide-Treated Nets: Evaluating the Additional Entomological Impact of Piperonyl Butoxide and Chlorfenapyr ». *Malaria Journal* 19 (1): 454.
82. Koukpo CZ, Fassinou AJYH, Ossè RA, Agossa FR, Sovi A, Sewadé WT, Sidick A, Assogba BS, Akogbeto MC et Sezonlin M. 2019. « The current distribution and characterization of the L1014F resistance allele of the *kdr* gene in three malaria

- vectors (*Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis*) in Benin (West Africa) ». *Malaria Journal* 18 (1): 175.
83. Kovacs SD, Rijken MJ et Stergachis A. 2015. « Treating Severe Malaria in Pregnancy: A Review of the Evidence ». *Drug Safety* 38 (2): 165-81.
 84. Kpanou CD, Sagbohan HW, Dagnon F, Padonou GG, Ossè R, Salako AS, Sidick A et al. 2021. « Characterization of Resistance Profile (Intensity and Mechanisms) of *Anopheles Gambiae* in Three Communes of Northern Benin, West Africa ». *Malaria Journal* 20 (1): 328.
 85. Kpanou CD, Sagbohan HW, Padonou GG, Ossè R, Salako AS, Fassinou AJ, Sovi A et al. 2021. « Susceptibility of *Anopheles Gambiae* Sensu Lato to Different Insecticide Classes and Mechanisms Involved in the South-North Transect of Benin ». *Journal of Entomology and Zoology Studies* 9 (4): 437-38.
 86. Kpanou CD, Sagbohan HW, Sovi A, Osse R, Padonou GG, Salako A, Tokponnon F et al. 2022. « Assessing Insecticide Susceptibility and Resistance Intensity of *Anopheles Gambiae* s.l. Populations From Some Districts of Benin Republic, West Africa ». Édité par Athanase Badolo. *Journal of Medical Entomology*, mars, tjac037.
 87. Lamichhane JR. 2017. « Pesticide Use and Risk Reduction in European Farming Systems with IPM: An Introduction to the Special Issue ». *Crop Protection* 97 (juillet): 1-6.
 88. Lawrence C. 1999. « Laveran Remembered: Malaria Haemozoin in Leucocytes ». *The Lancet* 353 (9167): 1852.
 89. Lee SH, Kim YH, Kwon DH, Cha DJ et Kim JH. 2015. « Mutation and Duplication of Arthropod Acetylcholinesterase: Implications for Pesticide Resistance and Tolerance ». *Pesticide Biochemistry and Physiology, Mode of Action of Environmental Pollutants and Insecticides*, 120 (mai): 118-24.
 90. Lin X, Yao Y et Wang B. 2015. « Methoprene-Tolerant (Met) and Krüppel-Homologue 1 (Kr-H1) Are Required for Ovariole Development and Egg Maturation in the Brown Plant Hopper ». *Scientific Reports* 5 (1): 18064.
 91. Coetzee M, Horne M, Brooke DWK, Hunt RH. 1999. « DDT, dieldrin and pyrethroid Insecticide resistance In African malaria vector mosquitoes: an historical review and implications for future malaria control in southern Africa ». *South African Journal of Science* 95 (5): 215-18.
 92. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N et Pauron D. 1998a. « Molecular Characterization of Pyrethroid

- Knockdown Resistance (Kdr) in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae* s.s. » *Insect Molecular Biology* 7 (2): 179-84.
93. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N et Pauron D. 1998b. « Molecular Characterization of Pyrethroid Knockdown Resistance (Kdr) in the Major Malaria Vector *Anopheles Gambiae* s.s. » *Insect Molecular Biology* 7 (2): 179-84.
 94. Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL et Williamson MS. 1999. « A Sodium Channel Point Mutation Is Associated with Resistance to DDT and Pyrethroid Insecticides in the Peach-Potato Aphid, *Myzus Persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) ». *Insect Molecular Biology* 8 (3): 339-46.
 95. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M et Sattelle DB. 2001. « Neonicotinoids: Insecticides Acting on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors ». *Trends in Pharmacological Sciences* 22 (11): 573-80.
 96. Mbare O, Lindsay SW et Fillinger U. 2014. « Pyriproxyfen for mosquito control: female sterilization or horizontal transfer to oviposition substrates by *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Culex quinquefasciatus* ». *Parasites & Vectors* 7 (1): 280.
 97. McLeod P, Diaz FJ et Johnson DT. 2002. « Toxicity, Persistence, and Efficacy of Spinosad, Chlorfenapyr, and Thiamethoxam on Eggplant When Applied Against the Eggplant Flea Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) ». *Journal of Economic Entomology* 95 (2): 331-35.
 98. Mike WS, Townson H. 2017. *The Anopheles vector. Essential Malariology, 4Ed.* CRC Press.
 99. Mishra A et Singh C. 2022. « Effect of Pyriproxyfen against Dipterans as a Growth Regulator » 10 (3).
 100. Mitchell SN, Stevenson BJ, Müller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG, Hemingway J, Paine MJ, Ranson H et Donnelly MJ. 2012. « Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6147-52.
 101. Mosha JF, Kulkarni MA, Lukole E, Matowo NS, Pitt C, Messenger LA, Mallya E et al. 2022. « Effectiveness and Cost-Effectiveness against Malaria of Three Types of Dual-Active-Ingredient Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) Compared with Pyrethroid-Only LLINs in Tanzania: A Four-Arm, Cluster-Randomised Trial ». *The Lancet* 399 (10331): 1227-41.

102. Müller P. Ddt. 1955. « DDT. The insecticide dichlorodi-phenyltrichloroethane and its significance. » *DDT. The insecticide dichlorodi-phenyltrichloroethane and its significance*.
103. Müller P, Chouaïbou M, Pigna^{TEL}li P, Etang J, Walker ED, Donnelly MJ, Simard F et Ranson H. 2008. « Pyrethroid Tolerance Is Associated with Elevated Expression of Antioxidants and Agricultural Practice in *Anopheles Arabiensis* Sampled from an Area of Cotton Fields in Northern Cameroon ». *Molecular Ecology* 17 (4): 1145-55.
104. Nampeloh B, Chisulumi PS, Yohana R, Kidima W et Kweka EJ. 2022. « Effect of pyriproxyfen on development and survival of *Anopheles gambiae* sensu stricto under forested and deforested areas ». *The Journal of Basic and Applied Zoology* 83 (1): 27.
105. Nauen R. 2007. « Insecticide Resistance in Disease Vectors of Public Health Importance ». *Pest Management Science* 63 (7): 628-33.
106. NEUROtiker. 2008. *Deutsch : Struktur von Pyriproxyfène :*
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pyriproxyfen.svg>.
107. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Yates A et Rowland M. 2007a. « Chlorfenapyr: A Pyrrole Insecticide for the Control of Pyrethroid or DDT Resistant *Anopheles Gambiae* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes ». *Acta Tropica* 102 (1): 69-78.
108. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Yates A et Rowland M. 2007b. « Chlorfenapyr: A Pyrrole Insecticide for the Control of Pyrethroid or DDT Resistant *Anopheles Gambiae* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes ». *Acta Tropica* 102 (1): 69-78.
109. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Knols B, Akogbeto M et Rowland M. 2009. « Control of Pyrethroid-Resistant *Anopheles Gambiae* and *Culex Quinquefasciatus* Mosquitoes with Chlorfenapyr in Benin ». *Tropical Medicine & International Health* 14 (4): 389-95.
110. Ngufor C, Fongnikin A, Rowland M et N'Guessan R. 2017. « 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 ». Édité par Pedro L. Oliveira. *Plos one* 12 (12) : e0189575.
111. Ngufor C, N'Guessan R, Fagbohoun J, Subramaniam K, Odjo A, Fongnikin A, Akogbeto M, Weetman D et Rowland M. 2015. « Insecticide Resistance Profile of *Anopheles Gambiae* from a Phase II Field Station in Cové, Southern Benin: Implications for the Evaluation of Novel Vector Control Products ». *Malaria Journal* 14 (1): 464.

112. Nm V, Km C, Gupta Rc, Doss Rb et Canerdy Td. 2016. « Safety of Permethrin and Pyriproxyfen in Dogs Treated With VetGuard Plus® ». *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 4 (3).
113. Odjo EM, Salako AS, Padonou GG, Yovogan B, Adoha CJ, Adjottin B, Sominahouin AA et al. 2023. « What Can Be Learned from the Residual Efficacy of Three Formulations of Insecticides (Pirimiphos-Methyl, Clothianidin and Deltamethrin Mixture, and Clothianidin Alone) in Large-Scale in Community Trial in North Benin, West Africa? » *Malaria Journal* 22 (1): 150.
114. Ohashi K, Nakada K, Ishiwatari T, Miyaguchi J, Shono Y, Lucas JR et Mito N. 2012. « Efficacy of Pyriproxyfen-Treated Nets in Sterilizing and Shortening the Longevity of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) ». *Journal of Medical Entomology* 49 (5): 1052-58.
115. Ohba S, Ohashi K, Pujiyati E, Higa Y, Kawada H, Mito N et Takagi M. 2013. « The Effect of Pyriproxyfen as a “Population Growth Regulator” against *Aedes albopictus* under Semi-Field Conditions ». *Plos one* 8 (7): e67045.
116. WHO. 2022. *World Malaria Report 2022*. World Health Organization.
117. Ossè RA, Tokponnon F, Padonou GG, Sidick A, Aïkpon R, Fassinou A. Koukpo CZ, et al. 2019. « Involvement of *Anopheles nili* in *Plasmodium falciparum* transmission in North Benin ». *Malaria Journal* 18 (1): 152.
118. Otranto D, Dantas-Torres F et Breitschwerdt EB. 2009. « Managing Canine Vector-Borne Diseases of Zoonotic Concern: Part One ». *Trends in Parasitology* 25 (4): 157-63.
119. Oxborough RM, N’Guessan R, Jones R, Kitau J, Ngufor C, Malone D, Mosha FW et Mark W. Rowland. 2015. « The activity of the pyrrole insecticide chlorfenapyr in mosquito bioassay: towards a more rational testing and screening of non-neurotoxic insecticides for malaria vector control ». *Malaria Journal* 14 (1): 124.
120. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Chabi J, Wat’senga F, Agossa FR, Coleman S et al. 2021. « Determination of the Discriminating Concentration of Chlorfenapyr (Pyrrole) and *Anopheles Gambiae* Senu Lato Susceptibility Testing in Preparation for Distribution of Interceptor® G2 Insecticide-Treated Nets ». *Malaria Journal* 20 (1): 316.
121. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Dabire R, Gnanguenon V, Wat’senga F, Agossa FR et al. 2019. « 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 ». *Malaria Journal* 18 (1): 264.
122. Padonou GG, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G et Akogbéto M. 2012. « Impact of Three Years of Large Scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) Interventions on Insecticide Resistance in *Anopheles Gambiae* s.l. in Benin ». *Parasites & Vectors* 5 (1): 72.
 123. Pages F, Orlandipradines E et Corbel V. 2007. « Vecteurs Du Paludisme: Biologie, Diversité, Contrôle et Protection Individuelle ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 37 (3): 153-61. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.10.009>.
 124. Palma KG, Meola SM et Meola RW. 1993. « Mode of Action of Pyriproxyfen and Methoprene on Eggs of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) ». *Journal of Medical Entomology* 30 (2): 421-26.
 125. Perry T, Chen W, Ghazali R, Yang YT, Christesen D, Martelli F, Lumb C et al. 2021. « Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Mode of Action of Neonicotinoid, Sulfoximine and Spinosyn Insecticides in *Drosophila Melanogaster* ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 131 (avril): 103547.
 126. Philbert A, Lyantagaye SL et Nkwengulila G. 2019. « Farmers' pesticide usage practices in the malaria endemic region of North-Western Tanzania: implications to the control of malaria vectors ». *BMC Public Health* 19 (1): 1456.
 127. Pimprale SS, Besco CL, Bryson PK et Brown TM. 1997. « Increased Susceptibility of Pyrethroid-Resistant Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Chlorfenapyr ». *Journal of Economic Entomology* 90 (1): 49-54.
 128. Protopopoff N, Mosha JF, Lukole E, Charlwood JD, Wright A, Mwalimu CD, Manjurano A et al. 2018. « 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 ». *The Lancet* 391 (10130): 1577-88.
 129. Pryce J, Medley N et Choi L. 2022. « Indoor Residual Spraying for Preventing Malaria in Communities Using Insecticide-treated Nets ». *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n° 1.
 130. Raghavendra K, Barik TK, Sharma P, Bhatt RM, Srivastava HC, Sreehari U et Dash AP. 2011. « Chlorfenapyr: A New Insecticide with Novel Mode of Action Can Control Pyrethroid Resistant Malaria Vectors ». *Malaria Journal* 10 (1): 16.

- 131.Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J et Collins FH. 2000. « Identification of a Point Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Kenyan *Anopheles Gambiae* Associated with Resistance to DDT and Pyrethroids ». *Insect Molecular Biology* 9 (5): 491-97.
- 132.Ranson H et Lissenden N. 2016. « Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation That Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control ». *Trends in Parasitology*, Special Issue: Vectors, 32 (3): 187-96.
- 133.Ranson H, N’Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z et Corbel V. 2011. « Pyrethroid Resistance in African *Anopheline* Mosquitoes: What Are the Implications for Malaria Control? » *Trends in Parasitology* 27 (2): 91-98.
- 134.Rathnayake LK et Northrup SH. 2016. « Structure and Mode of Action of Organophosphate Pesticides: A Computational Study ». *Computational and Theoretical Chemistry* 1088 (juillet): 9-23.
- 135.Reid MC et McKenzie FE. 2016. « The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors ». *Malaria Journal* 15 (1): 107.
- 136.Rodriguez-Morales AJ. 2016. *Current Topics in Malaria*. BoD – Books on Demand.
- 137.Ross GAP. 1936. « Insecticide as a Major Measure in Control of Malaria, being an Account of the Methods and Organisation put in Force in Natal and Zululand during the Past Six Years. » *Insecticide as a Major Measure in Control of Malaria, being an Account of the Methods and Organisation put in Force in Natal and Zululand during the Past Six Years*.
- 138.Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H et al. 2018. « Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 ». *The Lancet* 392 (10159): 1736-88.
- 139.Sagbohan HW, Kpanou CD, Osse R, Dagnon F, Padonou GG, Sominahouin AA, Salako AS et al. 2021. « Intensity and mechanisms of deltamethrin and permethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations in southern Benin ». *Parasites & Vectors* 14 (1): 202.
- 140.Sagbohan HW, Kpanou CD, Sovi A, Osse R, Sidick A, Adoha C, Yovogan B et al. 2022. « Pyrethroid Resistance Intensity in *Anopheles gambiae* s.l. from Different Agricultural Production Zones in Benin, West Africa ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 22 (1): 39-47.

- 141.Sagbohan HW, Kpanou CD, Sovi A, Osse R, Sidick A, Adoha C, Yovogan B et al. s. d. « Pyrethroid Resistance Intensity in *Anopheles Gambiae* s.l. from Different Agricultural Production Zones in Benin, West Africa », 9.
- 142.Salako AS, Ahogni I, Aikpon R, Sidick A, Dagnon F, Sovi A, Sominahouin AA, Fiacre Agossa, Laurent Iyikirenga, et Martin C. Akogbeto. 2018. « 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* 11 (1): 618.
- 143.Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z et della Torre A. 2008. « Insertion Polymorphisms of SINE200 Retrotransposons within Speciation Islands of *Anopheles Gambiae* Molecular Forms ». *Malaria Journal* 7 (1): 163.
- 144.Sinka ME. 2013. *Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria. Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*. IntechOpen.
- 145.Soderlund DM. 2010. « Chapter 77 - Toxicology and Mode of Action of Pyrethroid Insecticides ». In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*, édité par Robert Krieger, 1665-86. New York: Academic Press.
- 146.Soderlund DM. 2020. « Chapter Three - Neurotoxicology of Pyrethroid Insecticides ». In *Advances in Neurotoxicology*, édité par Michael Aschner et Lucio G. Costa, 4:113-65. Neurotoxicity of Pesticides. Academic Press.
- 147.Stephens JWW. 1922. « A New Malaria Parasite of Man ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 16 (4): 383-88. <https://doi.org/10.1080/00034983.1922.11684331>.
- 148.Taillebois E, Cartereau A, Jones AK et Thany SH. 2018. « Neonicotinoid Insecticides Mode of Action on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors Using Binding Studies ». *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Special issue: Advances in insecticide mode of action, chemistry, and resistance, 151 (octobre): 59-66.
- 149.Takken W et Knols BGJ. 2007. *Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe*. Wageningen Academic Publishers.
- 150.Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Jukić M et Včev A. 2019. « Malaria: The Past and the Present ». *Microorganisms* 7 (6): 179.
- 151.Tang T, Ruxin W, Zhang L, Wang Y, Ling J, Du W, Shen G, Chen Y et Zhao M. 2021. « Distribution and Partitioning of Pyrethroid Insecticides in Agricultural Lands: Critical Influencing Factors ». *Environment International* 156 (novembre): 106736.

152. Tangena JA, Hendriks CMJ, Devine M, Tammamro M, Trett AE, Williams I, DePina AJ, et al. 2020. « Indoor residual spraying for malaria control in sub-Saharan Africa 1997 to 2017: an adjusted retrospective analysis ». *Malaria Journal* 19 (1): 150.
153. Taylor M. 1996. « Molecular biology and evolution of resistance of toxicants. | Molecular Biology and Evolution | Oxford Academic ». 1996.
154. Tapa A, Kengne-Ouafo JA, Djova VS, Tchouakui M, Mugenzi LMJ, Djouaka R, Pieme CA et Wondji CS. 2022. « Molecular Drivers of Multiple and Elevated Resistance to Insecticides in a Population of the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* in Agriculture Hotspot of West Cameroon ». *Genes* 13 (7): 1206.
155. Thany SH. 2023. « Molecular Mechanism of Action of Neonicotinoid Insecticides ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (6): 5484.
156. Tomizawa M et Casida JE. 2005. « Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (1): 247-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>.
157. Tomlin CDS. 2009. « The Pesticide Manual: A World Compendium. » *The Pesticide Manual: A World Compendium.*, n° Ed.15.
158. Toshio N. 1992. « Nerve Membrane Na⁺ Channels as Targets of Insecticides ». *Trends in Pharmacological Sciences* 13 (janvier): 236-41.
159. Tudi M, Ruan HD, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, Chu C et Phung DT. 2021. « Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (3): 1112.
160. Ujihara K. 2019. « The History of Extensive Structural Modifications of Pyrethroids ». *Journal of Pesticide Science* 44 (4): 215-24.
161. Ullah S, Shah RM et Shad SA. 2016. « Genetics, Realized Heritability and Possible Mechanism of Chlorfenapyr Resistance in *Oxycarenum Hyalinipennis* (Lygaeidae: Hemiptera) ». *Pesticide Biochemistry and Physiology* 133 (octobre): 91-96.
162. Uneme H 2011. « Chemistry of Clothianidin and Related Compounds ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (7): 2932-37.
163. Urabayala SRK, Tiwari SN, Sreedharan S, Ghosh SK et Valecha N. 2018. « Village-Scale (Phase III) Evaluation of the Efficacy and Residual Activity of SumiShield[®] 50 WG (Clothianidin 50%, w/w) for Indoor Spraying for the Control of Pyrethroid-Resistant *Anopheles Culicifacies* Giles in Karnataka State, India ». *Tropical Medicine & International Health* 23 (6): 605-15.

164. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M et Raymond M. 2004. « The Unique Mutation in Ace-1 Giving High Insecticide Resistance Is Easily Detectable in Mosquito Vectors ». *Insect Molecular Biology* 13 (1): 1-7.
165. Whalon ME, Mota-Sanchez D et Hollingworth RM. 2008. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CABI.
166. White NJ. 2008. « Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite ». *Clinical Infectious Diseases* 46 (2): 172-73.
167. WHO. 2017. *Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme*. Seconde édition. Genève: Organisation mondiale de la Santé.
168. WHO. 2022a. « I2I-SOP-002 protocol (adapted from WHO, 2011) ». 2022. [https://www.google.com/search?hl=fr&q=I2I-SOP-002+protocol+\(adapted+from+WHO,+2011\)+](https://www.google.com/search?hl=fr&q=I2I-SOP-002+protocol+(adapted+from+WHO,+2011)+).
169. WHO. 2022b. « Standard Operating Procedure for Testing Insecticide Susceptibility of Adult Mosquitoes in WHO Bottle Bioassays ».
170. « WHO 2005 ». s. d. Consulté le 31 août 2022. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/122335/EM_RC52_3_fr.pdf.
171. « WHO_DCO.pdf ». s. d. Consulté le 27 août 2022. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111008/WHO_DCO?sequence=1.
172. « WHO-HTM-NTD-VEM-2017.03-eng.pdf ». s. d. Consulté le 5 janvier 2023. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259688/WHO-HTM-NTD-VEM-2017.03-eng.pdf>.
173. « WHO.pdf ». s. d. Consulté le 5 janvier 2023. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69945/WHO?sequence=1>.
174. « wmr2019-key-points-fr.pdf ». s. d. Consulté le 5 janvier 2023. https://www.who.int/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/wmr2019-key-points-fr.pdf?sfvrsn=3b476c03_2.
175. World Health Organization. 2011. « Guidelines for Monitoring the Durability of Long-Lasting Insecticidal Mosquito Nets under Operational Conditions », n° WHO/HTM/NTD/WHOPES/2011.5: 44.
176. World Health Organization. 2018a. *Global Report on Insecticide Resistance in Malaria Vectors: 2010–2016*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272533>.

177. World Health Organization. 2018b. *World Malaria Report 2018*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275867>.
178. World Health Organization. 2019. « Compendium of WHO Malaria Guidance: Prevention, Diagnosis, Treatment, Surveillance and Elimination ». Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312082>.
179. World health Organization. 2022. « Standard Operating Procedure for Evaluating the Sterilizing Properties of Pyriproxyfen in Adult Female Mosquitoes in WHO Bottle Bioassays », janvier, 26.
180. « World Health Organization - 2019 ». s.d. Consulté le 28 août 2022. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330011/9789241565721-eng.pdf>.
181. « World Health Organization 2014 ». s.d. Consulté le 3 janvier 2023. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111008/WHO_DCO?sequence=1.
182. World Health Organization et WHO Pesticide Evaluation Scheme. 2013. *Guidelines for Laboratory and Field-Testing of Long-Lasting Insecticidal Nets*. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2013.1. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80270>.
183. *World malaria report 2022*. s.d. Consulté le 7 janvier 2023. https://books.google.com/books/about/World_malaria_report_2022.html?hl=fr&id=ST-hEAAAQBAJ.
184. Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, Dabiré R et al. 2011. « Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin ». *Parasites & Vectors* 4 (1): 60.
185. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'guessan R et al. 2010a. « Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin ». *Malaria Journal* 9 (1): 83.
186. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'guessan R et al. 2010b. « Insecticide Resistance Status in *Anopheles gambiae* in Southern Benin ». *Malaria Journal* 9 (1): 83.
187. Yadouleton AWM, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD et Akogbeto MC. 2009a. « Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin ». *Malaria Journal* 8 (1): 103.
188. Yadouleton AWM, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD et Akogbeto MC. 2009b. « Development of Vegetable Farming: A Cause of the Emergence of Insecticide

- Resistance in Populations of *Anopheles Gambiae* in Urban Areas of Benin ». *Malaria Journal* 8 (1): 103.
- 189.Yamanaka N. 2021. « Chapter One - Ecdysteroid Signalling in Insects—From Biosynthesis to Gene Expression Regulation ». In *Advances in Insect Physiology*, édité par Michael E. Adams, 60:1-36. Genes and Endocrine Signaling in Development and Homeostasis. Academic Press.
 - 190.Yapabandara AMGM et CF Curtis. 2002. « Laboratory and Field Comparisons of Pyriproxyfen, Polystyrene Beads and Other Larvicidal Methods against Malaria Vectors in Sri Lanka ». *Acta Tropica* 81 (3): 211-23.
 - 191.Yovogan B, Sovi A, Padonou GG, Adoha CJ, Akinro B, Chitou S, Accrombessi M et al. 2021. « Pre-Intervention Characteristics of the Mosquito Species in Benin in Preparation for a Randomized Controlled Trial Assessing the Efficacy of Dual Active-Ingredient Long-Lasting Insecticidal Nets for Controlling Insecticide-Resistant Malaria Vectors ». *PLOS ONE* 16 (5): e0251742.
 - 192.Zaim M, Aitio A et Nakashima N. 2000. « Safety of Pyrethroid-Treated Mosquito Nets ». *Medical and Veterinary Entomology* 14 (1): 1-5.
 - 193.Zaim M et Guillet P. 2002. « Alternative Insecticides: An Urgent Need ». *Trends in Parasitology* 18 (4): 161-63.
 194. Zhang W, Jiang F et Ou JF. 2011. « Global Pesticide Consumption and Pollution: With China as a Focus ».

Table des matières :

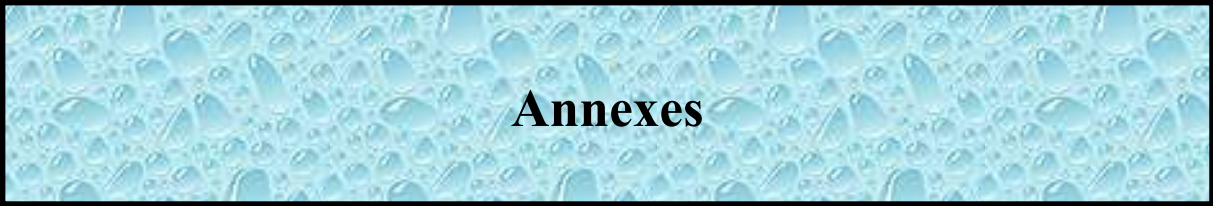
Dédicace.....	i
Remerciements	ii
Sommaire	vii
Résumé	ix
Abstract	x
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Introduction générale.....	1
Introduction générale.....	2
Partie 1 : Synthèse bibliographique.....	7
1. Synthèse bibliographique :	8
1.1. Contexte du paludisme dans le monde	8
1.1.1. Qu'est-ce que le paludisme :	8
1.1.2. De la découverte à une lutte acharnée depuis des siècles	8
1.2. Les vecteurs du paludisme.....	10
1.2.1. Position Systématique	11
1.2.2. Rappel sur la répartition géographique des anophèles	12
1.2.3. Bio-écologie des anophèles	13
1.2.4. Cycle biologique des anophèles.....	14
1.3. Lutte contre les vecteurs du paludisme.....	15
1.3.1. Lutte contre les adultes (ou imagos).....	15
1.3.2. Les différentes classes d'insecticides et leur mécanisme d'action	16
1.4. Résistance des vecteurs aux insecticides	20
1.4.1. Mécanisme de résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides	23
1.5. Plan de gestion de la résistance des vecteurs du paludisme	26

1.6. Les insecticides de la nouvelle génération	26
1.6.1. Les néonicotinoides	29
1.6.2. La clothianidine	29
1.6.3. Les pyrroles	29
1.6.4. Les juvénoides ou insecticides analogues de l'hormones juvénile	30
Partie 2 : Cadre, Matériels et Méthodes	33
2. Cadre d'étude	34
2.1. La zone lagunaire.....	34
2.2. La zone Céréalière	35
2.3. La zone rizicole	36
2.4. La zone cotonnière.....	37
3. Matériels et Méthodes	40
3.1. Echantillonnage et élevage des vecteurs	40
3.1.1. Prospection larvaire	40
3.1.2. Elevage des moustiques	40
3.2. Caractérisation de la résistance chez <i>An. gambiae</i> s.l.	41
3.2.1. Tests de sensibilité en tube de l'OMS avec les pyréthrinoides	41
3.2.2. Détermination des gènes de résistance (Kdr <i>L1014F</i>, Ace-1 <i>G119S</i>) et des enzymes de détoxification au sein de la population naturelle de <i>An. gambiae</i> s.l.	41
3.3. Evaluation des insecticides de nouvelle génération	43
3.3.1. Essai biologique en bouteille CDC avec le chlorfénapyr	43
3.3.2. Test en tube de l'OMS adapté avec la clothianidine (imprégnation de papiers filtres avec SumiShield)	43
3.3.3. Evaluation de l'impact du pyriproxyfène sur la reproduction des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. résistantes aux pyréthrinoides	44
3.3.3.2. Impact du pyriproxyfène sur la fécondité des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. résistantes aux pyréthrinoides.....	45

3.4. Techniques d'évaluation de la bio efficacité des moustiquaires de nouvelle génération (Olyset® Plus, PermaNet® 3.0, Royal Guard® et Interceptor® G2) sur les populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. résistantes aux pyréthrinoides.....	46
3.4.1. Test en cône de l'OMS.....	46
3.4.2. Test en tunnel de l'OMS avec la moustiquaire Interceptor® G2.....	47
3.5. Paramètres mesurés et analyses statistiques.....	48
3.6. Considérations éthiques.....	51
Partie 3 : Résultats et Discussion	52
Chapitre 1 : Caractérisation de la résistance des populations de <i>An. gambiae</i> s.l. aux pyréthrinoides.....	53
Statut de resistance des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. a l'alpha-cypermethrine a la permethrine et à la deltamethrine, mutations <i>Kdr</i> et <i>Ace-1R</i>.....	54
1. Contexte de l'étude.....	54
2. Résultats.....	55
2.1. Sensibilité des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. aux pyréthrinoides	55
2.2. Sous espèces apparentées au complexe <i>Anopheles gambiae</i>	56
2.3. Fréquence des mutations <i>Kdr</i> (L1014F) dans différentes populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	57
2.4. Fréquence des mutations <i>Ace-1R</i> (G119S) au sein des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. étudiées	59
2.5. Activités enzymatiques de diverses populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	61
3. Discussion partielle.....	62
4. Conclusion partielle.....	63
Chapitre 2 : Sensibilité des populations résistantes de <i>An. gambiae</i> s.l. au chlorfénapyr et à la clothianidine.....	65
Evaluation de la sensibilité des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. au chlorfénapyr et à la clothianidine.....	66
1. Contexte de l'étude.....	66
2. Résultats.....	67

2.1. Sensibilité des populations résistantes de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin au chorfénapyr	67
2.2. Sensibilité des populations résistantes de <i>Anopheles gambiae</i> s.l. du Sud, du Centre et du Nord Bénin à la Clothianidine (CTD)	68
3. Discussion partielle.....	69
4. Conclusion partielle	70
Chapitre 3 : Impact du pyriproxifène sur la reproduction des populations de <i>An. gambiae</i> s.l.	71
Impact du pyriproxifène sur la reproduction des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	72
1. Contexte de l'étude.....	72
2. Résultats.....	72
2.1. Impact du pyriproxifène avec la moustiquaire Royal guard® sur la fertilité des populations de <i>An. gambiae</i> s.l. de Bohicon, de Ifangni et de Lokossa	72
2.2. Impact du pyriproxifène (100µg) sur la fécondité des populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	75
3. Discussion partielle.....	76
4. Conclusion partielle	77
Chapitre 4 : Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle generation sur diverses populations de <i>An. gambiae</i> s.l.	78
Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle generation sur diverses populations de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	79
1. Contexte de l'étude.....	79
2. Résultats.....	79
2.1. Bio efficacité des moustiquaires de nouvelle génération avec le test en cône de l'OMS	79
2.2. Bio efficacité de Interceptor® G2 avec le test en tunnel de l'OMS	82
3. Discussion partielle.....	86
4. Conclusion partielle	87

Chapitre 5 : Discussion générale, conclusion et perspectives.....	89
Discussion générale	90
Conclusion générale et perspectives	97
Références bibliographiques	100
Annexes	I



Annexes

Annexe 1: Articles publiés

RESEARCH

Open Access



Assessing the susceptibility and efficacy of traditional neurotoxic (pyrethroid) and new-generation insecticides (chlorfenapyr, clothianidin, and pyriproxyfen), on wild pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* from southern Benin

David Mahouton Zoungbédji^{1,2*}, Germain Gil Padonou^{1,2}, Alphonse Keller Konkon^{1,2}, Steve Hougbé¹, Hermann Sagbohan^{1,2}, Casimir Kpanou¹, Albert Sourou Salako¹, Razaki Ossè¹, Rock Aïkpon³, Cyriaque Afoukou³, Aboubakar Sidick¹, Bruno Akinro¹, Saïd Chitou¹, Virgile Gnanguénon⁴, Patrick Condo⁴, Ahmed Saadani Hassani⁵, Daniel Impoinvil⁶ and Martin Akogbéto¹

Abstract

Background The objective of this study was to determine the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* sensu lato (s.l.) from southern Benin to the new insecticides (chlorfenapyr (CFP), pyriproxyfen (PPF), and clothianidin (CTD)) and assess the efficacy of insecticide-treated bed nets (ITNs) that contain these new products.

Methods Wild *An. gambiae* from the Benin communes of Allada, Ifangni, Akpro-Misséréte, and Porto-Novo were tested for their susceptibility to CFP and PPF using the WHO bottle tests, and pyrethroids (alpha-cypermethrin, deltamethrin, and permethrin) and CTD using WHO tube tests. WHO cone tests were used to evaluate the efficacy of Interceptor[®] (which contains alpha-cypermethrin (ACM) only), Interceptor[®] G2, (CFP + ACM), and Royal Guard[®] nets (PPF + ACM). The ovaries of blood-fed *An. gambiae* from Ifangni exposed to a new PPF net were dissected, and egg development status was examined using Christopher's stages to determine the fertility status of the mosquitoes. Using a standardized protocol, the oviposition rate and oviposition inhibition rate were calculated from live blood-fed *An. gambiae* placed in oviposition chambers after exposure to PPF.

Results In all four mosquito populations, pyrethroid mortality ranged from 5 to 80%, while chlorfenapyr and clothianidin mortality ranged from 98 to 100%. At Ifangni, all mosquitoes exposed to Royal Guard[®] nets were infertile (100%) while the majority (74.9%) of mosquitoes exposed to Interceptor[®] nets had fully developed their eggs to Christopher's stage V. The oviposition inhibition rate after exposure of the mosquitoes to the PPF was 99% for the wild population of *An. gambiae* s.l. and the susceptible laboratory strain, *An. gambiae* sensu stricto (Kisumu).

*Correspondence:

David Mahouton Zoungbédji
davidzoungbedji91@gmail.com

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



© The Author(s) 2023. **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/>. 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.

Conclusions The results of this study suggest that pyrethroid-resistant *An. gambiae* from the selected communes in southern Benin are susceptible to chlorfenapyr, clothianidin, and pyriproxyfen. In addition, based on bioassay results, new and unused Interceptor® G2 and Royal Guard® nets were effective on Ifangni's mosquito populations. Despite the availability of new effective insecticides, continued vigilance is needed in Benin. Therefore, monitoring of resistance to these insecticides will continue to periodically update the Benin national insecticide resistance database and management plan.

Keywords Chlorfenapyr, Pyriproxyfen, Clothianidin, *Anopheles gambiae*, Insecticide resistance, Long-lasting insecticidal nets, Bio-efficacy, Benin

Background

Long-lasting insecticidal nets (LLINs) are widely used as a preventive measure for controlling malaria in sub-Saharan Africa (SSA) [1]. Their massive scale-up has led to a major reduction in the malaria burden in many sub-Saharan African countries [2, 3]. Thus, the distribution of insecticide-treated nets (ITNs) started in Benin, in 2000. The switch to LLINs as a core vector control intervention distributed to targeted groups occurred in 2005. Thereafter, mass distribution campaigns were performed every 3 years since 2011, with the aim of providing at least one net for every two people in a household. The World Health Organization (WHO) estimates that as of 2021, 54% of the SSA population has access to an LLIN and 47% are sleeping under an LLIN [4]. The ownership rate has increased to 65% since 2020. However, the rapid spread of pyrethroid-resistant vectors seriously threatens to reverse the gains made [5–7]. Indeed, several studies have shown that LLINs become less effective at killing mosquitoes in areas of high resistance compared to areas of susceptibility [8, 9]. It is not clear the extent to which insecticide resistance has contributed to the malaria burden, but it is worth noting that the global malaria cases continued to rise to 232 million in 2019, 245 million in 2020, and 247 million in 2021 [4]. Therefore, the WHO supports the development of alternative tools combining multiple insecticides to improve vector control and insecticide resistance management [10].

To maintain the effectiveness of vector control tools, products with new insecticides including chlorfenapyr (CFP), clothianidin (CTD), and pyriproxyfen (PPF) are outlined on the WHO list of Prequalified Vector Control Products. Clothianidin, a neonicotinoid insecticide, is a relatively new insecticide being used in indoor residual spraying (IRS) with new products including Fludora® Fusion, SumiShield® Klypson™, and 2GARD™. Conversely, new nets with dual active

ingredients have emerged such as Interceptor® G2 nets with alpha-cypermethrin and chlorfenapyr, a pyrrole insecticide, and Royal Guard® nets with alpha-cypermethrin and pyriproxyfen, an insect growth regulator.

Clothianidin acts as an agonist of nicotinic acetylcholine receptors causing paralysis and death in insects [11, 12]. Chlorfenapyr disrupts the energy pathways of insects in their mitochondria by preventing the formation of adenosine triphosphate (ATP), resulting in cell death and insect mortality [13]. Pyriproxyfen causes insect-specific physiology and morphogenesis [14] changes in adult mosquitoes by disrupting ovarian development, egg laying, and hatching [15, 16]. Clothianidin is very effective against mosquito vectors in laboratory [17, 18], semi-field [19], and field trials [20, 21]. Chlorfenapyr and pyriproxyfen products have demonstrated superior efficacy compared to the standard pyrethroid LLIN in small-scale entomological trials and were found to be effective in Phase I and Phase II trials in West Africa [22–26]. There are also ongoing studies in Benin [27, 28] and Tanzania [29] on the efficacy of two dual-active ingredient long-lasting insecticidal nets (Royal Guard® and Interceptor® G2) for control of malaria transmitted by pyrethroid-resistant vectors.

As part of the routine insecticide resistance monitoring activities in Benin, the susceptibility to (1) pyrethroid insecticides, (2) CTD, (3) CFP, and (4) PPF, was evaluated using WHO insecticide resistance protocols [30–34]. *Anopheles gambiae s.l.* populations (thereafter, they will be called *An. gambiae*, unless otherwise stated) with high pyrethroid resistance based on WHO bioassays [35, 36] and molecular analysis of the frequency of *kdr* gene allele, L1014F [5, 37, 38] were used in the appropriate assays for the corresponding insecticides. In Ifangni, *An. gambiae* were also exposed to Royal Guard® and Interceptor® G2 nets to assess the bio-efficacy of these nets on the mosquito population.

The objective of this study was to determine the susceptibility of wild pyrethroid-resistant *An. gambiae* from southern Benin to these insecticides and assess the efficacy of insecticide-treated bed nets (LLINs) that contain these new products.

Methods

Study sites

This study was conducted in southern Benin from January to June 2022 in four communes: Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-Novo, and Allada (Fig. 1). The 4 selected sites are characterized by their proximity to lagoons. The larval collection was conducted in Ita-Soumba, a village in the commune of Ifangni; Akpro-Missérété, a central arrondissement of the commune of Akpro-Missérété; Gbodjè, a neighbourhood in the fourth arrondissement of the commune of Porto-Novo; and Allada the central arrondissement of the commune of Allada. These communes were chosen based on the reported biting rate of the malaria vectors in the areas and their widespread resistance to pyrethroids in southern Benin [7, 39]. These sites have a sub-equatorial climate with two rainy seasons and two dry seasons. The communes of Ifangni and Allada are located

in the Plateau and Atlantic departments, respectively, and Akpro-Missérété and Porto-Novo in the Ouémé department. Ifangni is a rural commune where agriculture, handicrafts, and commerce are the main activities. The total annual rainfall of the region is 1217.1 mm. It is crossed by the Igidi River to the east; thus, the valley of the commune is occupied by swampy forests that offer the population the opportunity to practice off-season crops, including market gardening [40]. Annual rainfall in the commune of Akpro-Missérété is between 1100 and 1300 mm, while that of Porto-Novo is about 1200 mm with very high humidity (75%). Akpro-Missérété has a few rivers, marshes, swamps, and shallows that offer the inhabitants the possibility of practicing activities such as market gardening and fish farming. In Porto-Novo, trade, fishing, and livestock are the main activities practiced [41]. In Allada, the town located in the centre of the Atlantic Department, annual rainfall averages 800 to 1000 mm. The hydrographic network is composed of the Couffo River and Lake Ahémé. The main activities are agriculture, livestock, and fishing. The LLINs distributed during mass campaigns and as part of routine campaigns (to pregnant women and

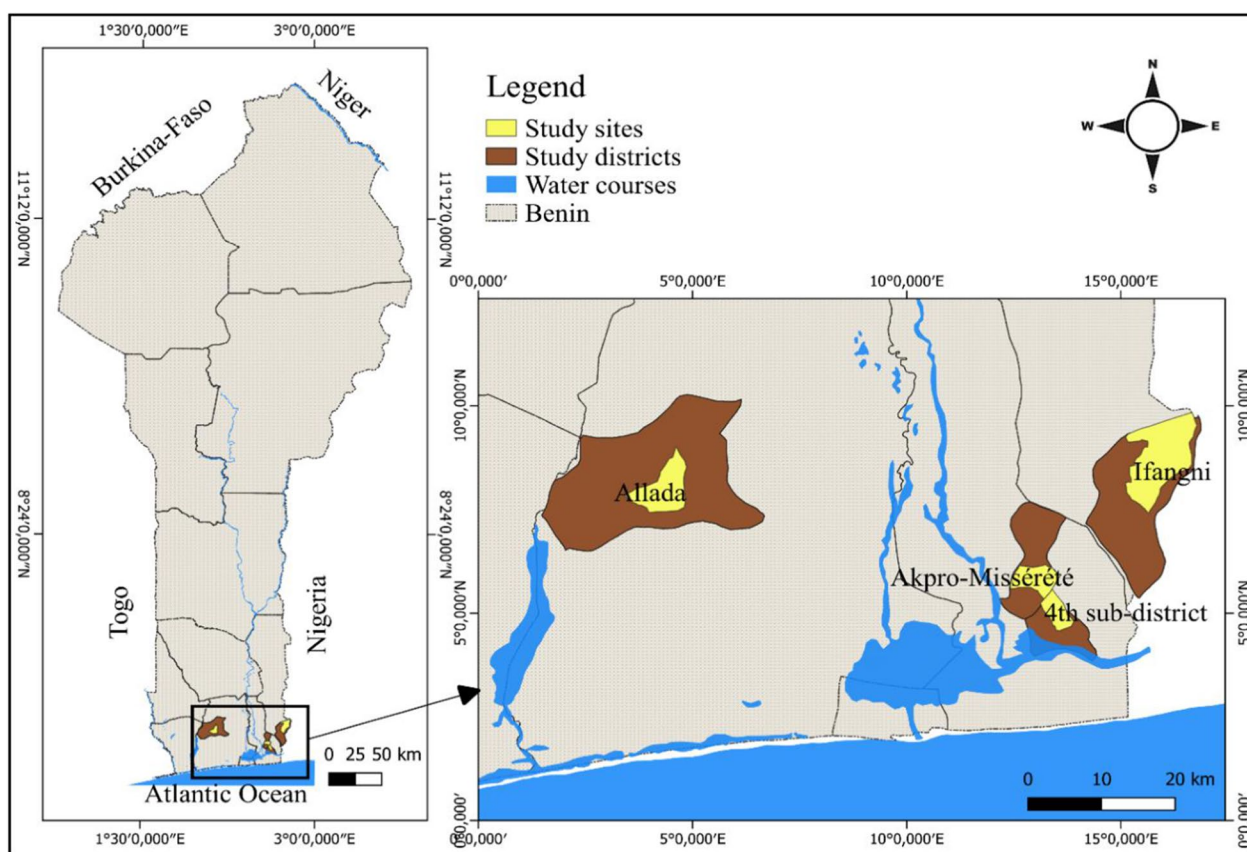


Fig. 1 Map of study sites in Benin

schoolchildren) constitute the main means of prevention against mosquito bites in these different localities.

Mosquito larvae collection and rearing

Larvae of *An. gambiae* were collected in the four districts of southern Benin (Allada, Ifangni, Akpro-Misséréte, Porto-Novo) using standard dipping techniques [42]. The larvae were transported to the insectary of the Centre for Research in Entomology of Cotonou (CREC) for rearing. The pupae obtained were grouped in different cages and they were allowed to emerge into adult mosquitoes. After morphological identification using the Coetzee determination key [43], only specimens of *An. gambiae* were used for testing.

Sensitivity testing of adult mosquitoes to pyrethroids, chlorfenapyr, clothianidin, and pyriproxyfen.

The WHO tube test for pyrethroids

Specimens of females *An. gambiae* aged 2–5 days were used for WHO tube susceptibility testing. The tests were conducted by exposing for 60 min, batches of 20–25 female mosquitoes to deltamethrin 0.05%, permethrin 0.75%, and alpha-cypermethrin 0.05% to assess the susceptibility of mosquitoes collected to these insecticides. For all tests performed, the number of mosquitoes that were knocked down by the insecticide was recorded every 15 min. Batches of 20–25 mosquitoes exposed to non-impregnated papers served as controls. Post-exposure, the mosquitoes were transferred to the observation tubes where they were fed with a 10% sugar solution for 24 h. Mortality rates were determined 24 h post-testing [4].

WHO tube test adapted for impregnation of filter papers with clothianidin (SumiShield®)

To assess the ability of a commercial formulation of an insecticide to kill a local population of field-collected *An. gambiae*, the WHO susceptibility tests with the insecticide, SumiShield® 50WG, with minor modifications to the standard guidelines [33] were used. Whatman® filter papers measuring 12 cm by 15 cm were treated with candidate diagnostic doses of SumiShield® 50WG (containing 50% CTD) diluted in distilled water. A stock solution was prepared by diluting 264 mg SumiShield® 50WG in 20 ml distilled water. Two millilitres of the mixed solution were pipetted evenly onto each filter paper and stored at 4 °C until use. Filter paper treated with 2 ml of distilled water was used as a negative control. The exposure time for CTD was set at 60 min. After exposure, mosquitoes were transferred to observation tubes lined

with untreated paper (25 °C and 80% humidity) with free access to a 10% sugar solution and changed daily. The knockdown was recorded at 30 min and 60 min. Mortality was recorded at 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days after exposure [44]. This method was used before the newly finalized WHO protocols for testing clothianidin.

The WHO bottle bioassay with chlorfenapyr

To prepare the CFP solution for coating bottles, the stock solution was diluted with acetone. Glass Wheaton bottles (250 ml) and their caps were coated with 1 ml of 100 µg/ml of CFP. In parallel, a control bottle was coated with 1 ml of acetone, following which all bottles were covered with a sheet and left to dry in the dark for 24 h. Mosquitoes were exposed to CFP for 60 min. Following the exposure to the insecticide, mosquitoes were transferred to a paper cup covered with untreated netting, provided with lightly moistened cotton wool containing 10% sugar solution (changed daily), and monitored at 24 h, 48 h, and 72 h. The knockdown rate was recorded at 60 min and mortality at 24 h, 48 h, and 72 h after exposure. One hour after exposure to insecticide, dead mosquitoes were preserved on RNA later and stored in a – 80 freezer. Dead mosquitoes after 24 h, 48 h, and 72 h were collected and preserved in 1.5 Eppendorf tubes containing cotton and silica gel [31]. The same test was performed with a susceptible strain of *An. gambiae* sensu stricto (s.s.) (Kisumu) raised in an insectarium. The susceptible strain was compared with the wild mosquitoes. The testing period and 3-day post-exposure temperature (24–26 °C) were controlled using an air-conditioner. The relative humidity of the room was 78% ± 10%. This method was used before the newly finalized WHO protocols for testing chlorfenapyr.

Sterilizing properties of pyriproxyfen using WHO bottle bioassays

Quantification of oviposition inhibition of female *An. gambiae* requires 200 mosquitoes collected in the field and 200 mosquitoes from a susceptible laboratory colony [32]. To perform the test, 16 Wheaton® 250 ml bottles with caps among which 8 bottles per mosquito strain were to be used. For each strain of mosquito, 4 bottles were covered with 1 ml of acetone (for control bottles) and 4 others with 1 ml of PPF solution of a concentration of 100 µg after dilution of the stock solution with acetone [32]. Each vial and its cap were labeled (name, insecticide concentration, date), wrapped in aluminum foil, and left open to dry for 2 h in an air condition room with a temperature between 20 °C and 23 °C. Female mosquitoes were left in a cage for one week with virile

males to promote good insemination. Female mosquitoes were blood-fed once in the evening of their seventh day and a second time 48 h after the first blood meal. No later than 12 h after the second blood meal, mosquitoes were introduced in batches of 25 into the control and test vials for a one-hour exposure. They were then transferred back in batches of 25 into labeled 440-mL paper cups, fed with 10% sugar solution, and held for 72 h at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ and $75 \pm 10\%$ humidity where the number of live and dead mosquitoes was recorded every 24 h. After the holding period, live mosquitoes (controls and tests of both strains) were (1) individually transferred into 100 ml paper cups (oviposition chambers) covered with a piece of mosquito netting (2) provided 10% glucose solution, and (3) placed under oviposition observation for 4 days where mortality and positive (with eggs) and negative (without eggs) oviposition chambers were recorded for calculation of oviposition rate and oviposition inhibition rate. This method was used before the newly finalized WHO protocols for testing pyriproxyfen.

Bio-efficacy Evaluation of Dual AI ITNs: Royal Guard[®] and Interceptor[®] G2

WHO cone bioassay of unwashed Royal Guard[®] nets to determine the knockdown and mortality rate of wild populations of *An. gambiae* from Allada, Akpro-Missérété, Ifangni, and Porto-Novo.

New-generation Interceptor G2 and Royal Guard nets were randomly selected from batches of LLINs supplied by the manufacturer for evaluation of their effectiveness at T0

Four populations of wild populations of *An. gambiae* from southern Benin (Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-Novo, and Allada) and a susceptible laboratory strain of *An. gambiae* s.s. (Kisumu) were used to evaluate the bio-efficacy of PPF-LLIN (Royal Guard[®]) according to the I2I-SOP-002 protocol [45] which calls for the use of 40 mosquitoes per net (for 4 swatches of the same net). In the present study, 5 swatches of 30 cm × 30 cm of each side of unwashed Royal Guard[®] LLINs were tested. A total of 50 mosquitoes of each strain were used. Two standard cones were attached with a plastic plate to each of the net swatches. Five unfed *An. gambiae* females, 2–5 days old, were introduced into each cone for 3 min. After exposure, the mosquitoes are gently removed, transferred to neutral cups, fed with sugar solution, and placed under observation for 72 h. The knockdown effect was read after 60 min of observation and mortality every 24 h until 72 h. Bioassays were performed at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 10\%$ humidity.

WHO cone bioassay with unwashed Royal Guard[®] nets to determine the fertility of mosquitoes from Ifangni

The efficacy of three types of nets, unwashed PPF-LLIN (Royal Guard[®]), unwashed alpha-cypermethrin LLIN (Interceptor[®]), and negative control (unwashed untreated net) was evaluated using the WHO cone bioassay. The test was performed on adult female *Anopheles gambiae* s.l. from the Ifangni district only because of insufficient availability of mosquitoes from the larval sites from Akpro-Missérété, Allada, and Porto-Novo. Six to 12 h after their second blood meal, batches of 5 well-fed mosquitoes were exposed for 3 min to samples with two replicates of each type of net. A total of 80 mosquitoes were used per net. After exposure, mosquitoes were transferred and fed (sugar solution) in veiled cups and labeled with the net sample ID and position (roof or side). Bioassays were performed at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 10\%$ humidity. Mortality was recorded at 24, 48, and 72 h after exposure. Mosquitoes surviving 72 h after each type of net were dissected and data on the egg development status in the ovaries of each mosquito according to Christopher's stages were reported. Fertile, infertile, and inconclusive mosquitoes were recorded on a data recording sheet and photographs of the ovaries were taken with a digital camera looking through the ocular lens (see the conceptual diagram of the study, Fig. 2).

Tunnel test with unwashed Interceptor[®] G2 nets

Tunnel tests [46] were conducted only in Allada and Akpro-Missérété due to the availability of mosquitoes. Non-blood-fed 5 to 8 days old female *Anopheles* mosquitoes were released into a 60 cm square tunnel (25 cm × 25 cm square section). At each end of the tunnel, a 25 cm² cage covered with a polyester net is installed. The unwashed CFP-LLIN sample was placed one-third of the way along the glass tunnel. An area of 400 cm² (20 cm × 20 cm) of the net was available to the mosquitoes. Nine equidistant 1 cm diameter holes were cut into the CFP-LLIN. In the shortest part of the tunnel, an immobilized guinea pig was made available to the mosquitoes. One hundred (100) female mosquitoes were introduced into the cage at the end of the longest section of the tunnel. A separate tunnel with an untreated net was used as a negative control. After 12 to 15 h of exposure, the mosquitoes were removed from each section of the tunnel. Mortality and blood sampling rates were recorded. Inhibition of blood-feeding was assessed by comparing the proportion of blood-fed females (alive or dead) in treated and control tunnels. The overall

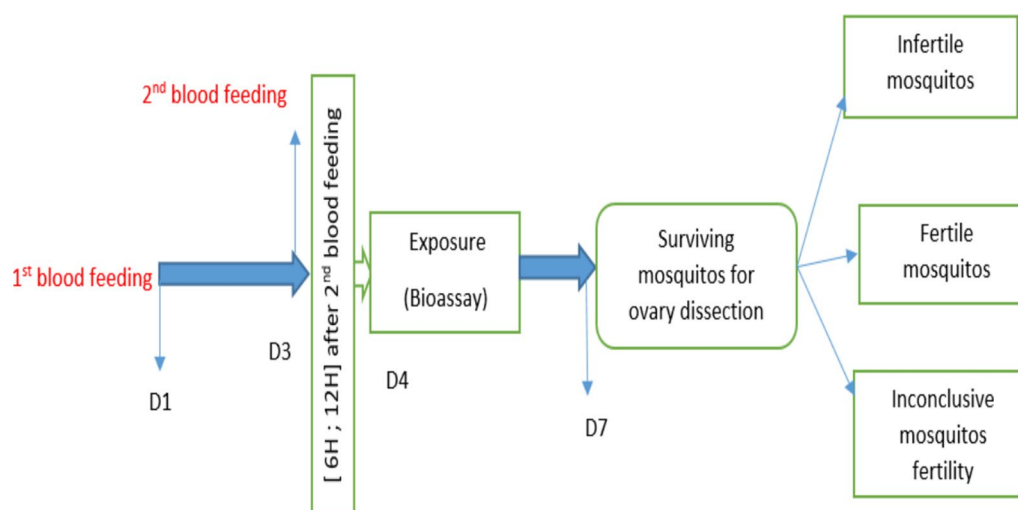


Fig. 2 Conceptual diagram of the fertility study

mortality was measured by pooling the mortality rates of mosquitoes from both tunnel sections. During testing, tunnels, and cages are maintained at 27 ± 2 °C and $75\% \pm 10\%$ relative humidity, at night in total darkness.

Molecular analysis

Identification of *Anopheles gambiae* related species and frequency of *kdr* mutations

Since the mosquitoes showed resistance to pyrethroids, a subsample of dead and live mosquitoes obtained after exposure to deltamethrin 1×, alphacypermethrin 1×, and permethrin 1×, were analyzed by PCR to determine the molecular species [47], the presence of the *kdr* L1014F mutation [48], and the presence of the G119S *ace-1* mutation.

Indicators and data analysis

Knockdown resistance (*kdr*) analysis

The mortality rates recorded after 24 h after exposure of mosquito populations to the diagnostic dose of the different insecticides were interpreted according to WHO criteria [30]:

- A mortality rate of $\geq 98\%$ indicates that the tested mosquito population is susceptible.
- A mortality rate between 90 – 97% indicates the potential onset of insecticide resistance and requires further investigation.
- A mortality rate $\leq 90\%$ indicates insecticide resistance in the tested population.

The allelic frequencies of the *kdr* L1014F mutation were determined by the following formula:

$$F = \frac{2RR + RS}{2(RR + RS + SS)}$$

where RR is the number of homozygous mosquitoes, RS is the number of heterozygous resistant mosquitoes and SS is the number of homozygous mosquitoes.

The binomial exact test was used to test the frequencies of the *kdr* L1014F mutation and calculate confidence intervals for mortality rates. The Mann–Whitney U test was used to compare metabolic enzyme activity between the laboratory-susceptible strain (Kisumu) and those collected in the different areas. All statistical analyses were performed using the R.

Bio-efficacy of nets

Data on the bio-efficacy of nets tested with Kisumu and wild strains were analyzed according to WHO criteria with the variables knockdown (KD) after 60 min and mortality rate after 24 h.

Optimal efficacy : KD60 $\geq 95\%$ or functional mortality $\geq 80\%$.

Minimal efficacy : KD60 $\geq 75\%$ or functional mortality $\geq 50\%$.

Susceptibility of *Anopheles gambiae* to 100 µg PPF

The WHO protocol was used to determine the susceptibility of *An. gambiae* to 100 µg PPF after exposure [32].

For tests to be considered valid the following conditions had to be met.

- Mortality of the control mosquitoes of the laboratory strain or the wild strain is >20% at 72 h after exposure.
- The oviposition rate of the control mosquitoes of the laboratory strain or wild strain is $\geq 30\%$ at the end of day 7 after 1 h of pyriproxyfen exposure.
- Oviposition inhibition of the susceptible laboratory strain at the end of day 7 after 1 h of exposure to pyriproxyfen is $\geq 98\%$.

The interpretation of the test results was as follows:

- Confirmed Resistance: a wild vector population is considered resistant to PPF if oviposition inhibition is <90% at the end of day 7 after 1 h of exposure to the discriminating concentration of the insect growth regulator and if oviposition inhibition in the susceptible mosquito strain (tested in parallel) is $\geq 98\%$.
- Possible Resistance: if oviposition inhibition is $\geq 90\%$ but <98% at the end of day 7 after 1 h of exposure to the discriminant concentration and oviposition inhibition in the susceptible mosquito strain (tested in parallel) is >98%, resistance in the wild strain is possible but not confirmed. The test results should be confirmed by repeating the test with a new sample from the same wild population.
- Susceptibility: a wild vector population is considered susceptible to PPF if oviposition inhibition after 1 h of exposure to the discriminating concentration is $\geq 98\%$ at the end of day 7 and oviposition inhibition in the susceptible laboratory mosquito strain (tested in parallel) is $\geq 98\%$.

Oviposition rate

The indicators below were used to describe the oviposition rate.

- The oviposition rate (egg-laying rate) is the proportion of females that lay eggs out of the total number of females chambered after the 72-h waiting period:
- **Oviposition (%)**

$$= \frac{\text{Number of females that laid}}{\text{Total number of females initially chambered}} \times 100$$
- The reduction in the oviposition rate (egg-laying inhibition rate) is calculated by dividing the percentage reduction in the oviposition rate in treated females by the percentage reduction in the oviposition rate in control females:
- **Oviposition inhibition (%)**

$$= \left[1 - \left(\frac{\text{Oviposition \% in treatment}}{\text{Oviposition \% in control}} \right) \right] \times 100$$

Classification of eggs according to Christopher's stages

Mosquito eggs stages were classified under a microscope and classified as follows:

- Fertile: eggs of *An. gambiae* females have fully developed to Christopher's stage V (normal, boat/sausage-shaped eggs with floats)
- Infertile: the eggs of *An. gambiae* females are not fully developed and remain in Christopher's stages I to IV (less elongated, round eggs without floats)
- Inconclusive: if both stages IV and V are observed, they are inconclusive [49].

Efficacy criteria in WHO cone bioassay or tunnel test

The WHO cone bioassay with Royal Guard LLIN[®] or tunnel test with Interceptor[®] G2 ITNs was used to determine the efficacy of ITNs used in assays. Using Phase I study protocols [50] for the evaluation of LLINs, nets were considered effective against the *An. gambiae* populations, if mosquitoes from bioassays had $\geq 80\%$ mortality or $\geq 95\%$ knockdown or mosquitoes in tunnel test, had $\geq 80\%$ mortality or $\geq 90\%$ blood-feeding inhibition.

Results

Identification of *Anopheles gambiae* from the four areas of southern Benin

Molecular species identification of the *An. gambiae* complex from the 4 sites predominantly identified *Anopheles coluzzii* in Allada (100%), Ifangni (68.3%), and in Porto-Novo (66.1%), while *An. gambiae* s.s. was predominately identified in Akpro-Missérété (86%). A relatively small proportion of *Anopheles arabiensis* (10.7%) was identified in Porto-Novo only (Fig. 3).

Susceptibility testing of adult mosquitoes to pyrethroids, clothianidin, chlorfenapyr, and pyriproxyfen from the four areas of southern Benin

Susceptibility of *An. gambiae* to permethrin, alpha-cypermethrin, and deltamethrin using the WHO tube test

Monitoring vector resistance to insecticides was carried out in lagoonal areas in 4 districts in southern Benin (Porto-Novo, Akpro-Missérété, Allada, and Ifangni) with three pyrethroids (deltamethrin, permethrin, and alpha-cypermethrin) according to the WHO tube test (Fig. 4a). The purpose of this monitoring was to assess the resistance status of the four populations of *An. gambiae* to pyrethroids. Mortality rates were below 80% for

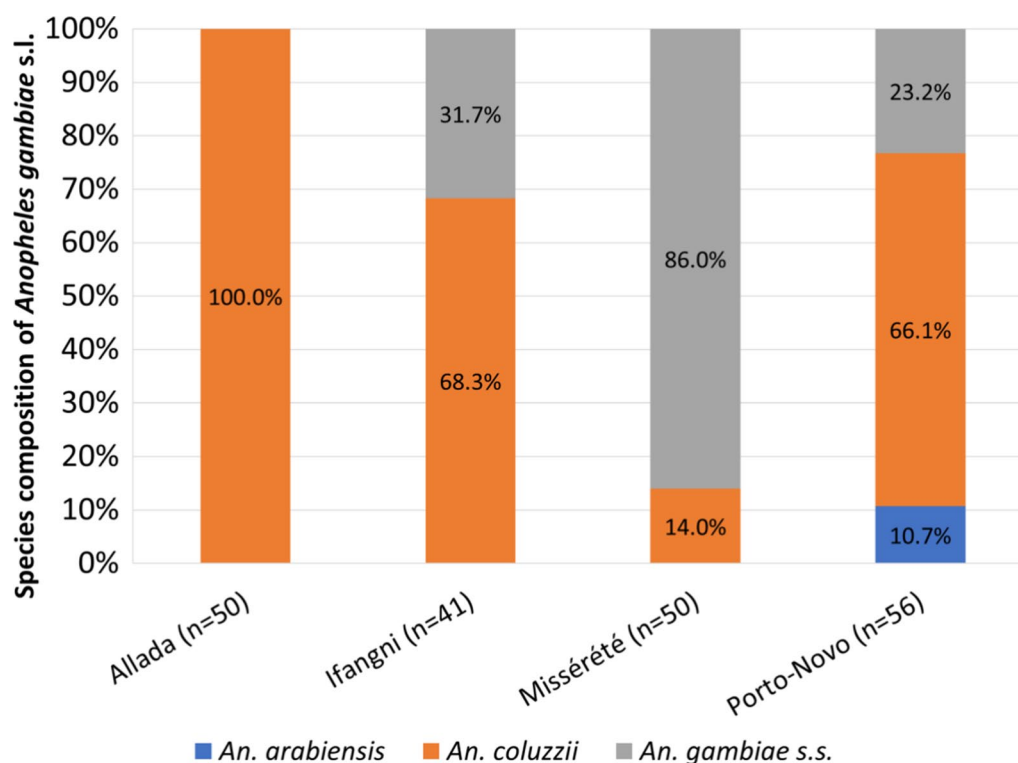


Fig. 3 Percentage (%) species composition of *Anopheles gambiae* in Allada Ifangni, Akpro-Missérété, and Porto-Novo

all insecticides and locations indicating a high resistance to these insecticides.

The frequency of the L1014F allele of the *kdr* gene was high at all sites (>0.70), while the frequency of the G119S allele of the *ace-1R* gene was very low (<0.03). Statistical analyses revealed that there was no significant difference between the frequencies of the *kdr* and *ace-1* resistance genes in the different study sites.

Susceptibility of *An. gambiae* to clothianidin (CTD) using the WHO tube test and impregnated filter paper with SumiShield®

Using impregnated filter papers with SumiShield®, the mortality rates observed 24 h after exposure to CTD were below 80% in all districts: 77% in Ifangni and 69% in Akpro-Missérété, Porto-Novo, and Allada. The mortality rate increased progressively to reach 95% in Ifangni after 48 h while in the other districts, it remained below 90%. The susceptibility threshold was reached after 72 h in Allada (98%), and after 96 h in Porto-Novo (99%) and Ifangni (100%). The total susceptibility (100%) was observed on the fifth day in Ifangni, Allada, and Porto-Novo, and on the sixth day in Akpro-Missérété (Fig. 4b).

Susceptibility of *An. gambiae* to chlorfenapyr (CFP) using the WHO bottle bioassay

The four populations of *An. gambiae* (Ifangni, Akpro-Missérété, Porto-Novo, Allada) were all susceptible to CFP, 24 h after the test, the mortality rates observed were 100% in Porto-Novo and Allada, 99% in Ifangni, and 97% in Akpro-Missérété. After 48 h, the mortality rate increased to 100% in all the localities tested. (Fig. 4c).

Mortality and sterilizing effects of 100 µg pyriproxyfen (PPF) on *An. gambiae* from Ifangni using the WHO bottle bioassay

The mortality rate of the different strains of *An. gambiae* (wild population and Kisumu susceptible strain) exposed to PPF and acetone was monitored for 72 h. This rate did not exceed 20% for any of the strains. For the wild population tested, the mortality rate was 4.1% [95% confidence interval: 1.1–10.2] with PPF and 11.34% [95% confidence interval: 5.8–19.4] with acetone. For the susceptible laboratory Kisumu strain, the mortality rate was 10.0% [95% confidence interval: 4.9–17.6] with PPF and 2.1% [95% confidence interval: 0.3–7.5] with acetone (Table 1).

Table 2 shows the oviposition rate and oviposition inhibition rate of the wild strain Ifangni and the susceptible strain of *An. gambiae* after exposure to PPF and acetone. The oviposition rate of the wild strain Ifangni after 4 days was 1.1% [95% confidence interval: 0.03–5.8] after exposure to PPF and 79.1% [95% confidence interval: 69.0–87.1] after exposure to acetone. The oviposition rate of the susceptible strain (Kisumu) was 1.1% [95% confidence interval: 0.03–6.04] after PPF exposure and 98.9%

[95% confidence interval: 94.1–100] after acetone exposure. The oviposition inhibition rate calculated from the oviposition rates showed that the wild population of *An. gambiae* from Ifangni was 98.7% [95% confidence interval: 93.1–100] and the susceptible Kisumu strain was 99.0% [95% confidence interval: 94.4–100]; both reached the threshold of susceptibility to PPF.

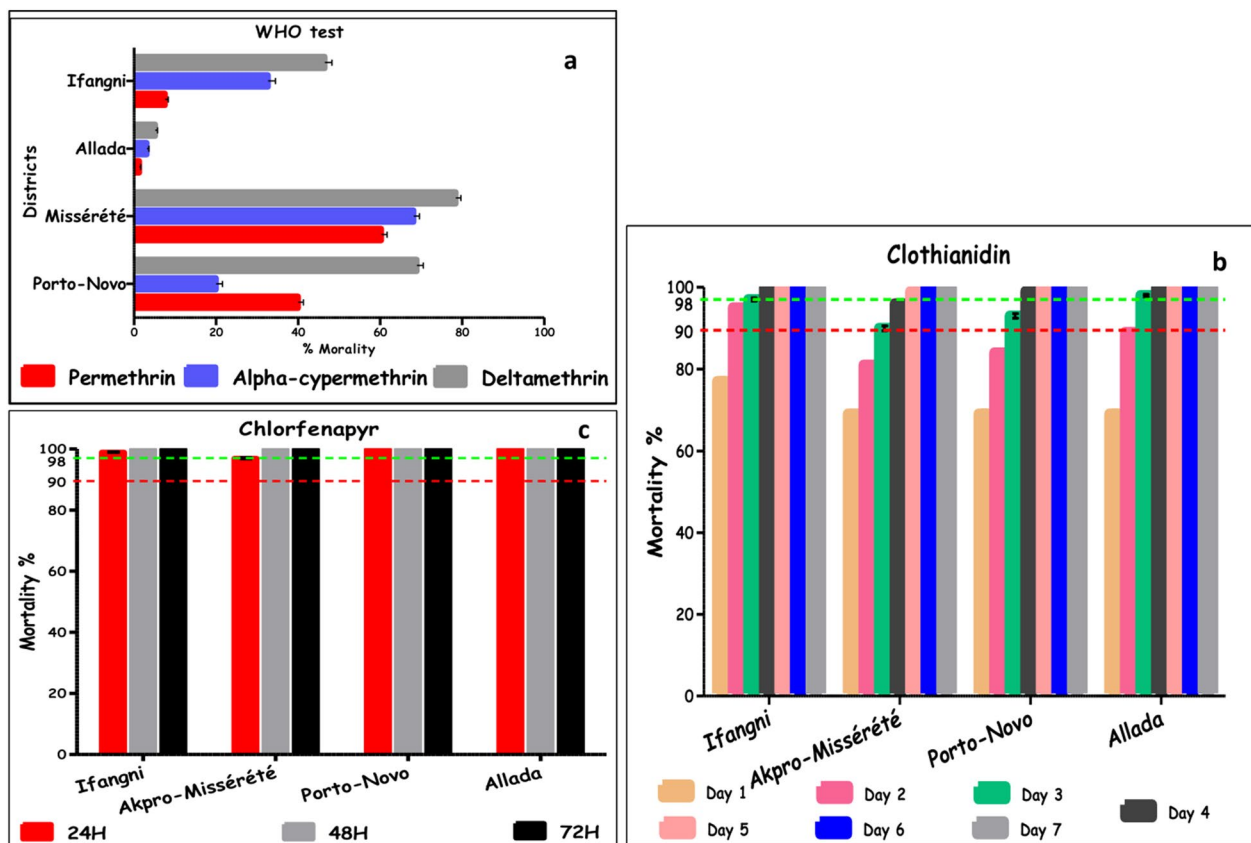


Fig. 4 Mortality rate of *Anopheles gambiae* from the lagoon areas in Ifangni, Allada, Akpro-Misséré, and Porto-Novo after exposure to **a** permethrin, deltamethrin, and alpha-cypermethrin using the WHO tube test; **b** clothianidin using the WHO tube test with impregnated papers with SumiShield®; and **c** chlorfenapyr using the WHO bottle bioassay

Table 1 Mortality rate of a susceptible laboratory colony of *Anopheles gambiae* s.l. (Kisumu strain) and wild *Anopheles gambiae* s.l. from Ifangni at 24-, 48-, and 72-h post-exposure to 100 µg pyriproxyfen (PPF) and acetone (control) using the WHO bottle bioassay

Strain	Insecticide	Number tested	Percentage (%) mortality at different time points [95% confidence interval]		
			24 h	48 h	72 h
Ifangni	PPF	97	1.0 [0–5.6]	2.1 [0.3–7.3]	4.1 [1.1–10.2]
	Acetone	97	3.1 [0.6–8.8]	6.2 [2.3–13]	11.3 [5.8–19.4]
Kisumu	PPF	100	8.0 [3.5–15.2]	9.0 [4.2–16.4]	10.0 [4.9–17.6]
	Acetone	94	0	0	2.1 [0.3–7.5]

PPF: pyriproxyfen; %: percentage

Bio-efficacy evaluation of dual AI ITNs: Royal Guard® and Interceptor® G2

WHO cone bioassay with unwashed Royal Guard® nets (PPF-LLIN) using Kisumu strain mosquitoes and wild mosquitoes from Allada, Akpro-Missérété, Ifangni, and Porto-Novo

The knockdown percentage and mortality rate observed 24 h after exposure of the Kisumu strain to the unwashed PPF-LLIN was 100%. For the wild populations of *An.*

gambiae, the knockdown rates ranged from ~41% in Porto-Novo to ~59% in Akpro-Missérété, and the mortality rates ranged from ~34% in Allada to ~62% in Ifangni (Fig. 5).

Impact of unwashed PPF-LLIN (Royal Guard®) on the fertility of *An. gambiae* from Ifangni using the WHO cone bioassay

Table 3 presents the results of the fertility of females of *An. gambiae* mosquitoes from Ifangni were exposed

Table 2 Oviposition and oviposition inhibition rates of a susceptible laboratory colony of *Anopheles gambiae* s.l. (Kisumu strain) and wild *Anopheles gambiae* s.l. from Ifangni after exposure to 100 µg pyriproxyfen (PPF) and acetone (control) using the WHO bottle bioassay

Strain	Test	Chambers tested at 96 h	Percentage (%) of eggs laid at different time intervals [95% confidence interval {CI}]				Oviposition inhibition (%) [95% CI]
			96 h	120 h	144 h	168 h	
Ifangni	PPF	93	0	0	1.1 [0.03–5.8]	1.1 [0.03–5.8]	98.7 [93.1–100]
	Acetone	86	0	14.0 [7.4–23.1]	61.6 [50.5–71.9]	79.1 [69.0–87.1]	
Kisumu	PPF	90	0	0	1.1 [0.03–6.0]	1.1 [0.03–6.0]	99.0 [94.4–100]
	Acetone	92	66.3 [55.7–75.8]	82.6 [73.3–89.7]	87.0 [78.3–93.1]	98.9 [94.1–100]	

Hrs: hours; PPF: pyriproxyfen

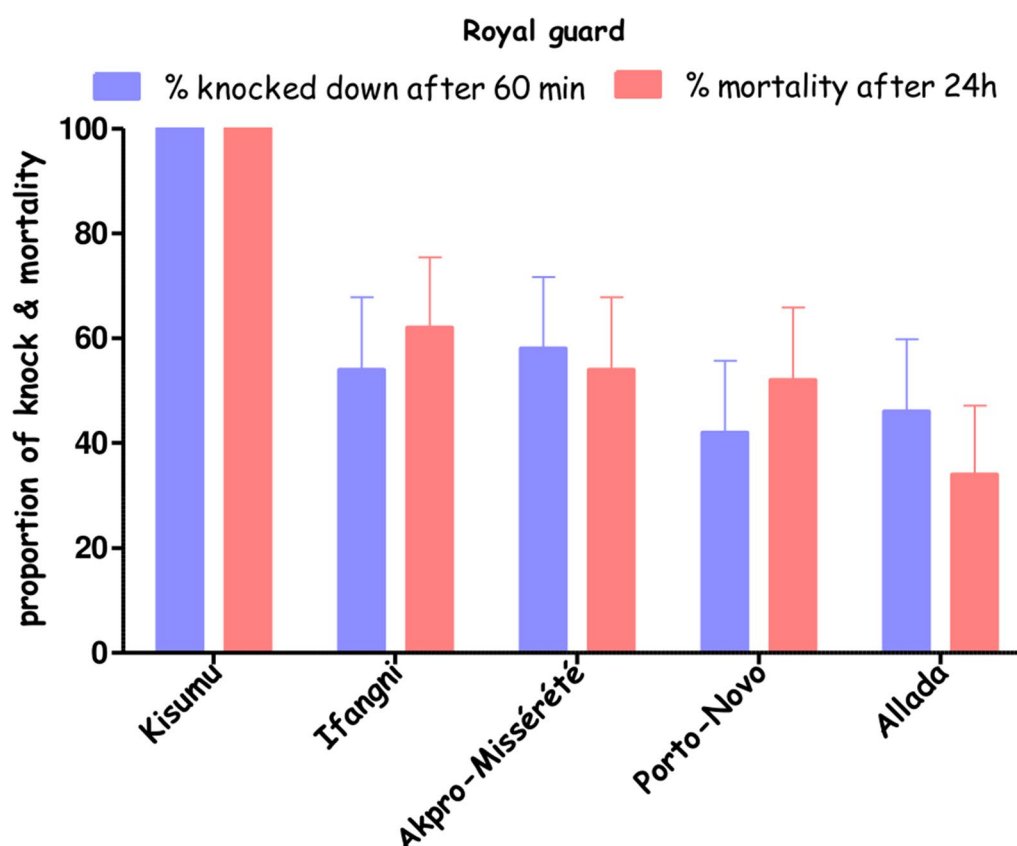


Fig. 5 Knockdown and mortality rate of *Anopheles gambiae* from lagoon areas in Ifangni, Allada, Akpro-Missérété, and Porto-Novo after exposure to a Royal Guard® Net using the WHO cone bioassay on nets

to 3 types of nets: unwashed Royal Guard, unwashed Interceptor® (positive control), and an unwashed untreated net (negative control). All mosquitoes exposed to the Royal Guard nets were infertile with no egg follicle reaching Christopher's stage IV or V), while 74.2% [95% confidence interval: 55.4–88.1] of *An. gambiae* exposed to the Interceptor® net and 73.8% [95% confidence interval: 58.0–86.1] exposed to the untreated net had fully developed egg follicles (i.e., Christopher's stage V). Finally, 3.2 percent [95% confidence interval: 0.1–16.7] of mosquitoes exposed to the Interceptor® net and 21.4% [95% confidence interval: 10.3–36.8] of mosquitoes exposed to the untreated net had inconclusive results.

Efficacy of unwashed CFP-LLIN (Interceptor® [IG2]) on wild populations of *An. gambiae* from Allada and Akpro-Misséréte using the WHO tunnel test

Table 4 presents the results of the tunnel test after exposure of wild populations of *An. gambiae* in Allada and Akpro-Misséréte to an IG2 net. Mortality after 15 h of exposure was 3% [95% confidence interval: 0.6–8.5] and 75% [95% confidence interval: 65.3–83.1], respectively for the control net and IG2 net in Allada; 1% [95% confidence interval: 0.03–5.4] and 65% [95% confidence interval: 54.8–74.3], respectively for the control net and IG2 net in Akpro-Misséréte. The penetration rate was 43.0%

[95% confidence interval: 33.1–53.3] and 14.0% [95% confidence interval: 7.9–22.4] for the control net and IG2 net, respectively in Allada; 27.0% [95% confidence interval: 18.6–36.8] and 18.0% [95% confidence interval: 11.0–26.9] for the control net and IG2 net, respectively in Akpro-Misséréte. The blood-feeding rate was 42% [95% confidence interval: 32.2–52.3] for the control net and 4% [95% confidence interval: 1.1–9.9] for the IG2 net in Allada; and 25% [95% confidence interval: 16.9–34.7] and 2% [95% confidence interval: 0.2–7.0] in Akpro-Misséréte. The blood feeding inhibition rate of 90.1% [95% confidence interval: 77.4–97.3] in Allada and 92.0% [95% confidence interval: 73.9–99.0] in Akpro-Misséréte met the threshold for net efficacy in the Phase 1 studies.

Discussion

The potential efficacy of clothianidin, chlorfenapyr, and pyriproxyfen was assessed against wild pyrethroid-resistant *An. gambiae* populations from four southern areas of Benin (Allada, Akpro-Misséréte, Ifangni, and Porto-Novo). This study demonstrates that pyrethroid-resistant *An. gambiae* from select communities of southern Benin were fully susceptible to clothianidin and chlorfenapyr ($\geq 98\%$ mortality), and pyriproxyfen was effective in inhibiting oviposition of these pyrethroid-resistant *An. gambiae* ($\geq 98\%$ oviposition inhibition) using the WHO bottle bioassay. This study also demonstrates that new

Table 3 Impact of new unwashed Royal Guard®, Interceptor®, and untreated nets on the fertility of *Anopheles gambiae* s.l. from Ifangni using the WHO cone bioassay

Mosquito nets	Mosquito number tested	Egg development Christopher's stage						Fertility status (%) [95% confidence interval]		
		I	Ila	Ilb	III	IV	V	Fertile	Infertile	Inconclusive
Untreated net	42	0	0	1	1	9	31	73.8 [58.0–86.1]	4.8 [0.6–16.2]	21.4 [10.3–36.8]
Royal® Guard	14	5	3	5	1	0	0	0	100 [76.8–100]	0
Interceptor®	31	0	0	3	4	1	23	74.2 [55.4–88.1]	22.6 [9.6–41.1]	3.2 [0.1–16.7]
Total	87	5	3	9	6	10	54	62.1 [51.0–72.3]	26.4 [17.6–37.0]	11.5 [5.7–20.1]

% percentage

Table 4 Mortality, penetration, and blood-feeding inhibition rates of wild populations of *Anopheles gambiae* s.l. after exposure to a new unwashed Interceptor G2® (IG2) net using the WHO tunnel test

Site	Mosquito net	Number tested	Mortality (%) [95% CI]	Penetration (%) [95% CI]	Blood-fed (%) [95% CI]	Blood-feeding inhibition (%) [95% CI]
Allada	Untreated net (Control)	100	3.0 [0.6–8.5]	43.0 [33.1–53.3]	42.0 [32.2–52.3]	90.1 [77.4–97.3]
	IG2	100	75.0 [65.3–83.1]	14.0 [7.9–22.4]	4.0 [1.1–9.9]	
Akpro-Misséréte	Untreated net (Control)	100	1.0 [0.03–5.4]	27.0 [18.6–36.8]	25.0 [16.9–34.7]	92.0 [73.9–99.0]
	IG2	100	65.0 [54.8–74.3]	18.0 [11.0–26.9]	2.0 [0.2–7.0]	

% percentage, CI 95% confidence intervals

unwashed Interceptor® G2 nets were able to inhibit blood-feeding by $\geq 90\%$ and new unwashed Royal Guard® nets were able to completely sterilize the wild pyrethroid-resistant *An. gambiae*. However, it is important to note that WHO bottle bioassays with pyriproxyfen, WHO cone bioassays with Royal Guard® nets, and WHO tunnel test with Interceptor® G2 nets were not done with mosquitoes from all 4 sites due to the limited number of mosquitoes to do the different assays. Nonetheless, these results provide insights into the potential impact of these insecticides and nets in select sites in southern Benin. In addition, the limited geographical coverage (only 4 sites surveyed in Southern Benin) is a limitation for the present study.

The four populations of *An. gambiae* (Ifangni, Akpro-Misséré, Allada, Porto-Novo) were found to be fully susceptible to 2% CTD. In a study, conducted in India indoor residual spraying with CTD was found to be effective, operationally feasible, safe, and effective for up to 6 months [21]. A similar result was found in a recent study conducted in Benin showing that CTD used in a spray campaign showed the potential to provide prolonged control of malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquito populations for up to 8–9 months [18]. During a campaign of Indoor Residual Spraying using SumiShield 50WG (CTD 300 CS) in Alibori and Donga (northern Benin), Odjo et al. (2021) showed a decrease in entomological inoculation rate (EIR) of *An. gambiae* (unpublished). During this trial, bioassays with a laboratory strain of susceptible *An. gambiae* s.s. (Kisumu) showed that SumiShield® 50 WG remains effective with a mortality rate of over 80% on treated walls and 75% of the wild field strain, five months after the spraying date and after 24 h of observations. One year before, bioassays on treated walls carried out in the same region with Fludora® Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) have shown that this formulation remains effective with a mortality rate above 90% on the susceptible strain Kisumu, 4 months after spraying date (Odjo et al. 2020, unpublished). During this period of bio-efficiency of Fludora® Fusion, the authors observed a high reduction of some indicators like the indoor resting density, sporozoite index, and EIR and a strong exophagy of *An. gambiae* in most treated districts compared to control areas.

In this study, the results of the WHO bottle bioassay with CFP were like other studies [18, 23, 47, 51–54], which have demonstrated strong efficacy against wild pyrethroid-resistant *An. gambiae*. The results of the WHO tunnel experiment with Interceptor® G2 nets in this study also align with other studies, which have shown that Interceptor® G2 has a significant impact

on mortality, penetration (i.e., LLIN avoidance), and blood-feeding success. Ngufor et al. [18] showed, in a study conducted in Covè (southern Benin), that indoor residual spraying with CFP in households with standard LLINs provided additional levels of transmission control and personal protection thus revealing the potential of CFP to manage pyrethroid resistance in the context of an expanding LLIN/IRS strategy. Recently, there have been two studies, one in Benin [55] and one in Tanzania [29], which have demonstrated a high reduction in human malaria indicators in the Interceptor® G2 net arm compared to the standard pyrethroid-only net arm in randomized control trials after two years of use. All these studies continue to provide evidence of the potential efficacy of chlorfenapyr-based products for vector control. However, the mosquito penetration and feeding rates in the untreated control nets were below the minimum threshold of 50% required in the tunnel tests by the WHO [50]. This could be explained by the fact that guinea pigs were less attractive to wild mosquitoes. This is a limitation for the study.

The results of several studies have effectively shown the ability of pyriproxyfen to inhibit the development of *An. gambiae* larvae [14, 56–58]. The use of pyriproxyfen has been expanded to adult female *An. gambiae* and significantly impairs reproduction [15, 59]. In this study, the oviposition inhibition rate (98.6%) for the wild population of *An. gambiae* from (Ifangni) had reached the WHO-threshold definition of susceptibility to PPF. Furthermore, the sterilizing impact of female *An. gambiae* exposed to PPF was observed where all mosquitoes exposed to Royal Guard® net were infertile with no eggs reaching Christopher's stage V while most eggs of *An. gambiae* exposed to the control nets had fully developed their eggs to Christopher's stage V. While these study results would suggest that Royal Guard® or other pyriproxyfen-based products may potentially lead to a significant reduction in malaria transmission, studies in randomized control trials in Tanzania [29] and Benin [55] have demonstrated that Royal Guard® LLINs show no greater impact on epidemiological indicators than standard pyrethroid only LLINs.

The distance between Ifangni and the study sites in the Benin randomized control trial (Covè, Zagnanado, and Ouinhi communes) [55] is between ~75 and ~100 km apart. The primary vectors, *An. coluzzii*, and *An. gambiae* s.s., in these areas have high pyrethroid resistance intensity [28, 60]. Post-intervention insecticide resistance assays from the Benin randomized control trial further showed that exposure of *An. gambiae*, from the study area to pyriproxyfen led to a high reduction in the fecundity rate (over 70%) over the 2 years after the net distribution, compared to unexposed control mosquitoes [55]. In

this study, the oviposition inhibition rate of *An. gambiae* from Ifangni after exposure to pyriproxyfen was 98.7%, which could suggest a greater impact of pyriproxyfen LLINs in this area. It is not clear if geographical variation in fecundity impairment after laboratory exposure to pyriproxyfen would translate into variable entomological and epidemiological outcomes after the deployment of pyriproxyfen LLINs. Further investigation would be required to determine this.

It has been suggested that while pyriproxyfen does seem to reduce entomological indicators of malaria transmission, this reduction may not be large enough to translate into a reduction in human epidemiological indicators of malaria transmission [29, 55]. Given these results, it is not clear what role pyriproxyfen should play in vector control. Perhaps, pyriproxyfen should be coupled with alternative insecticide classes since wild adult populations of *An. gambiae* has established widespread resistance to pyrethroids. Rather, it may be more effective to couple pyriproxyfen with chlorfenapyr or other new LLIN insecticides to either increase efficacy or slow the onset of insecticide resistance in wild mosquito populations. However, it would be important to (1) determine if the insecticide chemistries are compatible to remain on LLINs; (2) determine if the insecticide can work together synergistically to either reduce vectorial capacity, slow insecticide resistance to either insecticide, or both; and (3) determine if the combination of these two insecticides are more effective than other dual AI combinations that include pyrethroids. Alternatively, given pyriproxyfen's original use as a larvicide, LLINs may not be optimally suited as the AI delivery method to kill mosquitoes.

While this study adds to the knowledge base of insecticide resistance in Benin some limitations are noted. It is important to note that deviations from recent WHO guidelines and SOPs are due to this occurring before the publication updates for the clothianidin and chlorfenapyr insecticides, and bio-efficacy tests. In this study, the protocol [31] using clothianidin or chlorfenapyr with methyl ester of rapeseed oil (MERO) was not used; at the time of the study, MERO was not available to the author for use in the assay. SumiShield® was impregnated on filter paper and used as the source of clothianidin in the WHO tube test [33] with the rationale that it was a stable product formulated to remain on surfaces and would provide a direct assessment of how wild mosquitoes respond to a formulated commercial product. Bottle bioassays were coated with chlorfenapyr without MERO. It is currently not recommended to use WHO cone bioassays for dual AI LLINs. It is not clear how these test deviations may have affected the measurement of insecticide resistance. While these

results may still suggest the susceptibility of these four populations to the insecticides, it will be important to repeat the tests with clothianidin and chlorfenapyr using the appropriate protocols. In this study, only new unwashed LLINs were used in the WHO cone bioassay and the WHO tunnel test. Other studies have reported washed and unwashed nets to be similar in bioassay [22]. Therefore, this study is still useful in understanding the response of *An. gambiae* to new insecticides and LLINs. In the WHO bottle bioassays assessing oviposition inhibition rates, a pyrethroid exposure group was not included in the assay for comparison. Finally, only Ifangni was assessed for oviposition and fertility inhibition, and only Allada and Akpro–Missérété were assessed using Interceptor® G2 LLINs. However, while a pyrethroid group would have been useful to include for comparison the main goal of this assay was to assess the susceptibility of the mosquitoes to pyriproxyfen. Sourcing enough mosquitoes from all the sites for each assay was a challenge. This is a typical problem when trying to conduct multiple assays using wild-caught material. Nonetheless, this study still provides useful information to understand the value of these tools for malaria control in the selected study sites in southern Benin.

Conclusion

The results of this study confirm the entomological efficacy of CFP, CTD, and PPF against wild pyrethroids-resistant *An. gambiae* in Benin, where mosquito populations from the four lagoon areas of southern Benin were found to be susceptible to these insecticides. Furthermore, nets treated with a combination of CFP (Interceptor® G2) or PPF (Royal Guard®) and ACM also have good efficacy against these populations with PPF-treated nets significantly inducing sterility in wild populations of *An. gambiae* and CFP-treated nets inducing significant blood-feeding inhibition. This study along with other studies shows that under laboratory conditions chlorfenapyr and pyriproxyfen may be effective insecticides against pyrethroid-resistant mosquitoes. Observational entomological monitoring studies which investigate entomological and epidemiological indicators after the deployment of these LLINs could provide a better understanding of the effectiveness of these products. Nonetheless, despite the availability of new effective insecticides, continued vigilance is needed in Benin through routine insecticide resistance monitoring to periodically update Benin's national insecticide resistance database and management plan.

Abbreviations

ace-1	Acetylcholinesterase-1
AI	Active ingredient
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFP	Chlorfenapyr
CREC	Centre de Recherche Entomologique de Cotonou
CTD	Clothianidin
IG2	Interceptor G2® IRS: indoor residual spraying
LLIN	Insecticide-treated net; <i>kdr</i> : knockdown resistance
MERO	Methyl ester of rapeseed oil
NMCP	National Malaria Control Programme
PCR	Polymerase chain reaction
PMI	U.S. President's Malaria Initiative
s.l.	Sensu lato
s.s.	Sensu stricto
PPF	Pyriproxyfen
USAID	United States Agency for International Development
WHO	World Health Organization

Acknowledgements

We would like to thank the President's Malaria Initiative which supported financially this study. We also thank the police and administrative authorities of the communes of Ifangni, Porto-Novo, Akpro-Missereté and Allada who facilitated the collection of malaria vector larvae in their localities. We acknowledge Daniel Impoinvil of US Centers for Disease Control and Prevention for providing technical assistance and proofreading the manuscript.

Author contributions

MCA, DMZ and GGP conceived the study. MCA, DMZ, AKK and GGP have participated in the design of the study. Entomologic data was collected by DMZ, SH, AKK, CK, HS, ASS and laboratory analysis was carried out by DMZ, AS, RO. DMZ, AKK and MCA drafted the manuscript. Statistical data analysis was done by DMZ, BA, SC. DMZ, MCA, DEI, VG, PC, ASH, RA, CA and GGP critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by the United States President's Malaria Initiative through the United States Agency for International Development (USAID) and the U.S. Centers for Disease Control and Prevention.

Availability of data and materials

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

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The findings and conclusions in this manuscript are those of the author(s) and do not necessarily represent the official views of the United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC), the United States Agency for International Development (USAID), or the United States President's Malaria Initiative (PMI). Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the CDC, USAID, PMI, or the US Department of Health and Human Services.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, Benin. ²Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Godomey, Benin. ³Programme National de Lutte Contre Le Paludisme, Cotonou, Benin. ⁴US President's Malaria Initiative, US Agency for International Development, Cotonou, Benin. ⁵US President's Malaria Initiative, US Centers for Disease Control and Prevention, Cotonou, Benin. ⁶US

President's Malaria Initiative, US Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.

Received: 1 April 2023 Accepted: 7 August 2023

Published online: 26 August 2023

References

1. Tizifa TA, Kabaghe AN, McCann RS, van den Berg H, Van Vugt M, Phiri KS. Prevention efforts for malaria. *Curr Trop Med Rep*. 2018;5:41–50.
2. Bennett A, Smith SJ, Yambasu S, Jambai A, Alemu W, Kabano A, et al. Household possession and use of insecticide-treated mosquito nets in Sierra Leone 6 months after a national mass-distribution campaign. *PLoS ONE*. 2012;7: e37927.
3. Wanzira H, Katamba H, Rubahika D. Use of long-lasting insecticide-treated bed nets in a population with universal coverage following a mass distribution campaign in Uganda. *Malar J*. 2016;15:311.
4. WHO. World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.
5. 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.
6. 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.
7. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V, et al. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J*. 2010;9:83.
8. Asidi A, N'Guessan R, Akogbeto M, Curtis C, Rowland M. Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes. *Benin Emerg Infect Dis*. 2012;18:1101–6.
9. Ochomo EO, Bayoh NM, Walker ED, Abongo BO, Ombok MO, Ouma C, et al. The efficacy of long-lasting nets with declining physical integrity may be compromised in areas with high levels of pyrethroid resistance. *Malar J*. 2013;12:368.
10. WHO. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). Geneva: World Health Organization; 2012.
11. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:247–68.
12. Ullah F, Gul H, Tariq K, Desneux N, Gao X, Song D. Fitness costs in clothianidin-resistant population of the melon aphid. *Aphis gossypii* *PLoS One*. 2020;15: e0238707.
13. Raghavendra K, Barik TK, Sharma P, Bhatt RM, Srivastava HC, Sreehari U, et al. Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malar J*. 2011;10:16.
14. Yapabandara AM, Curtis CF. Laboratory and field comparisons of pyriproxyfen, polystyrene beads and other larvicidal methods against malaria vectors in Sri Lanka. *Acta Trop*. 2002;81:211–23.
15. Jaffer A, Protopopoff N, Mosha FW, Malone D, Rowland MW, Oxborough RM. Evaluating the sterilizing effect of pyriproxyfen treated mosquito nets against *Anopheles gambiae* at different blood-feeding intervals. *Acta Trop*. 2015;150:131–5.
16. Ohba SY, Ohashi K, Pujiyati E, Higa Y, Kawada H, Mito N, et al. The effect of pyriproxyfen as a "population growth regulator" against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PLoS ONE*. 2013;8: e67045.
17. Agossa FR, Padonou GG, Fassinou A, Odjo EM, Akuoko OK, Salako A, et al. Small-scale field evaluation of the efficacy and residual effect of Fludora(R) Fusion (mixture of clothianidin and deltamethrin) against susceptible and resistant *Anopheles gambiae* populations from Benin. *West Africa Malar J*. 2018;17:484.
18. 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* s.l. in Southern Benin. *PLoS ONE*. 2017;12:e0189575.
19. Darriet F, Chandre F. Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against

- pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci*. 2013;69:905–10.
20. Fuseini G, Phiri WP, von Fricken ME, Smith J, Garcia GA. Evaluation of the residual effectiveness of Fludora fusion WP-SB, a combination of clothianidin and deltamethrin, for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors on Bioko Island. *Equatorial Guinea Acta Trop*. 2019;196:42–7.
 21. Uragayala S, Kamaraju R, Tiwari SN, Sreedharan S, Ghosh SK, Valecha N. Village-scale (Phase III) evaluation of the efficacy and residual activity of SumiShield(RR) 50 WG (Clothianidin 50%, w/w) for indoor spraying for the control of pyrethroid-resistant *Anopheles culicifacies* Giles in Karnataka state. *India Trop Med Int Health*. 2018;23:605–15.
 22. Bayili K, N'do S, Namountougou M, Sanou R, Ouattara A, Dabire RK, et al. Evaluation of efficacy of Interceptor(RR) G2, a long-lasting insecticide net coated with a mixture of chlorfenapyr and alpha-cypermethrin, against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Malar J*. 2017;16:190.
 23. Camara S, Ahoua Alou LP, Koffi AA, Clegban YCM, Kabran JP, Koffi FM, et al. Efficacy of Interceptor(RR) G2, a new long-lasting insecticidal net against wild pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Cote d'Ivoire: a semi-field trial. *Parasite*. 2018;25:42.
 24. N'Guessan R, Odjo A, Ngufor C, Malone D, Rowland M. A chlorfenapyr mixture net Interceptor(R) G2 shows high efficacy and wash durability against resistant mosquitoes in West Africa. *PLoS ONE*. 2016;11: e0165925.
 25. Ngufor C, N'Guessan R, Fagbohoun J, Todjinou D, Odjo A, Malone D, et al. Efficacy of the Olyset Duo net against insecticide-resistant mosquito vectors of malaria. *Sci Transl Med*. 2016;8:356.
 26. Tungu PK, Michael E, Sudi W, Kisinza WW, Rowland M. Efficacy of interceptor(R) G2, a long-lasting insecticide mixture net treated with chlorfenapyr and alpha-cypermethrin against *Anopheles funestus*: experimental hut trials in north-eastern Tanzania. *Malar J*. 2021;20:180.
 27. Accrombessi M, Cook J, Ngufor C, Sovi A, Dangbenon E, Yovogan B, et al. Assessing the efficacy of two dual-active ingredients long-lasting insecticidal nets for the control of malaria transmitted by pyrethroid-resistant vectors in Benin: study protocol for a three-arm, single-blinded, parallel, cluster-randomized controlled trial. *BMC Infect Dis*. 2021;21:194.
 28. Yovogan B, Sovi A, Padonou GG, Adoha CJ, Akinro B, Chitou S, et al. Pre-intervention characteristics of the mosquito species in Benin in preparation for a randomized controlled trial assessing the efficacy of dual active-ingredient long-lasting insecticidal nets for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *PLoS ONE*. 2021;16: e0251742.
 29. Mosha JF, Kulkarni MA, Lukole E, Matowo NS, Pitt C, Messenger LA, et al. Effectiveness and cost-effectiveness against malaria of three types of dual-active-ingredient long-lasting insecticidal nets (LLINs) compared with pyrethroid-only LLINs in Tanzania: a four-arm, cluster-randomised trial. *Lancet*. 2022;399:1227–41.
 30. WHO. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions. Geneva: World Health Organization; 2022.
 31. WHO. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. Geneva: World Health Organization; 2022.
 32. WHO. Standard operating procedure for evaluating the sterilizing properties of pyriproxyfen in adult female mosquitoes in WHO bottle bioassays. Geneva: World Health Organization; 2022.
 33. WHO. Standard operating procedure for impregnation of filter papers for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests. Geneva: World Health Organization; 2022.
 34. WHO. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests. Geneva: World Health Organization; 2022.
 35. Kpanou CD, Sagbohan HW, Padonou GG, Ossè R, Salako AS, Fassinou AJ, et al. Susceptibility of *Anopheles gambiae sensu lato* to different insecticide classes and mechanisms involved in the South-North transect of Benin. *J Entomol Zool Stud*. 2021;9:453–64.
 36. Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, et al. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit Vectors*. 2011;4:60.
 37. Aikpon R, Sezonlin M, Osse R, Akogbeto M. Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. *Parasit Vectors*. 2014;7:568.
 38. Padonou GG, Sezonlin M, Osse R, Aizoun N, Oke-Agbo F, Oussou O, et al. Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasit Vectors*. 2012;5:72.
 39. Sovi A, Azondekon R, Aikpon RY, Govoetchan R, Tokponnon F, Agossa F, et al. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria transmission in pyrethroid-resistant areas. *Parasit Vectors*. 2013;6:319.
 40. Institut national de la statistique et de l'analyse économique. Résultats provisoires du RGPH4. Cotonou, Bénin: République du Bénin, Ministère du développement, de l'analyse économique et de la prospective; 2013.
 41. Gandonou BM. 2006. Monographie de Porto-Novo. In: Guidibi ME (Eds). Benin: Afrique Conseil.
 42. O'Malley C. Seven ways to a successful dipping career. *Wing Beats*. 1995;6:23–4.
 43. Coetzee M. Key to the females of Afrotropical *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Malar J*. 2020;19:70.
 44. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Dabire R, Nnanguenon V, Wat'senga F, et al. 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;18:264.
 45. Lissenden N, Armistead JS, Gleave K, Irish SR, Martin JL, Messenger LA, et al. Developing Consensus Standard Operating Procedures (SOPs) to evaluate new types of insecticide-treated nets. *Insects*. 2021;13:7.
 46. WHO. Report of the twentieth WHOPES working group meeting, WHO/HQ, Geneva, 20–24 March 2017: review of Interceptor G2LN, DawaPlus 3.0 LN, DawaPlus 4.0 LN, SumiLarv 2 MR, Chlorfenapyr 240 SC. Geneva: World Health Organization; 2017.
 47. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, Della TA. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J*. 2008;7:163.
 48. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998;7:179–84.
 49. Christophers SR. The development of the egg follicle in Anophelines. *Paludism*. 1911;2:73–88.
 50. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal nets. Geneva: World Health Organization; 2013.
 51. Dagg K, Irish S, Wiegand RE, Shillu J, Yewhalaw D, Messenger LA. Evaluation of toxicity of clothianidin (neonicotinoid) and chlorfenapyr (pyrrole) insecticides and cross-resistance to other public health insecticides in *Anopheles arabiensis* from Ethiopia. *Malar J*. 2019;18:49.
 52. Hien AS, Soma DD, Maiga S, Coulibaly D, Diabate A, Belemvire A, et al. Evidence supporting deployment of next generation insecticide treated nets in Burkina Faso: bioassays with either chlorfenapyr or piperonyl butoxide increase mortality of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*. *Malar J*. 2021;20:406.
 53. Oxborough RM, N'Guessan R, Jones R, Kitau J, Ngufor C, Malone D, et al. The activity of the pyrrole insecticide chlorfenapyr in mosquito bioassay: towards a more rational testing and screening of non-neurotoxic insecticides for malaria vector control. *Malar J*. 2015;14:124.
 54. Sovi A, Keita C, Sinaba Y, Dicko A, Traore I, Cisse MBM, et al. *Anopheles gambiae* (s.l.) exhibit high intensity pyrethroid resistance throughout Southern and Central Mali (2016–2018): PBO or next generation LLINs may provide greater control. *Parasit Vectors*. 2020;13:239.
 55. Accrombessi M, Cook J, Dangbenon E, Yovogan B, Akpovi H, Sovi A, et al. Efficacy of pyriproxyfen-pyrethroid long-lasting insecticidal nets (LLINs) and chlorfenapyr-pyrethroid LLINs compared with pyrethroid-only LLINs for malaria control in Benin: a cluster-randomised, superiority trial. *Lancet*. 2023;401:435–46.
 56. Nampeloh B, Chisulumi PS, Yohana R, Kidima W, Kweka EJ. Effect of pyriproxyfen on development and survival of *Anopheles gambiae sensu stricto* under forested and deforested areas. *J Basic Appl Zool*. 2022;83:27.
 57. Lupenza ET, Kihonda J, Limwagu AJ, Ngowo HS, Sumaye RD, Lwetoijera DW. Using pastoralist community knowledge to locate and treat dry-season mosquito breeding habitats with pyriproxyfen to control *Anopheles gambiae* s.l. and *Anopheles funestus* s.l. in rural Tanzania. *Parasitol Res*. 2021;120:1193–202.

58. Mbare O, Lindsay SW, Fillinger U. Dose-response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv(R)0.5G) for the control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. *Malar J.* 2013;12:94.
59. Kawada H, Dida GO, Ohashi K, Kawashima E, Sonye G, Njenga SM, et al. A small-scale field trial of pyriproxyfen-impregnated bed nets against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* s.s. in western Kenya. *PLoS ONE.* 2014;9:e111195.
60. Sagbohan HW, Kpanou CD, Sovi A, Osse R, Sidick A, Adoha C, et al. Pyrethroid resistance intensity in *Anopheles gambiae* s.l. from different agricultural production zones in Benin West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2022;22:39–47.

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





International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906

CODEN: IJMRK2

IJMR 2023; 10(3): 39-46

© 2023 IJMR

www.dipterajournal.com

Received: 22-02-2023

Accepted: 27-05-2023

David Mahouton ZoungbédjiA) Centre de Recherche entomologique
de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP
2604, BeninB) Faculté des Sciences et Techniques de
l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Germain Gil Padonou**A) Centre de Recherche entomologique
de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP
2604, BeninB) Faculté des Sciences et Techniques de
l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Alphonse Keller Konkon**A) Centre de Recherche entomologique
de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP
2604, BeninB) Faculté des Sciences et Techniques de
l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Albert Sourou Salako**Centre de Recherche entomologique de
Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604,
Benin**Constantin Jesukèdè Adoha**A) Centre de Recherche entomologique
de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP
2604, BeninB) Faculté des Sciences et Techniques de
l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Arsène Jacques YH Fassinou**Centre de Recherche entomologique de
Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604,
Benin**Haziz Sina**Centre de Recherche entomologique de
Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604,
Benin**Lamine Baba-Moussa**a) Faculté des Sciences et Techniques de
l'Université d'Abomey-Calavi, BeninB) Laboratoire de biologie et de typage
moléculaire en microbiologie,
Département de biochimie et de biologie
cellulaire, Bénin**Martin Akogbeto**Centre de Recherche entomologique de
Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604,
Benin**Corresponding Author:****David Mahouton Zoungbédji**A) Centre de Recherche entomologique
de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP
2604, BeninB) Faculté des Sciences et Techniques de
l'Université d'Abomey-Calavi, Benin

Evaluation of the susceptibility of *An. gambiae* s.l. to deltamethrin, chlorfenapyr and clothianidin in four agricultural areas of Benin

David Mahouton Zoungbédji, Germain Gil Padonou, Alphonse Keller, Konkon, Albert Sourou Salako, Constantin Jesukèdè Adoha, Arsène Jacques YH Fassinou, Haziz Sina, Lamine Baba-Moussa and Martin Akogbeto

DOI: <https://doi.org/10.22271/23487941.2023.v10.i3a.677>

Abstract

This study evaluates the susceptibility of vectors to deltamethrin, chlorfenapyr (CFP) and clothianidin (CTD) in different agro-ecological zones of the country. Populations of *An. gambiae* s.l. derived from larvae collected between April and September 2022 in 04 cropping zones: vegetable, cereal, rice and cotton were exposed to deltamethrin, chlorfenapyr and clothianidin. Biochemical and target-modification resistance mechanisms were detected in a sample of each mosquito population. All populations of *An. gambiae* s.l. tested with deltamethrin showed mortality that varied between 9 and 60%. Overall, the mean frequency of the *kdr* L1014F mutation across all localities was 86% followed by overproduction of detoxification enzymes. As for the new insecticides, the mortality rate was 98%-100% for the CFP and for the CTD regardless of the locality and the agro-ecological zone tested. Chlorfenapyr and clothianidin are viable alternatives that could be used for improved control of pyrethroid-resistant populations of *An. gambiae* s.l.

Keywords: Resistance, chlorfenapyr, clothianidin, *Anopheles gambiae* s.l., Benin

1. Introduction

Recent successes in malaria control are largely attributed to the use of vector control tools, in particular long-lasting insecticidal nets (LLINs) and Indoor Residual Spraying (IRS) [1]. According to a report by the World Health Organization (WHO), out of 663 million cases of malaria averted in sub-Saharan Africa between 2001 and 2015, 69% were by LLIN [2]. In recent years, Benin made substantial efforts to make LLINs accessible to communities. For several years, pyrethroid insecticides were the only class of insecticides recommended for the treatment of nets due to their effectiveness in killing mosquitoes, repellent property that provides users with personal protection during sleeping hours, long residual activity, and low cost [3, 4]. Unfortunately, the widespread vector resistance to insecticides contributed to the reduced effectiveness of control tools incorporating these chemicals. This results in the persistence of the disease in endemic countries [5]. In 2007, N' Guessan *et al.* [6] reported on the reduced efficacy of pyrethroid-impregnated LLINs in an area of high vector resistance. Trials conducted in some regions of Benin [7, 8, 9, 10, 11] have confirmed the occurrence of the phenomenon and its spread in time and space. The use of the same classes of insecticides in both public health and agriculture were highly suspected to be the cause of the increase in the frequency of resistance mutations in Benin [12, 11]. Furthermore, the causes of the reduced effectiveness of LLINs are attributed to the presence of the *Kdr* gene, as well as the overproduction of metabolic enzymes that confer resistance to pyrethroids in *Anopheles* populations [13, 6]. With this situation, the implementation of a resistance management plan was necessary [14]. For this, LLINs that incorporate a pyrethroid and a synergist, piperonyl butoxide (PBO) that inhibits oxidases have been developed. These LLINs include Olyset® Plus and Perma Net® 3.0, all of which are WHO-prequalified.

However, the effectiveness of these LLINs in a given area depend on the level of activity of the mono-oxygenase enzymes within the vector populations. In Benin, the addition of the synergist PBO did not fully restore the susceptibility of vectors to pyrethroids in some locations [15]. Recent research exploring other classes of insecticides has identified clothianidin and chlorfenapyr as promising options for vector control. Thus, nicotinoid-based insecticides such as Sumi Shield® 50WG and Fludora Fusion® WP-SB, have been developed and pre-qualified for IRS in 2017 [16]. The clothianidin binds to the nicotinic receptor, blocks the transmission of nerve impulses, and causes the death of the insect [17]. As for chlorfenapyr, it has low toxicity for mammals and is classified as a low-hazard insecticide by the WHO. Due to its novel mode of action, chlorfenapyr is unlikely to exhibit cross-resistance with standard neurotoxic insecticides, as observed in *Anopheles* mosquito populations [18]. Several studies conducted in Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Tanzania, and Benin [19-23], have evaluated the efficacy of chlorfenapyr-based IRS or LLINs through laboratory bioassays and experimental hut trials, with results suggesting that this molecule is promising [24]. However, these different studies did not take into account the insecticide pressure that each agro-ecological zone is subjected to.

In Benin, introducing new generation vector control tools could help to well-manage, and overcome vector resistance to insecticides. The present study was undertaken as part of monitoring insecticide resistance in different agro-ecological zones of the country in preparation for the distribution of chlorfenapyr-incorporated LLINs. This will help the National Malaria Control Program (PNLP) to make decisions about the areas to target and also provide susceptibility information of vectors to the two new insecticides.

2. Methods

2.1. Study sites

This study was conducted between April and September 2022 in four cropping areas of Benin. The communes selected according to the climate were:

-Porto-Novo, Bohicon, Lokossa and Ifangni in the regions of humid savannah and degraded forests, Southern Benin. The climate is sub-equatorial with rainfall varying between 1100 to 1200 mm per year [25-27].

-Gogounou, Banikoara and Malanville in the dry savannah region of Northern Benin (Ahoyo & Guidibi 2006) with a sudanese climate that has a single rainy season (May to October) and a dry season (November to April). The average temperature and relative humidity are 28 °C and 70%, respectively [28, 29].

- Glazoué in central Benin, a transition zone located between the dry and humid savanna region. This area enjoys a Sudano-Guinean climate with two seasons. The rainy season extends over 6 months (mid-April to mid-October). The average rainfall is between 1200 and 1300 mm. The average temperature is around 27 °C [30].

In terms of distribution by crop zone, the communes of Ifangni and Porto-Novo practice market gardening as a growing activity, facilitated by the presence of lagoons and marigots in this region. The communes of Bohicon and Lokossa are cereal-growing zones, while the communes of Glazoué and Malanville are renowned for rice production in Benin. These areas sometimes use fertilizers and pesticides for better yield. The communes of Banikoara and Gogounou are considered the cotton-growing areas of Northern Benin, with large quantities of insecticides used to control cotton pests [31] (Fig. 1).

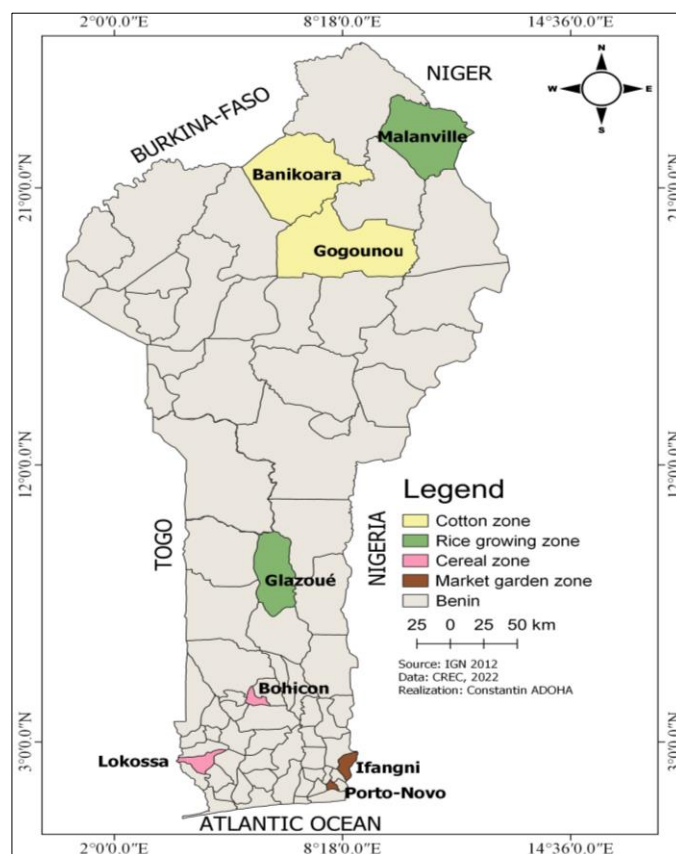


Fig 1: Study site

2.2 Collection and rearing of mosquito larvae

Larvae of *Anopheles gambiae* s.l. were collected in eight communes of Benin (Ifangni, Porto-Novo, Bohicon, Lokossa, Glazoué, Malanville, Banikoara and Gogounou). They were sampled from the positive breeding sites using a dipper and transported to the insectary of the Center for Research in Entomology of Cotonou (CREC) for rearing. The pupae obtained were grouped together in different cages for the emergence of adult mosquitoes. After morphological identification using the Coetzee determination key [32], only specimens of *Anopheles gambiae* s.l. were used for testing.

2.3 WHO susceptibility tube test

Females *Anopheles gambiae* s.l. aged 2-5 days were used for the tests. Thus, batches of 20-25 female mosquitoes were exposed to 0.05% deltamethrin for 60 minutes. During the test, the number of mosquitoes knock down by the insecticide was recorded every 15 minutes. Other batches of 20 to 25 mosquitoes exposed to insecticide-free papers served as controls. After exposure, the mosquitoes were transferred to the observation tubes where they were fed with a 10% sugar solution for 24 hours. Mortality rates were determined 24 hours after testing [33].

2.4 WHO bottle bio-assay?

The chlorfenapyr (CFP) solution used for coating the bottles was prepared from the stock solution diluted with acetone. Glass Wheaton bottles (250 ml) and their caps were coated with 1 ml of CFP (100 µg/ml). In parallel, bottles coated with 1 ml of acetone served as controls. The exposure of different mosquito populations to CFP was performed over 60 minutes. Thereafter, mosquitoes were transferred to a paper cup with free access to a 10% sugar solution. The knockdown rate was recorded at 60 min and the mortality at 24 h, 48 h and 72 h after exposure. One hour after insecticide exposure, dead mosquitoes were preserved on RNA Later and stored in a -80°C freezer. Mosquitoes that died after 24 h, 48 h and 72 h were collected and stored in silica gel [34]. The same test was performed with the *Anopheles gambiae* Kisumu susceptible strain. Results obtained with the wild mosquitoes was compared to those of the susceptible strain. The tests were conducted at 26 °C±2 °C (temperature) and 78% ±10% (relative humidity).

2.5. Modified WHO susceptibility tube test

The ability of SumiShield® 50WG to kill wild populations of *Anopheles gambiae* s.l. was evaluated through WHO susceptibility tube testing with some minor modifications

from the standard guidelines [34]. 12 cm by 15 cm Whatman® filter papers were treated with the candidate a diagnostic dose of Sumi Shield® 50 WG (containing 50% CTD) diluted in distilled water. A stock solution was prepared by diluting 264 mg of Sumi Shield® 50 WG in 20 ml of distilled water. Two milliliters of the mixed solution was pipetted evenly onto each filter paper and stored at 4 °C until use. Filter paper treated with 2 ml of distilled water was used as a negative control. The duration of the exposure to CTD was set at 60 minutes. After exposure, mosquitoes were transferred to untreated paper-lined observation tubes (25 °C and 80% humidity) with free access to 10% sugar solution. The knockdown was recorded after 30 min and 60 min. Mortality was recorded at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days after exposure [35].

2.6. Data analysis

The mortality rates recorded 24 hours after exposure of mosquito populations to the diagnostic dose of the different insecticides were interpreted according to the criteria of the World Health Organization [34].

- Mortality rate ≥98%: susceptible mosquito population
- Mortality rate between 90 and 97%: possible resistance to that requires further investigation.
- Mortality rate ≤ 90%: Resistant mosquito population

The formula $F = (2RR + RS) / (2(RR + RS + SS))$ was used to calculate Kdr mutation frequencies. With RR: the number of homozygous mosquitoes; RS: the number of resistant mosquitoes and SS: the number of homozygous mosquitoes. The binomial exact test for comparison of proportions was used to generate confidence intervals for mortality rates and Kdr mutation frequencies.

The overproduction of detoxification enzymes by the wild-type strain was compared with that of the sensitive laboratory strain (Kisumu) using the Mann-Whitney U test. R software was used for all statistical analyses.

3. Results

3.1. Susceptibility of *An. gambiae* s.l. populations to deltamethrin in different agro-ecological zones

Table 1 presents the mortality rates of *An. gambiae* s.l. after exposure to deltamethrin in the different agro-ecological zones. These rates were less than 80% in all sites, indicating resistance to deltamethrin. They are significantly lower in the cotton (Banikora: 9.20% [4.05-17.32]) and rice (Malanville: 17.58% [10.40-26.98]) growing areas compared to all the other surveyed sites.

Table 1: Susceptibility of different populations of *An. gambiae* s.l. to deltamethrin

Study areas	Sites	Deltamethrin		
		Number tested	Mortality 24H % [CI]	Status
Market gardening	Ifangni	99	35.35 [26,01-45,60]	RR
	Porto-Novo	80	47.50 [36,21-58,98]	RR
Cereal growing	Bohicon	101	39.60 [30,01-49,83]	RR
	Lokossa	86	55.81 [44,70-66,52]	RR
Rice growing	Glazoué	88	37.50 [27,40-48,47]	RR
	Malanville	91	17.58 [10,40-26,98]	RR
Cotton growing	Gogounou	79	27.85 [18,35-39,07]	RR
	Banikoara	87	9.20 [4,05-17,32]	RR

%; Percentage; CI: Confident interval

3.2 Resistance mechanisms of *An. gambiae* populations in different agro-ecological zones

Table 2 shows the frequency of the L1014F kdr mutation in sibling species of the *Anopheles gambiae* complex in the four agro-ecological zones surveyed. Overall, the mean frequency

of the kdr L1014F gene for all sites was 86% [84–89]. This frequency was similar in *An. gambiae* (91% [87-94]), and *An. coluzzii* (84% [80 - 87]) at all sites. The resistant kdr L1014S allele was not detected in our samples.

Table 2: Kdr L1014F frequencies observed in different species of the *An. gambiae* complex

Sites/Species	Number tested	Genotypes			Kdr Frequency (%)	CI 95%
		1014F	1014F	1014L		
		1014F	1014L	1014L		
Ifangni	50	38	8	4	84	[75 - 91]
<i>An. coluzzii</i>	23	17	4	2	83	[69 - 92]
<i>An. gambiae</i>	27	21	4	2	85	[73 - 93]
Porto-Novo	50	39	7	4	85	[76 - 91]
<i>An. coluzzii</i>	50	39	7	4	85	[76 - 91]
Bohicon	50	35	15	0	85	[76-91]
<i>An. coluzzii</i>	26	19	7	0	87	[74-94]
<i>An. gambiae</i>	24	16	8	0	83	[70-93]
Lokossa	99	80	13	6	87	[82 - 92]
<i>An. coluzzii</i>	50	37	8	5	82	[73 - 89]
<i>An. gambiae</i>	49	43	5	1	93	[86 - 97]
Malanville	50	35	11	4	81	[72 - 88]
<i>An. arabiensis</i>	2	1	1	0	75	[19 - 99]
<i>An. coluzzii</i>	48	34	10	4	81	[72 - 88]
Gogounou	50	40	7	3	87	[79 - 93]
<i>An. arabiensis</i>	2	1	1	0	75	[19 - 99]
<i>An. coluzzii</i>	39	31	5	3	86	[76 - 93]
<i>An. gambiae</i>	9	8	1	0	94	[73 - 100]
Banikoara	49	44	4	1	94	[87 - 98]
<i>An. coluzzii</i>	6	4	2	0	83	[52 - 98]
<i>An. gambiae</i>	43	40	2	1	95	[89 - 99]
All area	398	311	65	22	86	[84 - 89]
<i>An. coluzzii</i>	242	181	43	18	84	[80 - 87]
<i>An. gambiae</i>	152	128	20	4	91	[87 - 94]
<i>An. arabiensis</i>	4	2	2	0	75	[37 - 95]

%, Percentage; CI: Confident interval

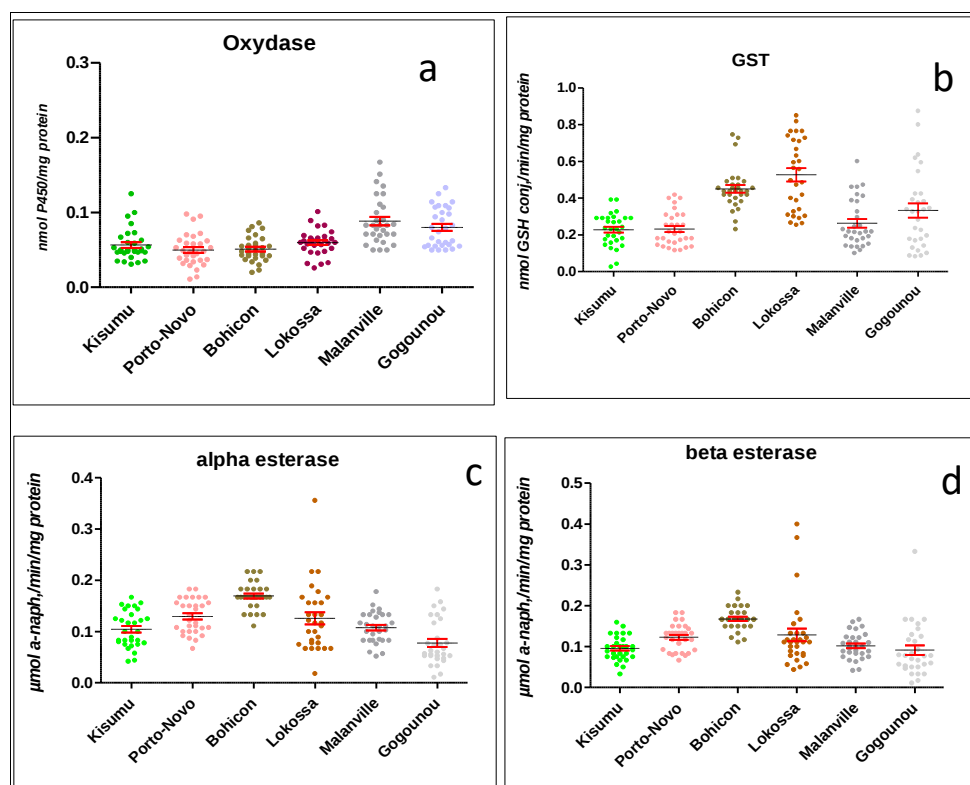


Fig 2: Mono-oxygenase (a), glutathione-S-transferase (b), α -esterase (c) and β -esterase (d) activities of *Anopheles gambiae* s.l. populations.

Figure 2 shows the mean levels of enzymatic activities in the wild and susceptible populations of mosquitoes. In all the surveyed sites, at least one detoxifying enzymes showed high activity compared to the Kisumu strain. Oxidase activity was significantly elevated in the cotton (Gogounou) and rice (Malanville) growing areas compared to the Kisumu susceptible strain (Fig. 2a). The highest glutathione-S-

transferase (GST) activities were observed in populations from cereal-growing areas (Bohicon and Lokossa) with a significant difference compared to the Kisumu susceptible strain (Fig. 2b). As for α esterases and β esterases, their activity was significantly higher in the populations of the cereal (Bohicon and Lokossa) and market gardening (Porto-Novo) areas (Fig. 2c & d).

3.3. Susceptibility level to chlorfenapyr

A full susceptibility (mortality of 100%) of all wild

populations of *An. gambiae* s.l. to chlorfenapyr was observed at 24-48 hours post-exposure (Table 3).

Table 3: Susceptibility of different *An. gambiae* s.l. populations to chlorfenapyr

Chlorfenapyr						
Study areas	Sites	Number tested	Mortality % [CI]			Status
			24 H	48 H	72 H	
market gardening	Ifangni	100	99 [94, 55-99, 97]	99 [94, 55-99,97]	100 [96, 38-100]	SS
	Porto-Novo	102	100 [96,45-100]	100 [96, 45-100]	100 [96, 45-100]	SS
Cereal growing	Bohicon	100	100 [96, 38-100]	100 [96, 38-100]	100 [96, 38-100]	SS
	Lokossa	107	100 [96, 61-100]	100 [96, 61-100]	100 [96, 61-100]	SS
Rice growing	Glazoué	107	100 [96, 61-100]	100 [96, 61-100]	100 [96, 61-100]	SS
	Malanville	94	100 [96, 15-100]	100 [96, 15-100]	100 [96, 15-100]	SS
Cotton growing	Gogounou	115	100 [96, 84-100]	100 [96, 84-100]	100 [96, 84-100]	SS
	Banikoara	117	100 [96, 90-100]	100 [96, 90-100]	100 [96, 90-100]	SS

%: Percentage; CI: Confident interval

3.4. Susceptibility level of populations of *An. gambiae* s.l. to clothianidin

Mortality rates observed to CTD, 24 hours after exposure, were less than 80% in all surveyed sites. They were significantly lower in the rice (Glazoué: 21.97% [13.97-31.88]) and cotton (Banikoara: 31.86% [22.49-42.47]) growing areas compared to the market gardening (Ifangni: 77.27% [67.11-85.53]); Porto-Novo: 68.88 [58.26-78.23]), and cereal (Bohicon: 89.65% [81.27-95.16]; Lokossa: 35.64

[26.36-45.79]) areas (Table 4). On the other hand, they were 58.09% [48.07-67.66] and 55.33% [45.22-65.14] in Gogounou (cotton zone) and Malanville (rice-growing zone), respectively (Table 4). These rates increased as time goes in all surveyed sites. The susceptibility level was reached on the fourth day in Ifangni, Bohicon, Porto-Novo, and Gogounou (mortality rate $\geq$ 98%). Between the 6th-7th day, all the remaining wild populations reached the susceptibility level (Table 4).

Table 4: Resistance status of different populations of *An. gambiae* s.l. to clothianidin

Clothianidin										
Study areas	Sites	Number tested	% Dead							Status
			Day 1% [CI]	Day 2% [CI]	Day 3% [CI]	Day 4% [CI]	Day 5% [CI]	Day 6% [CI]	Day 7% [CI]	
Market gardening	Ifangni	88	77, 27 [67, 11-85, 53]	95, 45 [88, 77-98, 75]	96, 59 [90, 36-99, 29]	100 [95, 89-100]	100 [95, 89-100]	100 [95, 89-100]	100 [95, 89-100]	SS
	Porto-Novo	90	68, 88 [58, 26-78, 23]	84, 44 [75, 28-91, 23]	93, 33 [86, 05-97, 51]	98, 89 [93, 96-99, 97]	100 [95, 98-100]	100 [95, 98-100]	100 [95, 98-100]	SS
Cereal growing	Bohicon	87	89, 65 [81, 27-95, 16]	93, 1 [85, 59-97, 43]	96, 55 [90, 25-99, 28]	100 [95, 85-100]	100 [95, 85-100]	100 [95, 85-100]	100 [95, 85-100]	SS
	Lokossa	101	35, 64 [26, 36-45, 79]	55, 45 [45, 22-65, 34]	74, 26 [64, 6-82, 44]	88, 12 [80, 17-93, 71]	94, 06 [87, 52-97, 79]	97, 03 [91, 56-99, 38]	99, 01 [94, 61-99, 97]	SS
Rice growing	Glazoué	91	21, 97 [13, 97-31, 88]	42, 86 [32, 53-53, 66]	60, 44 [49, 64-70, 54]	85, 71 [76, 81-92, 17]	97, 8 [92, 29-99, 73]	100 [96, 03-100]	100 [96, 03-100]	SS
	Malanville	103	55, 33 [45, 22-65, 14]	75, 73 [66, 29-83, 64]	89, 32 [81, 69-94, 55]	96, 12 [90, 35-98, 93]	100 [96, 48-100]	100 [96, 48-100]	100 [96, 48-100]	SS
Cotton growing	Gogounou	105	58, 09 [48, 07-67, 66]	84, 76 [76, 44-91, 03]	93, 33 [86, 75-97, 28]	99, 05 [94, 81-99, 98]	100 [96, 55-100]	100 [96, 55-100]	100 [96, 55-100]	SS
	Banikoara	91	31, 86 [22, 49-42, 47]	65, 93 [55, 25-75, 55]	83, 52 [74, 27-90, 47]	92, 31 [84, 79-96, 85]	95, 6 [89, 13-98, 79]	100 [96, 03-100]	100 [96, 03-100]	SS

%: Percentage; CI: Confident interval

4. Discussion

The susceptibility of malaria vectors from different agro-ecological zones of Benin was assessed to deltamethrin, clothianidin and chlorfenapyr. Findings from the present study showed that regardless of the cropping area considered, the mortality of the different mosquito populations observed with deltamethrin was less than 80%, which suggests that pyrethroid resistance is widespread in Benin as shown by several previous studies conducted about fifteen years ago [36,

37]. Recent studies provide evidence of the obstacle that constitutes the resistance phenomenon for the success of vector control strategies [38, 39-41]. Four cropping areas (market gardening, cereal, rice, and cotton) were surveyed as part of the present study. Overall, deltamethrin mortality rates were significantly lower in cotton (Banikora) and rice (Malanville) areas compared to others. This high intensity of vector resistance to insecticides could be explained by the strong insecticide pressure that these areas undergo with the

objective of protecting crops against pests and increasing productivity [31, 42-45]. The strong insecticide resistance observed in vectors was also associated with high frequencies of the *kdr* L1014F mutation, especially in the two cotton-growing areas (Banikoara: 94% and Gogounou: 87%). Similar results were recently observed by Sagbohan *et al.* [15], that incriminated cultivation practices as favoring gene selection and a rise in insecticide resistance intensity. The *kdr* L1014F frequency was similar in *An. gambiae* and *An. coluzzii* in all agro-ecological areas, which is contrary to the work of Gnanguenon *et al.* [46]; Yahouedo *et al.* [47] and Salako *et al.* [48]. This observed resistance is also reinforced by the overproduction of oxidases in cotton and rice-growing areas (Gogounou and Malanville), which suggests that pyrethroid insecticides are in use in cotton and rice fields [49].

Based on this information, it is clear that the effectiveness of control tools incorporating pyrethroids is questioned.

On the other hand, clorfenapyr and clothianidin, two new-generation insecticides recommended by the WHO, showed full susceptibility against all wild populations of *An. gambiae* s.l. (Mortality > 98%). This could be due to the differing mode of action of these insecticides [50]. While pyrethroids are neurotoxic, chlorfenapyr is an uncoupler of oxidative phosphorylation preventing the formation of the main energy reservoir ATP in insect mitochondria [51, 52]. Even though clothianidin is a neurotoxic insecticide, it has its site of action on nicotinic acetylcholine receptors [53, 54] whereas pyrethroids act on voltage-gated sodium channels [55, 56]. Given that these new insecticides are also in demand in agriculture, the susceptibility of all populations of *An. gambiae* s.l. observed in this study rules out the hypothesis of possible cross-resistance between these two products. Similar results showing perfect vector sensitivity to the new insecticides were observed with clothianidin by Oxborough *et al.* [35] in areas of high malaria vector resistance in Africa. According to the authors, sensitivity of wild populations of *An. gambiae* s.l. to clothianidin has been observed in 11 African countries. However, they pointed out that at least one site in 5 countries had vector mortalities below 98%. Two years later, in a similar study, the same author showed perfect sensitivity of wild populations of *An. gambiae* s.l. to chlorfenapyr at a concentration of 100 µg/ai/bottle in 10 African countries [57]. This information is in line with the idea of combining these new products with pyrethroids in the context of vector resistance management. Two new tools fit into this category: the mosquito nets with double active ingredients Interceptor G2 and the new insecticide formulation fludora fusion. Interceptor G2 is a new mosquito net incorporating chlorfenapyr and a pyrethroid insecticide (alphacypermethrin) being deployed in communities in Benin. Evidence of the community effectiveness of this net has already been provided by randomized controlled trials in Benin [58] and Tanzania [59]. In view of the susceptibility of vectors to this product, whatever the growing area, Interceptor® G2 LLINs could be considered a promising tool in the management of vector resistance to pyrethroids. However, the selection of the resistance mutation being a dynamic phenomenon, rigorous monitoring of the sensitivity of the vectors to these products is necessary over time.

5. Conclusion

The results of this study confirm the widespread resistance of *An. gambiae* s.l. to pyrethroid insecticides whatever the agro-

ecological area is. However, all mosquito populations from market gardening, cereal, rice and cotton growing areas showed perfect susceptibility to CFP and CTD. These results suggest that these new molecules can be used to manage of vector resistance to insecticides in Benin.

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle KE, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015 Oct 8;526(7572):207-11.
2. World Health Organization. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/200018>. 2015.
3. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and veterinary entomology*. 2000 Mar;14(1):1-5.
4. Mosha FW, Lyimo IN, Oxborough RM, Matowo J, Malima R, Feston E, *et al.* Comparative efficacies of permethrin-, deltamethrin- and α -cypermethrin-treated nets, against *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in northern Tanzania. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2008 Jun 1;102(4):367-76.
5. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: A worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends in parasitology*. 2016 Mar 1;32(3):187-96.
6. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging infectious diseases*. 2007 Feb;13(2):199.
7. Akogbeto M, Yakoubou S. Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990). 1999 May;92(2):123-30.
8. Yadouleton AW, Padonou GG, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V *et al.* Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin ». *Malaria Journal*. 2010;9(1):83.
9. Djogbénou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: A nationwide survey. *Medical and veterinary entomology*. 2011 Sep;25(3):256-267.
10. Djègbè 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. *Malaria journal*. 2011 Dec;10(1):1-1.
11. 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 Dec;8(1):1-4.12.
12. Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L, *et al.* Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasites &*

- vectors. 2011 Dec;4(1):1-1.
13. 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 Tropica*. 2007;101(3):207-16.
 14. WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management (GPIRM). Geneva: World Health Organization; c2012.
 15. Sagbohan HW, Kpanou CD, Sovi A, Osse R, Sidick A, Adoha C, *et al.* Pyrethroid Resistance Intensity in *Anopheles gambiae* s.l. from Different Agricultural Production Zones in Benin, West Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2022;22(1):39-47.
 16. World Health Organization. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275867>. 2018
 17. Elamathi N, Verma V, Sharma VP, Sreehari U, Raghavendra K. Neonicotinoids in Vector Control: In Silico Approach. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2014;4(39):25-29.
 18. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Knols B, Akogbeto M, Rowland M. Control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with chlorfenapyr in Benin. *Tropical Medicine & International Health*. 2009 Apr;14(4):389-95.
 19. Bayili K, N'do S, Namountougou M, Sanou R, Ouattara A, Dabiré RK, *et al.* Evaluation of efficacy of Interceptor® G2, a long-lasting insecticide net coated with a mixture of chlorfenapyr and alpha-cypermethrin, against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *Malaria journal*. 2017 Dec;16(1):1-9.
 20. Camara S, Ahoua ALP, Koffi AA, Clegban YCM, Kabran JP, Koffi FM, *et al.* Efficacy of Interceptor (®) G2, a new long-lasting insecticidal net against wild pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire: a semi-field trial. *Parasite*. 2018;25:42.
 21. N'Guessan R, Ngufor C, Kudom AA, Boko P, Odjo A, Malone D, *et al.* Mosquito nets treated with a mixture of chlorfenapyr and alphacypermethrin control pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in West Africa. *PloS one*. 2014 Feb 3;9(2):e87710.
 22. N'Guessan R, Odjo A, Ngufor C, Malone D, Rowland M. A chlorfenapyr mixture net Interceptor® G2 shows high efficacy and wash durability against resistant mosquitoes in West Africa. *PLoS One*. 2016 Nov 16;11(11):e0165925.
 23. Ngufor C, N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Vigninou E, Asidi A, *et al.* Combining indoor residual spraying with chlorfenapyr and long-lasting insecticidal bed nets for improved control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae*: an experimental hut trial in Benin. *Malaria journal*. 2011 Dec;10(1):1-7.
 24. Raghavendra K, Barik TK, Sharma P, Bhatt RM, Srivastava HC, Sreehari U, *et al.* Chlorfenapyr: A new insecticide with a novel mode of action can control pyrethroid-resistant malaria vectors. *Malar J*. 2011;10:16.
 25. Gandonou MB. Monographie de La ville de Porto Novo, 10; c2006
 26. Hounghinin. Monographie de la commune de Bohicon - Association Nationale.. <https://www.yumpu.com/fr/document/read/28423274/mo-nographie-de-la-commune-de-bohicon-association-nationale; c2006>
 27. Djenontin I. Monographie communale de lokossa-» <https://www.yumpu.com/fr/document/read/5978877/monographie-communale-de-lokossa-association-nationale-des; c2006>.
 28. Bani G. Monographie De La Commune De Gogounou-PDF Free Download »<https://docplayer.fr/141718748-Monographie-de-la-commune-de-gogounou.html; c2006>.
 29. Ahoyo A, René N. « Monographie De La Commune De Malanville PDF Téléchargement Gratuit ». <https://docplayer.fr/43994625-Monographie-de-la-commune-de-malanville.html. 2006>.
 30. Capo-chichi YJ. Monographie De La Commune De Glazoue - PDF Free Download <https://docplayer.fr/130884542-Monographie-de-la-commune-de-glazoue.html; c2006>.
 31. Ton P. La production du coton au Bénin. <http://www.slire.net/download/1889/la-production-du-coton-au-bnin.pdf. 2004>.
 32. Coetzee M. Key to the females of Afrotropical *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal*. 2020;19(1):70.
 33. WHO. Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme. Seconde édition. Genève: Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259741; c2017>.
 34. World Health Organization. Manual for Monitoring Insecticide Resistance in Mosquito Vectors and Selecting Appropriate Interventions. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964. 2022>.
 35. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Dabire R, Gnanguenon V, Wat'senga F, *et al.* « 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 ». *Malaria Journal*. 2019;18(1):264.
 36. Yadouleton AW, Asidi AM, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD and Akogbeto MC. « Development of vegetable farming: A cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin ». *Malaria Journal*. 2009;8(1):103.
 37. Padonou GG, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, *et al.* « Impact of Three Years of Large Scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) Interventions on Insecticide Resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin ». *Parasites & Vectors*. 2012;5(1):72.
 38. Assogba BS, Pasteur N, Makoundou P, Unal S, Baba-Moussa L, Labbé P, *et al.* « Dynamic of Resistance Alleles of Two Major Insecticide Targets in *Anopheles gambiae* (s.l.) Populations from Benin, West Africa ». *Parasites & Vectors*. 2020;13(1):134.
 39. Aïzoun N. « Establishment of the correlation between resistance level to deltamethrin and physiological age of *An. gambiae* sensu lato populations from Dogbo district in South-Western Benin, West Africa ». *GSC Advanced Research and Reviews*. 2022;10(2):037-044.
 40. Koukpo CZ, Fassinou AJYH, Ossé RA, Agossa FR, Sovi

- A, Sewadé WT *et al.* The current distribution and characterization of the L1014F resistance allele of the *kdr* gene in three malaria vectors (*Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis*) in Benin (West Africa) ». *Malaria Journal*. 2019;18 (1):175.
41. Fassinou AJYH, Koukpo CZ, Ossè RA, Agossa FR, Assogba BS, Sidick Am, *et al.* « Genetic Structure of *Anopheles gambiae* s.s Populations Following the Use of Insecticides on Several Consecutive Years in Southern Benin ». *Tropical Medicine and Health*. 2019;47(1):23.
 42. Zhang W, Jiang F, Ou J. Global Pesticide Consumption and Pollution: With China as a Focus; c2011.
 43. Lamichhane JR. « Pesticide Use and Risk Reduction in European Farming Systems with IPM: An Introduction to the Special Issue ». *Crop Protection*. 2017;97(Juillet):1-6.
 44. Tudi M, Ruan HD, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, Chu C, *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment ». *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(3):1112.
 45. Ravindra S. Plant Protection https://books.google.com/books/about/Plant_Protection.html. 2022.
 46. 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. *Malaria Journal*. 2014;13(1):444.
 47. Yahouédo GA, Cornelie S, Djégbé I, Ahlonsou J, Sidick A, 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(1):385.
 48. Salako AS, Ahogni I, Aïkpon 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;(1):618.
 49. Philbert A, Lyantagaye SL, Nkwengulila G. Farmers' pesticide usage practices in the malaria endemic region of North-Western Tanzania: implications to the control of malaria vectors. *BMC Public Health*. 2019;9(1):1456.
 50. Raghavendra K, Barik TK, Sharma P, Bhatt RM, Srivastava HC, Sreehari U, *et al.* « Chlorfenapyr: A New Insecticide with Novel Mode of Action Can Control Pyrethroid Resistant Malaria Vectors. *Malaria Journal*. 2011;10(1):16.
 51. McLeod P, Diaz FJ, Johnson DT. Toxicity, Persistence, and Efficacy of Spinosad, Chlorfenapyr, and Thiamethoxam on Eggplant When Applied Against the Eggplant Flea Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 2002;95(2):331-35.
 52. Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Arthur FH, Throne JE. Residual Efficacy of Chlorfenapyr for Control of Stored-Product Psocids (Psocoptera). *Journal of Economic Entomology*. 2014;107(2):854-59.
 53. Perry T, Chen W, Ghazali R, Yang YT, Christesen D, Martelli F, *et al.* Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Mode of Action of Neonicotinoid, Sulfoximine, and Spinosyn Insecticides in *Drosophila Melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2021;131(avril):103547.
 54. Thany SH. « Molecular Mechanism of Action of Neonicotinoid Insecticides ». *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5484.
 55. Clark JM, Symington SB. Advances in the Mode of Action of Pyrethroids. In *Pyrethroids: From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*, édité par Noritada Matsuo et Tatsuya Mori, 2012, 49-72.
 56. Gajendiran A, Abraham J. An Overview of Pyrethroid Insecticides ». *Frontiers in Biology*. 2018;13(2):79-90.
 57. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Chabi J, Wat'senga F, Agossa FR, *et al.* Determination of the Discriminating Concentration of Chlorfenapyr (Pyrrole) and *Anopheles gambiae* Sensu Lato Susceptibility Testing in Preparation for Distribution of Interceptor® G2 Insecticide-Treated Nets . *Malaria Journal*. 2021;20(1):316.
 58. Accrombessi M, Cook J, Dangbenon E, Yovogan B, Akpovi H, Sovi A *et al.* Efficacy of Pyriproxyfen-Pyrethroid Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and Chlorfenapyr Pyrethroid LLINs Compared with Pyrethroid-Only LLINs for Malaria Control in Benin: A Cluster-Randomised, Superiority Trial. *The Lancet*. 2023;401(10375):435-46.
 59. Mosha JF, Kulkarni MA, Lukole E, Matowo NS, Pitt C, Messenger LA, *et al.* Effectiveness and Cost-Effectiveness against Malaria of Three Types of Dual-Active Ingredient Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) Compared with Pyrethroid-Only LLINs in Tanzania: A Four-Arm, Cluster-Randomised Trial ». *The Lancet*. 2022;399(10331):1227-41.

Bioefficacy of Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 and Interceptor® G2 on pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* s.l. in preparation for a distribution campaign of new generation nets in Benin, West Africa --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Medical Sciences
Keywords:	<i>Anopheles gambiae</i> s.l.; Resistance; Insecticides; LLINs; : Benin
Manuscript Classifications:	60: Chemistry; 90: Environmental Science; 110: Biological Sciences; 120: Veterinary Medicine; 130: Health Sciences; 140: Social Sciences
Corresponding Author:	Mahouton David ZOUNGBEDJI Abomey-calavi, BENIN
First Author:	Mahouton David ZOUNGBEDJI
Order of Authors:	Mahouton David ZOUNGBEDJI Germain Gil Padonou Arthur Sovi Alphonse Keller Konkon Albert Sourou Salako Aboubakar Sidick Juvénal Minassou Ahouandjinou Linda Towakinou Razaki Ossè Rock Aïkpon Cyriaque Afoukou Lamine Baba-Moussa Martin Akogbéto
Abstract:	Abstract Long-lasting insecticidal nets (LLINs) are one of the most effective and accessible malaria vector control tools for at-risk communities. In the present study, the bioefficacy of new generation nets such as Piperonyl Butoxide (PBO)-pyrethroid nets (Olyset® Plus and PermaNet® 3.0), and dual active ingredients nets (Interceptor® G2) was evaluated on different pyrethroid-resistant populations of <i>Anopheles gambiae</i> s.l. in Benin. The susceptibility status of wild populations of <i>Anopheles gambiae</i> s.l. from six communes in Benin to permethrin 0.75%, alphacypermethrin 0.05%, and deltamethrin 0.05% was assessed through WHO susceptibility tube tests. The mosquito populations were also exposed to chlorfenapyr using CDC bottle bioassay method. Biochemical and PCR tests were performed on a subset of the mosquitoes to assess overexpression of metabolic enzymes, and frequency of Kdr mutation, respectively. The bioefficacy of Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 and Interceptor® G2 was also evaluated through WHO cone (using both the <i>An. gambiae</i> Kisumu, and field strains) and tunnel tests. Overall, mortality rates ranged from 9-60% for pyrethroid insecticides, and 98-100% for chlorfenapyr (100 µg/ml). WHO cone tests performed with the <i>An. gambiae</i> Kisumu strain showed that the three types of LLINs were effective with mean mortality rates > 80%. The same test conducted with the field strains showed higher mortality rates with both Olyset Plus and PermaNet 3.0 compared to Interceptor® G2 and Interceptor®.

	Tunnel tests performed with populations of <i>An. gambiae</i> s.l. from Porto-Novo revealed that 72 hours mortality rate and the blood-feeding inhibition rate were 94% (95% CI: 87.40-97.77), and 89.09%, respectively for Interceptor® G2, against 17% (95% CI: 10.23-25.82), and 60% respectively, for Interceptor®. The same trend was observed with field mosquito populations from Allada and Bohicon. These results suggest that the new generation nets could be used as potential alternatives to pyrethroid-only nets for improved control of pyrethroid resistant malaria vectors. Keywords: <i>Anopheles gambiae</i> s.l., Resistance, Insecticides, LLINs, Benin
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	Luc Djogbenou ldjogbenou22002@yahoo.fr Même thématique Armel Djenontin armeldj@yahoo.fr Même thématique

Article accepté (avec révisions en cours)

Bioefficacy of Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 and Interceptor® G2 on pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* s.l. in preparation for a distribution campaign of new generation nets in Benin, West Africa

David Mahouton Zoungbédji^{1,2}, Germain Gil Padonou^{1,2}, Arthur Sovi^{1,5,6}, Alphonse Keller Konkon^{1,2}, Albert Sourou Salako¹, Aboubakar Sidick¹, Juvénal Minassou Ahouandjinou¹, Linda Towakinou¹, Razaki Ossè^{1,4}, Rock Aïkpon^{3,7}, Cyriaque Afoukou³, Lamine Baba-Moussa^{2,8} and Martin Akogbéto¹

Affiliations

¹Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

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

³Programme National de Lutte contre le Paludisme, Cotonou, Benin.

⁴École de gestion et d'exploitation des systèmes d'élevage, Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo, Benin

⁵Faculty of Agronomy, University of Parakou, Parakou, Benin

⁶Faculty of Infectious and Tropical Diseases, The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

⁷Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques (UNSTIM), Abomey, Benin

⁸Laboratory of Biology and Molecular Typing in Microbiology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, Benin

E-mails

*Corresponding author: davidzoungbedji91@gmail.com

M.D.Z. davidzoungbedji91@gmail.com

G.G.P. pagergil@yahoo.fr

A.S. sart52005@yahoo.fr

K.A.K. konkonkelleralphonse@gmail.com

A.S.S. albertsourousalako@yahoo.fr

A.S. sidick_aboubacar@yahoo.fr

JA. juveminassou@gmail.com

LT. ltowakinou@gmail.com

R.O. ossraz@yahoo.fr

R.A. rockpremier@yahoo.fr

C.A. moiadm@yahoo.fr

L.B. laminesaid@yahoo.fr

M.A. akogbetom@yahoo.fr

Abstract

Long-lasting insecticidal nets (LLINs) are one of the most effective and accessible malaria vector control tools for at-risk communities. In the present study, the bioefficacy of new generation nets such as Piperonyl Butoxide (PBO)-pyrethroid nets (Olyset® Plus and PermaNet® 3.0), and dual active ingredients nets (Interceptor® G2) was evaluated on different pyrethroid-resistant populations of *Anopheles gambiae* s.l. in Benin.

The susceptibility status of wild populations of *Anopheles gambiae* s.l. from six communes in Benin to permethrin 0.75%, alphacypermethrin 0.05%, and deltamethrin 0.05% was assessed through WHO susceptibility tube tests. The mosquito populations were also exposed to chlorfenapyr using CDC bottle bioassay method. Biochemical and PCR tests were performed on a subset of the mosquitoes to assess overexpression of metabolic enzymes, and frequency of *Kdr* mutation, respectively. The bioefficacy of Olyset® Plus, PermaNet® 3.0 and Interceptor® G2 was also evaluated through WHO cone (using both the *An. gambiae* Kisumu, and field strains) and tunnel tests.

Overall, mortality rates ranged from 9-60% for pyrethroid insecticides, and 98-100% for chlorfenapyr (100 µg/ml). WHO cone tests performed with the *An. gambiae* Kisumu strain showed that the three types of LLINs were effective with mean mortality rates > 80%. The same test conducted with the field strains showed higher mortality rates with both Olyset Plus and PermaNet 3.0 compared to Interceptor® G2 and Interceptor®. Tunnel tests performed with populations of *An. gambiae* s.l. from Porto-Novo revealed that 72 hours mortality rate and the blood-feeding inhibition rate were 94% (95% CI: 87.40-97.77), and 89.09%, respectively for Interceptor® G2, against 17% (95% CI: 10.23-25.82), and 60% respectively, for Interceptor®. The same trend was observed with field mosquito populations from Allada and Bohicon.

These results suggest that the new generation nets could be used as potential alternatives to pyrethroid-only nets for improved control of pyrethroid resistant malaria vectors.

Keywords: *Anopheles gambiae* s.l., Resistance, Insecticides, LLINs, Benin

Introduction

Indoor residual spraying (IRS) and long-lasting insecticidal nets (LLINs) remain the two main vector control tools recommended by the World Health Organization (WHO) for the control of malaria vectors. LLINs are widely used as a preventive measure against malaria infection in Africa [1]. In 2021, the WHO estimated that 68% of the population of sub-Saharan Africa had access to at least one LLIN compared to only 2% in 2000 [2]. This has significantly reduced the burden of malaria in many countries in sub-Saharan Africa [3, 4]. Indeed, of the 663 million cases of malaria averted in sub-Saharan Africa between 2001 and 2015, 69% were by LLINs [5]. Although these results are encouraging, the expansion of pyrethroid resistance, as well as the increase in its intensity among malaria vectors in sub-Saharan Africa, particularly in Benin, could constitute a serious threat to the sustainability of the gains made [6, 7]. According to several studies carried out in Benin, insecticide resistance was due to overexpression of the activity of detoxification enzymes [8, 9], and/or target site mutations observed in some genes (Kdr L1014F, Kdr N1575Y, Ace-1 G119S) present in populations of *An. gambiae* s.l. [10, 11, 12]. In the context of multiple resistance mechanisms, the search for new tools that will be able to provide improved control of vectors is required. This is why new-generation nets were developed. The nets include PBO-LLINs (incorporating the synergist, PBO plus a pyrethroid insecticide), as well as the dual-active ingredient (ai) LLINs (impregnating with a pyrethroid and an insecticide with a differing mode of action like pyriproxyfen or chlorfenapyr). The synergist PBO, inhibits oxidases in insects [13]. Pyriproxyfen, an insect growth regulator acts on fecundity [14, 15], while chlorfenapyr disrupts the oxidative phosphorylation in the mitochondria of insects [16].

In 2017, the WHO provided an interim recommendation to the PBO-LLINs after they showed superior efficacy over standard pyrethroid-only LLINs in a randomised controlled trial (RCT) conducted in Tanzania [17]. Similarly, Royal Guard® (mixture of alphacypermethrin-pyriproxyfen) and Interceptor® G2 (mixture of alphacypermethrin-chlorfenapyr) got the WHO recommendation after two RCTs performed in Tanzania [18] and Benin [19].

To generate more phase I results, the present study aims to evaluate in the laboratory, the bio-efficacy of unwashed new generation nets on pyrethroid-resistant populations of *An. gambiae* s.l.

Methods

Study area

The study was carried out in the departments of Ouémé (communes of Akpro-Misséréte and Porto-Novo), Atlantique (commune of Allada), Zou (commune of Bohicon), Mono (commune of Lokossa) (Fig. 1). These five communes have a subequatorial climate with two rainy seasons (April to June, and September to November) and two dry seasons (July to August, and December to March). The annual rainfall ranges between 1200 and 1300 mm and the humidity is about 75%. All the communes have rivers, marshes, swamps and lowlands which encourages the practice of market gardening and fish farming.

The commune of Djougou located in the department of Donga, which has a Sudano-Guinean climate, with one rainy season (April to October), and one dry season (October to April), was also surveyed. Its annual rainfall varies between 900 and 1100 mm. Agriculture is the main activity practised in this commune.

Overall, the study communes were selected due to their high malaria prevalence, and widespread vector resistance to pyrethroids [20, 21, 22]. There is a high use of insecticides in the six study communes due to crop protection against pests.

Larvae collection, rearing and identification

The larvae and pupae of *Anopheles* mosquitoes were collected from positive breeding sites identified in each commune's central and peripheral areas using dippers, ladles, pipettes and larval containers. They were transported to the insectary of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), and reared at $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperature) and 80% (relative humidity), until adulthood. The morphological identification was performed using the Coetzee taxonomic key [23], only members of *An. gambiae* s.l. were used for the different tests.

WHO susceptibility tube tests

The susceptibility status of *An. gambiae* s.l. populations to pyrethroid insecticides was assessed, using WHO tube tests. Thus, batches of 20-25 unfed female mosquitoes, aged 2-5 days, were exposed to papers impregnated with deltamethrin 0.05%, permethrin 0.75%, and alpha-cypermethrin 0.05 % for 60 minutes. Other batches of 20-25 mosquitoes, exposed to non-impregnated papers, served as controls. Over the exposure time, the number of mosquitoes knocked down by the insecticide was recorded every 15 minutes. Thereafter, the mosquitoes

were transferred to observation tubes where they were fed with a 10% sugar solution and kept at a temperature of $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a humidity of $75\% \pm 10\%$ for 24 hours. The mortality rate was determined 24 hours after exposure [24].

CDC Bottle bioassays

The susceptibility of wild populations of *An. gambiae* s.l. to chlorfenapyr was determined using the CDC bottle bioassay. Thus, 250 ml glass Wheaton bottles were coated with 1 ml of chlorfenapyr (100 $\mu\text{g/ml}$). A bottle coated with 1 ml of acetone was used as a control. Batches of 20-25 mosquitoes were transferred to the coated bottles for a 60-minute exposure, during which the number of knocked-down mosquitoes was recorded every 15 minutes. After exposure, the mosquitoes were gently transferred to observation cups, and fed with a 10% sweetened juice. The immediate mortality was recorded after 1 hour of exposure, while the delayed mortalities were recorded 24, 48 and 72 hours later. Mosquitoes that died immediately were stored in RNA later at -80°C . Those dead after 24, 48 and 72 hours post-exposure were kept in silica gel [25].

Molecular and biochemical assays

Dead and live mosquitoes from the WHO susceptibility tube tests were analyzed using PCR to determine the molecular species of the *An. gambiae* complex [26], and the presence of the *Kdr* L1014F mutation [27].

Thirty (30) unexposed female *An. gambiae* s.l., 2 to 5 days old, from each commune were used for biochemical analyses. These analyses were performed to compare the level of expression of detoxification enzymes (mixed function oxidases, non-specific esterases and glutathione S-transferases) between the different field populations of *An. gambiae* s.l. and the reference susceptible strain (*An. gambiae* Kisumu), in accordance with the protocol described by [28].

Description of tested mosquito nets

The three types of new-generation nets include:

-Olyset® Plus, a polyethylene net manufactured by Sumitomo Chemicals, Japan, which incorporates 2% permethrin (800 mg permethrin ai/m^2), and 1% PBO (400 mg PBO ai/m^2).

-PermaNet® 3.0, a net manufactured by Vestergaard Frandsen SA, Denmark that has a polyethylene roof coated with $2.8 \text{ g/kg} \pm 25\%$ deltamethrin and $4.0 \text{ g/kg} \pm 25\%$ PBO, and polyester sides coated with $2.8 \text{ g/kg} \pm 25\%$ deltamethrin.

-Interceptor® G2, a polyester net manufactured by BASF SE, Ludwigshafen, Germany which is coated with a mixture of 200mg/m² chlorfenapyr and 100mg/m² alpha-cypermethrin. The standard pyrethroid-only net that served as control is Interceptor®. It is a polyester netting manufactured by BASF SE, Ludwigshafen, Germany, which incorporates 200 mg/m² of alpha-cypermethrin.

WHO cone bioassay

A susceptible laboratory strain (*An. gambiae* Kisumu), and field strains (*An. gambiae* s.l.) were used to assess the bio-efficacy of new-generation nets according to the WHO cone test protocol [29].

Thus, five (5) pieces of Olyset® Plus and Interceptor® G2 mosquito nets were tested. The net pieces were 30cm x 30cm with one piece from the roof, and one from each of the four sides. However, for PermaNet® 3.0, 4 pieces were used, with two from the roof, and two from the lateral sides (1 from the length, and 1 from the width). Each net piece was labelled, individually wrapped in foil, and stored in a refrigerator prior to testing. A total of 50 mosquitoes were tested on each Olyset® Plus and Interceptor® G2 net, while 40 were tested for PermaNet® 3.0. When carrying out the tests, two standard cones were fixed to each of the mosquito net pieces, using a plastic plate. Five unfed females *An. gambiae* s.l., aged 2 to 5 days, were introduced into each cone for 3 minutes. After exposure, the mosquitoes were gently transferred into cups, fed with 10% sweetened juice and observed for 24 hours at 27°C ± 2°C (room temperature) and 75% ± 10% (relative humidity). The number of mosquitoes knocked down was counted every 5 minutes during, and one hour after the exposure. The mortality rates were determined at 24 hours' post-exposure.

WHO tunnel test

The bio-efficacy of the Interceptor® G2 and Interceptor® LLINs was also evaluated using tunnel tests. The untreated mosquito net was used as a negative control. Unfed females *An. gambiae* s.l., 7 days old, were released in a tunnel that has 2 square sides (25 cm × 25 cm), and a length of 60 cm. The tunnel is divided into two sections: namely section A, which constitutes 2/3 of the tunnel and where the mosquito releases took place, and section B, which constitutes the rest of the tunnel where an immobilized bait (guinea pig) was placed. At the end of section B of the tunnel, a 25 cm side square cage covered with a polyester net was installed. The sample netting to be tested was placed just after section A. The area of the net available to mosquitoes was 400 cm² (20 cm × 20 cm), with nine holes of 1 cm in diameter. One hundred female

mosquitoes left unfed for at least 6 hours before the test, were introduced into the cage through the end of section A in the evening. The tests were carried out under the same conditions with three different tunnels: one for the Interceptor® G2, one for the Interceptor® (positive control), and the last one for the untreated net (negative control). After 12 hours of exposure, mosquitoes were gently removed from each section of the tunnel in the early morning using a mechanical aspirator and placed in veiled and labelled cups. Mosquitoes in these cups were provided with a 10% sweetened juice and observed for 72 hours to determine the delayed mortality. The number of live, dead, unfed or blood-fed mosquitoes in each section of the tunnel was recorded to determine the entry, mortality, and blood-feeding inhibition rates. The tests were carried out in total darkness overnight, at $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (temperature) and $75\% \pm 10\%$ (relative humidity) [30].

Data analyses and interpretation

The observed mortality rates after 24 hours of exposure to the different insecticides were interpreted according to the WHO criteria [6]:

- Mortality rate between 98% and 100%: Susceptible mosquito population

- Mortality rate $\geq 90\%$ and $< 98\%$: Possible resistance in the mosquito population

- Mortality rate $< 90\%$: Insecticide-resistant mosquito population.

The allele frequencies of the *Kdr* L1014F and *Ace-1* G119S mutation were determined by the following formula: $F = (2n_{RR} + n_{RS}) / (2(n_{RR} + n_{RS} + n_{SS}))$

n=number of genotypes, RR: homozygous resistant, RS: Heterozygous, SS: homozygous susceptible.

The exact binomial test was used to calculate confidence intervals for mortality rates and allelic frequencies of mutations such as *Kdr* L1014F and *Ace-1* G119S.

To assess the resistance activity of metabolic enzymes, their expression level was compared between field populations of *An. gambiae* s.l. and the laboratory susceptible strain, *An. gambiae* (Kisumu strain). GraphPad Prism8 software was used to draw the graphs and calculate the p-values.

The Mann-Whitney U test enabled comparison of the activity of enzymes, between the field mosquito populations and the laboratory susceptible strain (*An. gambiae* Kisumu). Statistical analyses were conducted using R 3.3.2 software.

Data on the bioefficacy of LLINs tested with the laboratory susceptible strain *An. gambiae* (Kisumu strain) was analyzed according to WHO criteria:

- Minimal efficacy: $KD_{60} \geq 75\%$ or mortality rate $\geq 50\%$.

- Optimal efficacy: knock down rate at 60 minutes (KD_{60}) $\geq 95\%$ or mortality rate $\geq 80\%$.

Furthermore, mortality rates displayed by LLINs using wild populations of *An. gambiae* s.l. was also presented.

The indicators evaluated through the tunnel tests are as follows:

-Blood-feeding rate (%) = $(A/B) \times 100$, where A is the number of blood-fed mosquitoes collected in the tunnel, and B is the total number of mosquitoes exposed to the insecticide-incorporated net.

-Blood feeding inhibition rate (%) = $((C-D))/C \times 100$, where C and D are the blood feeding rates obtained with the untreated, and insecticide-treated nets, respectively.

-Immediate mortality (%) = $(E/F) \times 100$, where E is the number of dead mosquitoes collected in the tunnel just after the 12-hour-exposure time, and F is the total number of mosquitoes exposed to the insecticide-incorporated net.

-24 hour mortality (%) = $(G/H) \times 100$, where G is the number of dead mosquitoes 24 hours post-exposure, and H, the total number of mosquitoes exposed to the insecticide-treated net

-72 hours mortality (%) = $(I/J) \times 100$, where I is the number of dead mosquitoes within 72 hours, and J, the total number of mosquitoes exposed to the insecticide-treated net.

Results

Susceptibility of *An. gambiae* s.l. to pyrethroids (WHO susceptibility tube tests)

Overall, the populations of *An. gambiae* s.l. from Akpro-Missérété, Porto-Novo, Bohicon, Lokossa, Allada, and Djougou showed high pyrethroid resistance. Indeed, mortality rates were below 60% for all pyrethroid insecticides tested, regardless of the commune. It varied between 9.89% [95% CI: 4.62-17.95] and 27.14% [95% CI: 17.20-39.10] for permethrin, 18.95% [95% CI: 11.63-28.28] and 53.13% [95% CI: 42.66-63.39] for alphacypermethrin, and 27.78% [95% CI: 18.95-38.22] and 55.81% [95% CI: 44.70-66.52] for deltamethrin (Fig. 2).

Frequency of *Kdr* L1014F mutation in *An. gambiae* s.l.

Overall, the frequency of the *Kdr* L1014F mutation was high in all populations of *An. gambiae* s.l. It varied from 83% (95% CI: 77-88) in Akpro-Missérété to 89% (95% CI: 81 - 94) in Allada, with an average frequency of 86% (95% CI: 83-88) for the whole study area. There was no significant difference in the frequency observed between *An. gambiae* [87%, 95% CI: 84-90], and *An. coluzzii* [84% (80-88)], the two species molecularly identified in *An. gambiae* s.l. (Table 1).

Enzymatic activities in *An. gambiae* s.l.

The activity of enzymes was compared between the field populations of *An. gambiae* s.l. and the laboratory susceptible strain *An. gambiae* (Kisumu strain). Results obtained showed an overexpression of glutathione-s-transferases (GSTs) in Allada, Akpro-Missérété, Lokossa and Bohicon. Similarly, a significantly higher esterase activity was seen in Djougou, Lokossa, Akpro-Missérété and Bohicon. An overproduction of oxidases (MFOs) was only observed in Djougou (Fig. 3).

Susceptibility of *An. gambiae* s.l. to chlorfenapyr (CDC bottle bioassay)

Figure 4 shows the mortality rates of field populations of *An. gambiae* s.l. to chlorfenapyr. All field mosquito populations showed full susceptibility (100% mortality) to chlorfenapyr between 24 and 48 hours post-exposure.

WHO cone bioassay results

The Interceptor® net showed optimal efficacy with the laboratory susceptible strain, *An. gambiae* Kisumu (mortality $\geq 80\%$), while the mortality observed with the field populations of *An. gambiae* s.l. from Bohicon, Lokossa, Allada and Djougou was less than 10%. The same trend was observed with Interceptor® G2.

On the other hand, Olyset® Plus and PermaNet® 3.0 nets, did not only show an optimal efficacy with the laboratory susceptible strain, *An. gambiae* (Kisumu), but also induced significantly higher mortality rates against field populations of *An. gambiae* s.l., when compared with the Interceptor® net.

Furthermore, the Olyset® Plus nets revealed 24-hour mortality rates greater than 80% with field populations of *An. gambiae* s.l. from Akpro-Missérété (96.08%), Porto-Novo (83.33%), Bohicon (84.62%), Lokossa (91.07%), Allada (96%) and Djougou (81.03%). This was not observed with Interceptor® net (communes level range: 0%-8%), Interceptor® G2 net (communes level range: 0%-6%), and PermaNet® 3.0 (communes level range: 42.5%-58.54%) (Fig. 5).

WHO tunnel test results

Through the tunnel tests performed with field populations of *An. gambiae* s.l. from Porto-Novo, Bohicon and Allada, Interceptor® G2 performed better than Interceptor®.

The immediate mortality rates observed with Interceptor® were 11% (5.62-18.83), 37.5% (26.92-49.04) and 35% (24.67-46.48), against 69% (58.97-77.87), 92.5% (84.39-97.2) and

72.5% (61.38-81.9) with Interceptor® G2 in Porto-Novo, Bohicon and Allada, respectively. In all communes surveyed, the immediate mortality rates induced by untreated nets were significantly lower than those of both Interceptor® and Interceptor® G2 nets.

The blood feeding rate was 22% (14.33-31.39) in Porto-Novo, 31.25% (21.35-42.59) in Bohicon, and 22.5% (13.91-33.21) in Allada with Interceptor®, while it was less than 10% in all these mosquito populations tested with Interceptor® G2. The blood-feeding inhibition induced by Interceptor® G2 LLINs was higher compared to that of Interceptor® LLINs. It was 60%, 40% and 48.86% with Interceptor® against 89.09%, 87.98% and 100% with Interceptor® G2 in Porto-Novo, Bohicon and Allada, respectively (Table 2).

In all the study communes, the highest entry rate was observed with the untreated net that served as control, followed by Interceptor®, and Interceptor® G2 (Table 2).

The mortality of the populations of *An. gambiae* s.l. exposed to Interceptor® and Interceptor® G2 LLINs was recorded at 24h, 48h and 72h after the test. The results revealed no significant difference between the mortality rates recorded immediately and at 24, 48 and 72 hours post-exposure, in mosquito populations exposed to Interceptor® LLINs. However, mortality rates were 11%-17% in Porto-Novo, 37.5%-41.25% in Bohicon, and 35%-41.25% in Allada. On the other hand, with Interceptor® G2, there was a significant increase in 24-hour mortality rate compared to the immediate mortality. The immediate mortalities were 69%, 92.5% and 72.5% against 89%, 100% and 92.5% at 24 hours post-exposure in Porto-Novo, Bohicon and Allada, respectively. After 48 and 72 hours of observation, the mortalities observed did not differ significantly from those obtained 24 hours post-exposure (Fig. 6).

Discussion

The present study is a phase 1 trial that evaluated the efficacy of PermaNet® 3.0, Olyset® Plus, and Interceptor® G2, three new generation nets on field populations of *An. gambiae* s.l. from Benin.

The insecticide susceptibility test results showed that all field populations of *An. gambiae* s.l. were pyrethroid-resistant but fully susceptible to chlorfenapyr. These findings are similar to those obtained from a trial recently performed in several African countries [31]. Pyrethroid resistance observed in the field mosquito populations is not surprising because, for some years, this phenomenon is widespread in Benin [32, 33]. This may jeopardize mosquito control efforts based on the use of pyrethroid-only tools [34]. The susceptibility of vectors to chlorfenapyr could be because this product has a new mode of action. Indeed, it has a strong impact on the

energy reserves of insects by preventing the formation of adenosine triphosphate (ATP) in the mitochondria [16].

Mechanisms involved in pyrethroid resistance include *Kdr* L1014F mutation whose frequencies were above 80%, and similar in both *An. gambiae* and *An. coluzzii*, two sibling species identified in *An. gambiae* s.l. in all study communes. This result is reminiscent of the findings by Sagbohan *et al.* [35] in some Southern Benin districts, and suggests that this mutation is getting close to fixation. This might be due to a high selective pressure exerted by the uncontrolled use of this class of insecticide for domestic, public health and agricultural purposes. Apart from that, overexpression of MFOs, an enzyme involved in pyrethroid detoxification in insects was observed in Djougou. The lack of overexpression of this enzyme in the other sites needs further investigations, though it could be hypothesized that this would be due to fitness cost that interacts with resistance induced by oxidases [36, 37]. The elevated activity of GSTs and esterases in some study communes, is of concern, as these enzymes will certainly contribute to widening the range of the resistance mechanisms.

Due to widespread pyrethroid resistance observed in malaria vectors, as well as the resistance mechanisms involved, the efficacy of the pyrethroid-only LLINs in protecting communities from night-time mosquito bites is in question. So, since 2007, there have been calls to design new generation nets that could be used in communities to mitigate this issue [34]. Some trials conducted in different settings have already shown that PBO or next-generation insecticides such as chlorfenapyr may provide improved control of pyrethroid-resistant vectors [38, 39]. Indeed, those trials showed that PBO has the potential to restore (at least partially) the susceptibility of vectors to pyrethroids, while chlorfenapyr induced full susceptibility in pyrethroid-resistant malaria vectors.

The WHO cone tests performed with the *An. gambiae* (Kisumu strain), revealed that all three new generation nets as well as the standard pyrethroid-only net which served as control (Interceptor®) showed optimal efficacy, as they showed 24-hour mortality rates $\geq 80\%$. However, with field strains of *An. gambiae* s.l., Olyset® Plus appeared to be the best LLIN, followed by Permanet 3.0 and Interceptor® G2. As Interceptor® G2 LLIN is incorporated with chlorfenapyr (a slow-acting insecticide), it would have been more interesting to check mortality for up to 72 hours during the WHO cone tests. This constitutes a limitation of the present study. The tunnel test data which assessed immediate mortality rates, blood feeding inhibition and mosquito entry rates showed that Interceptor® G2 LLINs performed better than both Interceptor® LLIN and untreated net. However, the WHO cone tests performed with field populations of *An. gambiae* s.l. revealed that Interceptor® G2 LLIN displayed the lowest

mortalities as did the Interceptor® LLIN, a pyrethroid-only LLIN. The same observation was previously made by Oxborough *et al.* [40] who ended up concluding that tunnel tests remain the most reliable tests for evaluating the efficacy of new-generation LLINs. According to Oxborough *et al.* [40] and Kibondo *et al.* [41], the mode of action of chlorfenapyr (a non-neurotoxic insecticide) is compatible with the circadian activity rhythm of *Anopheles* mosquitoes, as they are quite active overnight but not during the day. This could justify the high mortality rates observed in the tunnel tests during which mosquitoes were exposed overnight to pieces of Interceptor® G2 LLINs. Indeed, during the tunnel tests, the mosquitoes attempt to pass through the torn nets to seek the host, which increases the net-vector contact and leads to the disruptive action of chlorfenapyr on the respiratory tract of the mosquitoes. This study provides evidence of the efficacy in phase 1 of chlorfenapyr-pyrethroid LLINs and PBO-pyrethroid LLINs on pyrethroid-resistant mosquito populations. Though the evidence of the community efficacy of these two classes of nets was provided through randomized controlled trials [17, 42, 18, 19], their deployment should take into account the level and type of resistance mediated by the local malaria vectors. Also, it is worth assessing if alternating Interceptor® G2 LLINs and PBO LLINs in the community would be a good strategy for managing insecticide resistance in the malaria vectors. Not having both PBO-pyrethroid susceptibility tests and bioassays performed with washed LLINs, is also another limitation of this study. However, data collected in the course of this study is still useful to understand the response of pyrethroid-resistant populations of *An. gambiae* s.l., to new generation LLINs incorporating insecticides with different modes of action. This will help Benin's NMCP to better orient its malaria vector control policy.

Conclusion

Through phase 1 trials, the present study revealed that new generation LLINs (Permanet 3.0, Olyset Plus, and Interceptor® G2) were more effective against resistant populations of *An. gambiae* s.l., compared to pyrethroid-only LLINs. So, these new generation LLINs could be considered as a viable option for improved control of pyrethroid-resistant malaria vectors.

Declarations

Author contribution statement

The study was designed and its protocol written by GGP, DMZ and MA. Data collection was performed by DMZ, AKK, ASS, AS. DMZ, AKK, AS, JA and LT were performed Molecular analyses. DMZ, AS, ASS, AKK, GGP, and MCA wrote the manuscript. DMZ, ASS and KAK

performed the statistical analysis of the data. GGP, AS, RO, RA, CA, LB and MA have revised the manuscript.

Funding statement

Not applicable

Declaration of interest's statement

The authors declare no conflict of interest.

Additional information

No additional information is available for this paper.

Acknowledgements

We would like to thank the staff of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou and the Programme National de Lutte Contre le Paludisme for providing us with a pleasant working environment.

References:

1. Tizifa TA, Kabaghe AN, McCann RS, van den Berg H, Van Vugt M and Phiri KS. Prevention Efforts for Malaria. *Curr Trop Med Rep*. 2018; 5 (1): 41- 50.
2. WHO: World malaria report 2022. vol. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Geneva: World Health Organization; 2022.
3. Wanzira H, Katamba H and Rubahika D. « Use of Long-Lasting Insecticide-Treated Bed Nets in a Population with Universal Coverage Following a Mass Distribution Campaign in Uganda ». *Malar J*. 2016; 15 (1): 311.
4. WHO: World Malaria Report 2020. 20 Years of Global Progress & Challenges. World Health Organization; 2020.
5. WHO: World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
6. WHO: World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
7. Kpanou CD, Sagbohan HW, Padonou GG, Ossè R, Salako AS, Fassinou AJ et al. Susceptibility of *Anopheles gambiae* Ssensu Lato to Different Insecticide Classes and Mechanisms Involved in the South-North Transect of Benin. *J Entomol Zool Stud*. 2021; 9 (4): 437- 38.

8. 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 (3): 207- 16.
9. Djouaka, R, Irving H, Tukur Z and Wondji CS. Exploring Mechanisms of Multiple Insecticide Resistance in a Population of the Malaria Vector *Anopheles funestus* in Benin. *PLOS ONE.* 2011; 6 (11): e27760.
10. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabaté 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. *Parasitologia.* 1999; 41(1-3): 319-322.
11. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J and Collins FH. Identification of a Point Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene of Kenyan *Anopheles gambiae* Associated with Resistance to DDT and Pyrethroids. *Insect Mol Biol.* 2000; 9 (5): 491- 97.
12. Djogbénou L, Pasteur N, Akogbéto M, Weill M and Chandre F. Insecticide Resistance in the *Anopheles gambiae* Complex in Benin: A Nationwide Survey. *Med Vet Entomol.* 2011; 25 (3): 256- 67.
13. Khot AC, Bingham G, Field LM and Moores GD. A novel assay reveals the blockade of esterases by piperonyl butoxide. *Pest Manag Sci.* 2008; 64 (11): 1139- 42.
14. Ohba S, Ohashi K, Pujiyati E, Higa Y, Kawada H, Mito N et al. The Effect of Pyriproxyfen as a "Population Growth Regulator" against *Aedes albopictus* under Semi-Field Conditions. *PLOS ONE.* 2013; 8 (7): e67045.
15. Jaffer A, Protopopoff N, Mosha FW, Malone D, Rowland MW and Oxborough RM. Evaluating the Sterilizing Effect of Pyriproxyfen Treated Mosquito Nets against *Anopheles gambiae* at Different Blood-Feeding Intervals. *Acta Trop.* 2015; 150 (octobre): 131- 35.
16. Thomas CS, Crossthwaite AJ, Nauen R, Banba S, Cordova D, Earley F, et al. Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification - a tool for resistance management. *Pestic Biochem Physiol.* 2020; Volume 167, 104587, ISSN 0048-3575.
17. 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. *The Lancet*. 2018; 391 (10130): 1577- 88.
18. Mosha JF, Kulkarni MA, Lukole E, Matowo NS, Pitt C, Messenger LA et al. Effectiveness and Cost-Effectiveness against Malaria of Three Types of Dual-Active-Ingredient Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) Compared with Pyrethroid-Only LLINs in Tanzania: A Four-Arm, Cluster-Randomised Trial. *The Lancet*. 2022; 399 (10331): 1227- 41.
19. Accrombessi M, Cook J, Dangbenon E, Yovogan B, Akpovi H, Sovi A et al. Efficacy of Pyriproxyfen-Pyrethroid Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) and Chlorfenapyr-Pyrethroid LLINs Compared with Pyrethroid-Only LLINs for Malaria Control in Benin: A Cluster-Randomised, Superiority Trial. *The Lancet*. 2023; 401 (10375): 435- 46.
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. *Parasit Vectors*. 2018; 11 (1): 618.
21. Fassinou AJYH, Koukpo CZ, Ossè RA, Agossa FR, Assogba BS, Sidick A, et al. Genetic Structure of *Anopheles Gambiae* s.s Populations Following the Use of Insecticides on Several Consecutive Years in Southern Benin. *Tropical Medicine and Health*. 2019; 47 (1): 23.
22. Aïzoun N, Nonviho G, Aïzoun F and Assongba F. Current insecticide resistance status in malaria vector populations from Dogbo district in South-western Republic of Benin, West Africa. *World J Adv Res Rev*. 2022; 13 (2): 225- 31.
23. Coetzee M. Key to the females of Afrotropical *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Malar J*. 2020; 19 (1): 70.
24. WHO. Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme. Seconde édition. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 2017.
25. WHO. Manual for Monitoring Insecticide Resistance in Mosquito Vectors and Selecting Appropriate Interventions. Geneva: World Health Organization; 2022.

26. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z and Torre AD. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008; 7 (1): 163.
27. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL et al. Molecular Characterization of Pyrethroid Knockdown Resistance (Kdr) in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 1998; 7 (2): 179- 84.
28. Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardenal KGI and 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 (1376): 1695- 99.
29. WHO. Guidelines for Monitoring the Durability of Long-Lasting Insecticidal Mosquito Nets under Operational Conditions. Geneva: World Health Organization; 2011.
30. Lissenden N, Armistead JS, Gleave K, Irish SR, Martin JL, Messenger LA et al. Developing Consensus Standard Operating Procedures (SOPs) to Evaluate New Types of Insecticide-Treated Nets. *Insects.* 2021; 13 (1): 7.
31. Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Chabi J, Wat'senga F, Agossa FR et al. Determination of the Discriminating Concentration of Chlorfenapyr (Pyrrole) and *Anopheles gambiae* Sensu Lato Susceptibility Testing in Preparation for Distribution of Interceptor® G2 Insecticide-Treated Nets ». *Malar J.* 2021; 20 (1): 316.
32. Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moiroux N, Bio-Banganna S, Corbel V et al. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J.* 2010; 9 (1): 83.
33. Sagbohan HW, Kpanou CD, Sovi A, Osse R, Sidick A, Adoha C et al. Pyrethroid Resistance Intensity in *Anopheles gambiae* s.l. from Different Agricultural Production Zones in Benin, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2022; 22 (1): 39- 47.
34. N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Yates A and Rowland M. Chlorfenapyr: A Pyrrole Insecticide for the Control of Pyrethroid or DDT Resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *Acta Trop.* 2007; 102 (1): 69- 78.
35. Sagbohan HW, Kpanou CD, Osse R, Dagnon F, Padonou GG, Sominahouin AA et al. Intensity and mechanisms of deltamethrin and permethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations in southern Benin. *Parasites Vectors.* 2021; 14 (1): 202.

36. Taylor M and Feyereisen R. Molecular biology and evolution of resistance of toxicants. Mol Biol Evol. 1996; 13: 719–34.
37. Berge JB, Feyereisen R and Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1998; 353: 1701–5. 41.
38. Sovi A, Keita C, Sinaba Y, Dicko A, Traore I, Cisse MBM et al. *Anopheles gambiae* (s.l.) exhibit high intensity pyrethroid resistance throughout Southern and Central Mali (2016-2018): PBO or next generation LLINs may provide greater control. Parasites Vectors. 2020; 8; 13(1): 239.
39. Hien AS, Soma DD, Maiga S, Coulibaly D, Diabaté A, Belemvire A et al. Evidence Supporting Deployment of next Generation Insecticide Treated Nets in Burkina Faso: Bioassays with Either Chlorfenapyr or Piperonyl Butoxide Increase Mortality of Pyrethroid-Resistant *Anopheles gambiae*. Malar J. 2021; 20 (1): 406.
40. Oxborough RM, N’Guessan R, Jones R, Kitau J, Ngufor C, Malone D et al. The activity of the pyrrole insecticide chlorfenapyr in mosquito bioassay: towards a more rational testing and screening of non-neurotoxic insecticides for malaria vector control. Malar J. 2015; 14 (1): 124.
41. Kibondo UA, Odufuwa OG, Ngonyani SH, Mpelepele AB, Matanilla I, Ngonyani H et al. Influence of testing modality on bioefficacy for the evaluation of Interceptor® G2 mosquito nets to combat malaria mosquitoes in Tanzania. Parasites Vectors. 2022; 15 (1): 124.
42. Staedke SG, Gonahasa S, Dorsey G, Kanya MR, Maiteki-Sebuguzi C, Lynd A et al. Effect of Long-Lasting Insecticidal Nets with and without Piperonyl Butoxide on Malaria Indicators in Uganda (LLINEUP): A Pragmatic, Cluster-Randomised Trial Embedded in a National LLIN Distribution Campaign. Lancet. 2020; 395 (10232): 1292– 1303.

lists of tables and figures:

Table 1. Frequency of Kdr L1014F mutations in *An. gambiae* s.l. populations.

Table 2: Results of tunnel tests

Figure 1: Study area

Figure 2: Mortality rate of *An. gambiae* s.l. populations after 60 min exposure to alpha-cypermethrin (0.05%), permethrin (0.75%) and deltamethrin (0.05%) after 24 h observation.

Figure 3: Enzymatic activity of different populations of *An. gambiae* s.l.

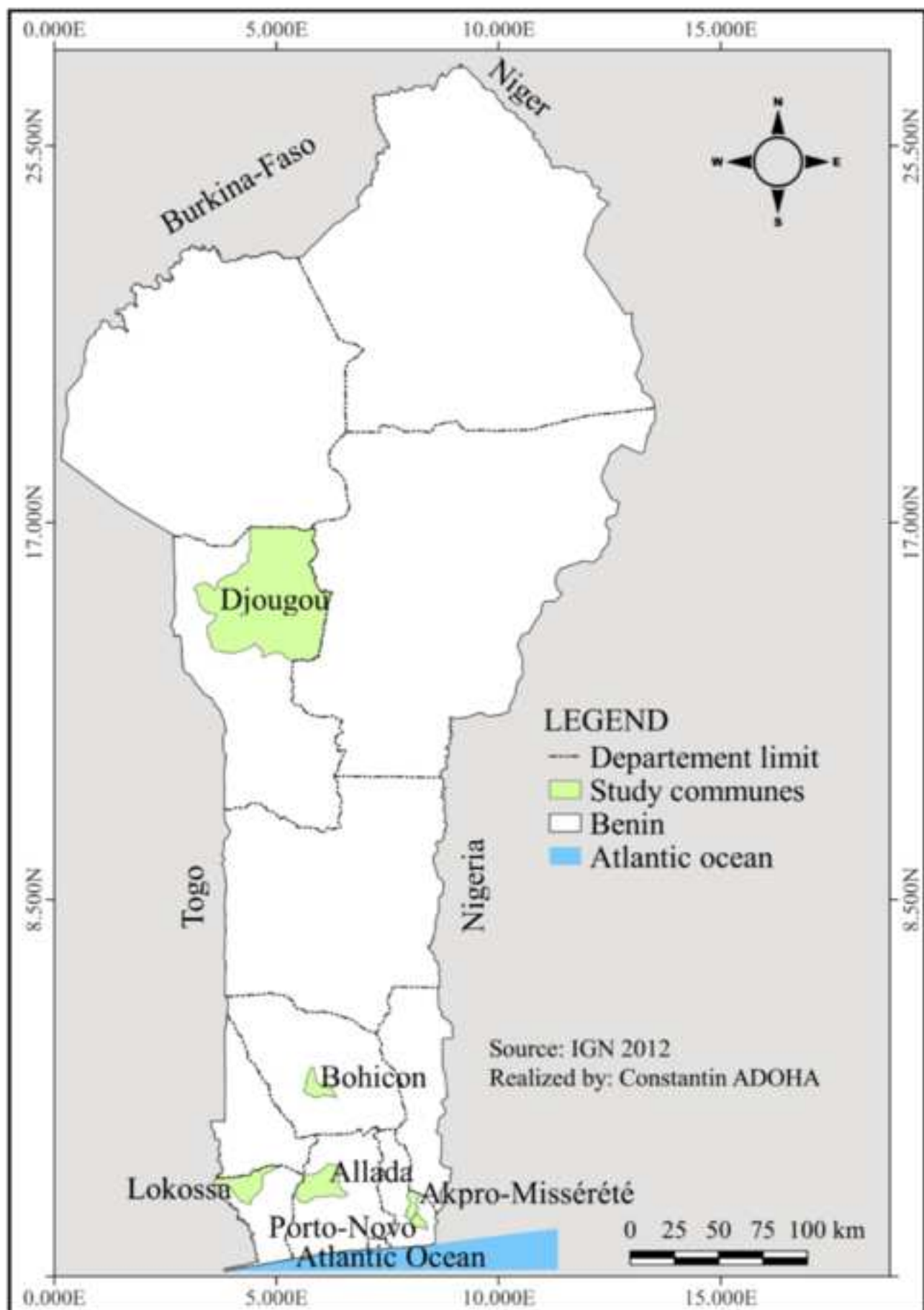
Figure 4: Sensitivity of *An. gambiae* s.l. populations to chlorfenapyr

Figure 5: Bioefficacy of new-generation nets

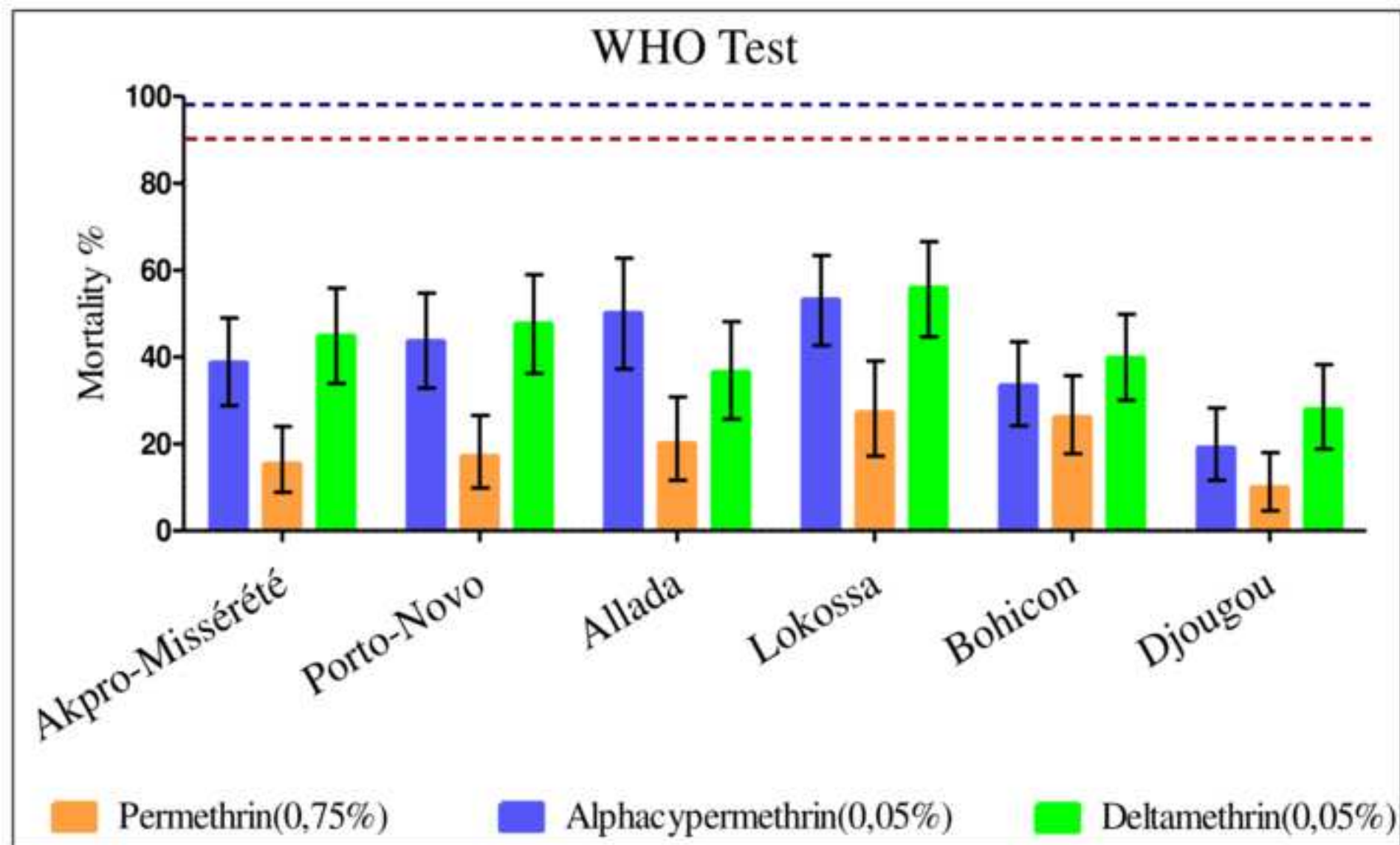
Figure 6: Mortality of *An. gambiae* s.l. populations after tunnel test

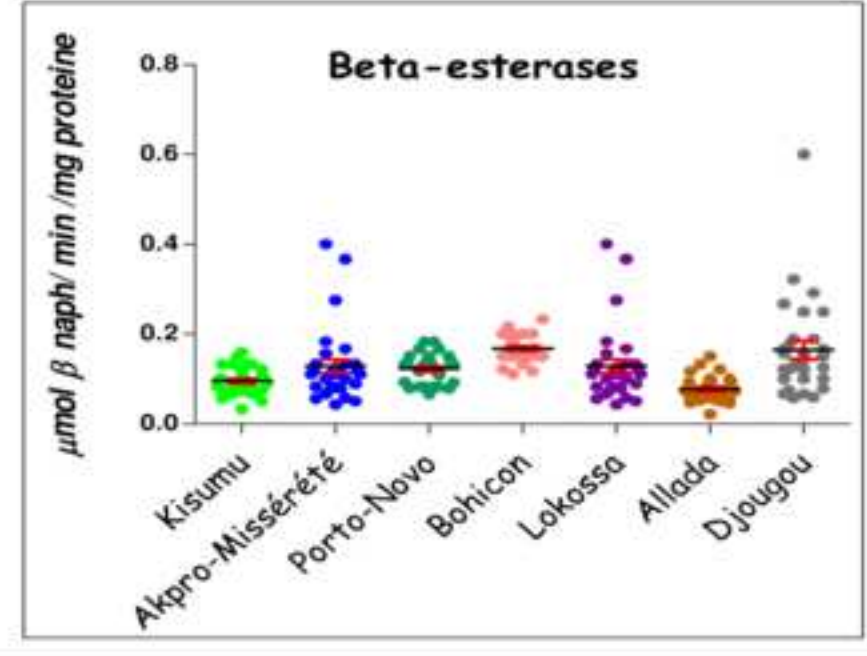
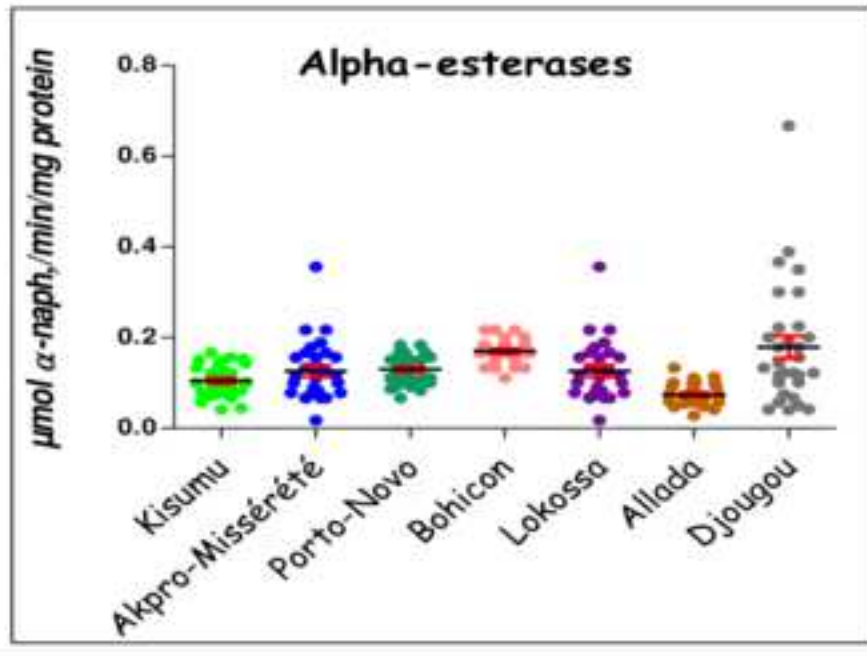
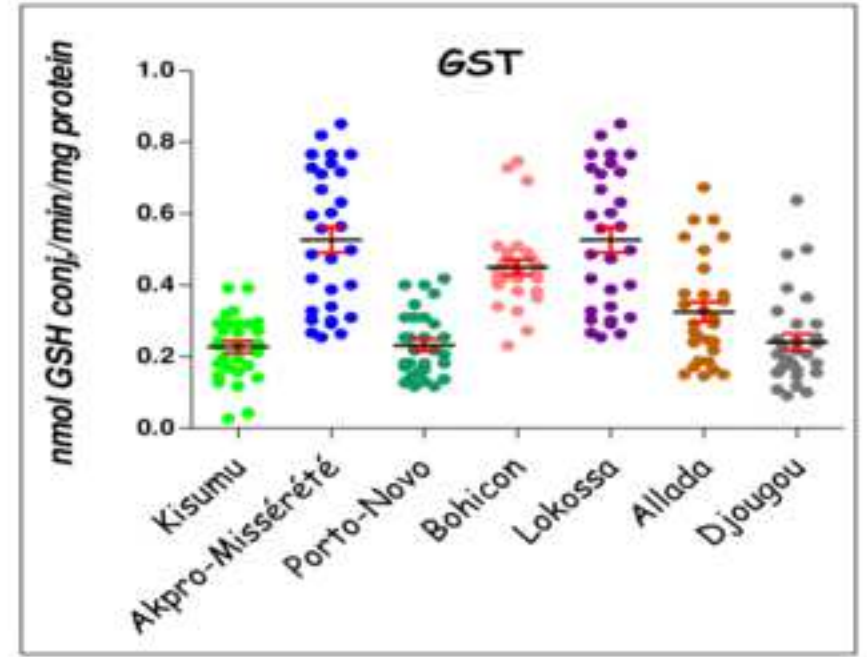
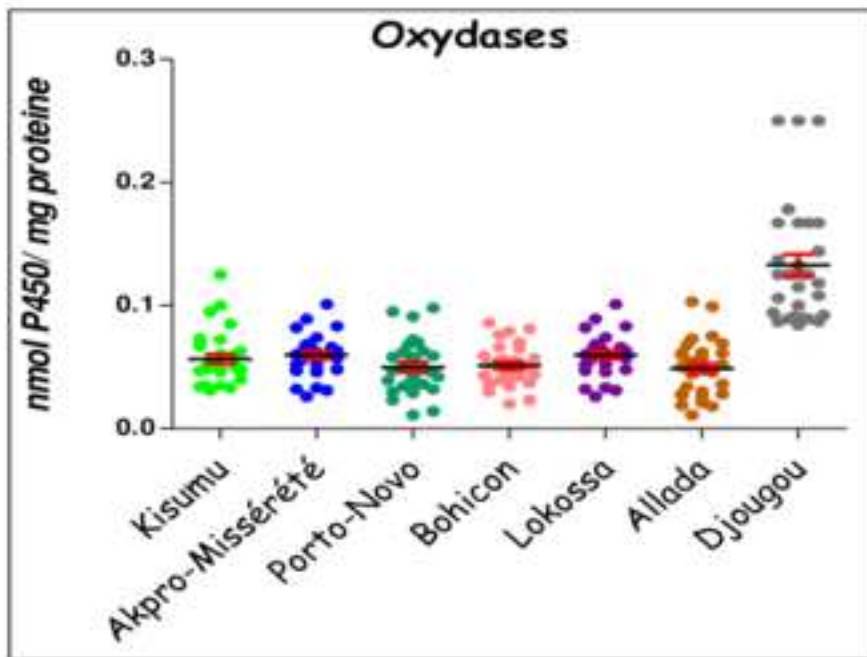
Study communes	Mosquito net	Number tested	% Immediate Mortality (CI)	% Entry rate (CI)	% Blood Feeding Rate (CI)	% Blood Feeding Inhibition
Porto-Novo	Untreated Net	100	1 [0.03-5.45]	53 [42.76-63.06]	55 [44.73-64.97]	60
	Interceptor®	100	11 [5.62-18.83]	33 [23.92-43.12]	22 [14.33-31.39]	
	Interceptor® G2	100	69 [58.97-77.87]	16 [9.43-24.68]	6 [2.23-12.6]	
Bohicon	Untreated Net	80	3.75 [0.78-10.57]	56.25 [44.7-67.32]	65 [53.52-75.33]	39,9
	Interceptor®	80	37.5 [26.92-49.04]	38.75 [28.06-50.3]	31.25 [21.35-42.59]	
	Interceptor® G2	80	92.5 [84.39-97.2]	16.25 [8.95-26.18]	6,25 [2.06-13.99]	
Allada	Untreated Net	80	2.5 [0.3-8.74]	60 [48.44-70.8]	55 [43.47-66.15]	48,86
	Interceptor®	80	35 [24.67-46.48]	26.25 [17.04-37.29]	22.5 [13.91-33.21]	
	Interceptor® G2	80	72.5 [61.38-81.9]	7.5 [2.8-15.61]	0 [0-4.51]	

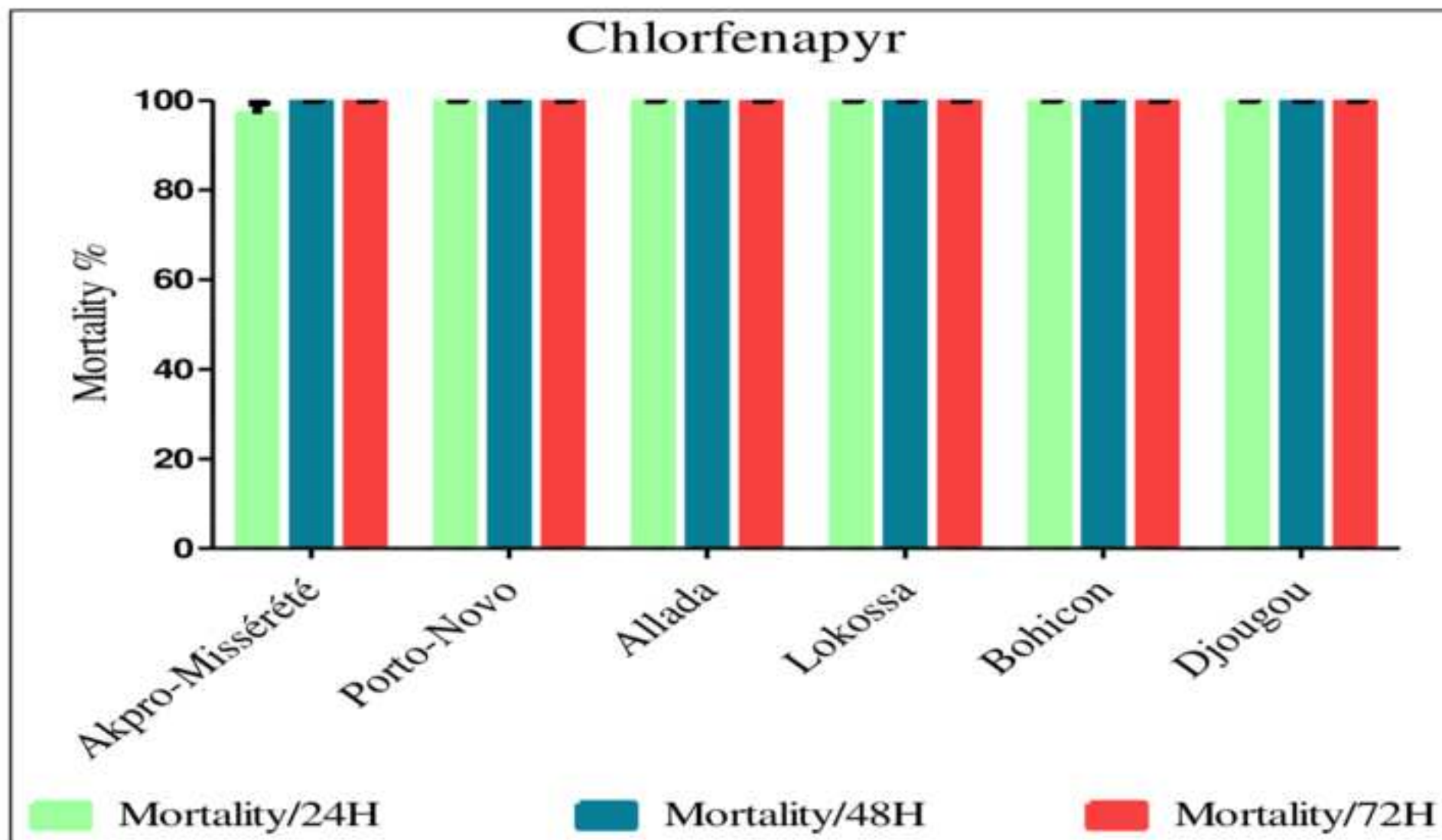
Districts/species	No. tested	Genotypes			Freq. 1014F (%)	IC
		1014F	1014F	1014L		
		1014F	1014L	1014L		
Akpro-Missérété	99	73	19	7	83	(77 - 88)
<i>An. coluzzii</i>	63	45	14	4	83	(75 - 89)
<i>An. gambiae</i>	36	28	5	3	85	(74 - 92)
Porto-Novo	50	39	7	4	85	(76 - 91)
<i>An. coluzzii</i>	50	39	7	4	85	(76 - 91)
Bohicon	50	35	15	0	85	(76-91)
<i>An. coluzzii</i>	26	19	7	0	87	(74-94)
<i>An. gambiae</i>	24	16	8	0	83	(70-93)
Lokossa	99	80	13	6	87	(82 - 92)
<i>An. coluzzii</i>	50	37	8	5	82	(73 - 89)
<i>An. gambiae</i>	49	43	5	1	93	(86 - 97)
Allada	50	40	9	1	89	(81 - 94)
<i>An. coluzzii</i>	12	8	4	0	83	(63 - 95)
<i>An. gambiae</i>	38	32	5	1	91	(82 - 96)
Djougou	49	38	7	4	85	(76 - 91)
<i>An. coluzzii</i>	7	7	0	0	100	(77-100)
<i>An. gambiae</i>	42	31	7	4	82	(72 - 90)
All area	397	305	70	22	86	(83-88)
<i>An. coluzzii</i>	208	155	40	13	84	(80-88)
<i>An. gambiae</i>	189	150	30	9	87	(84-90)

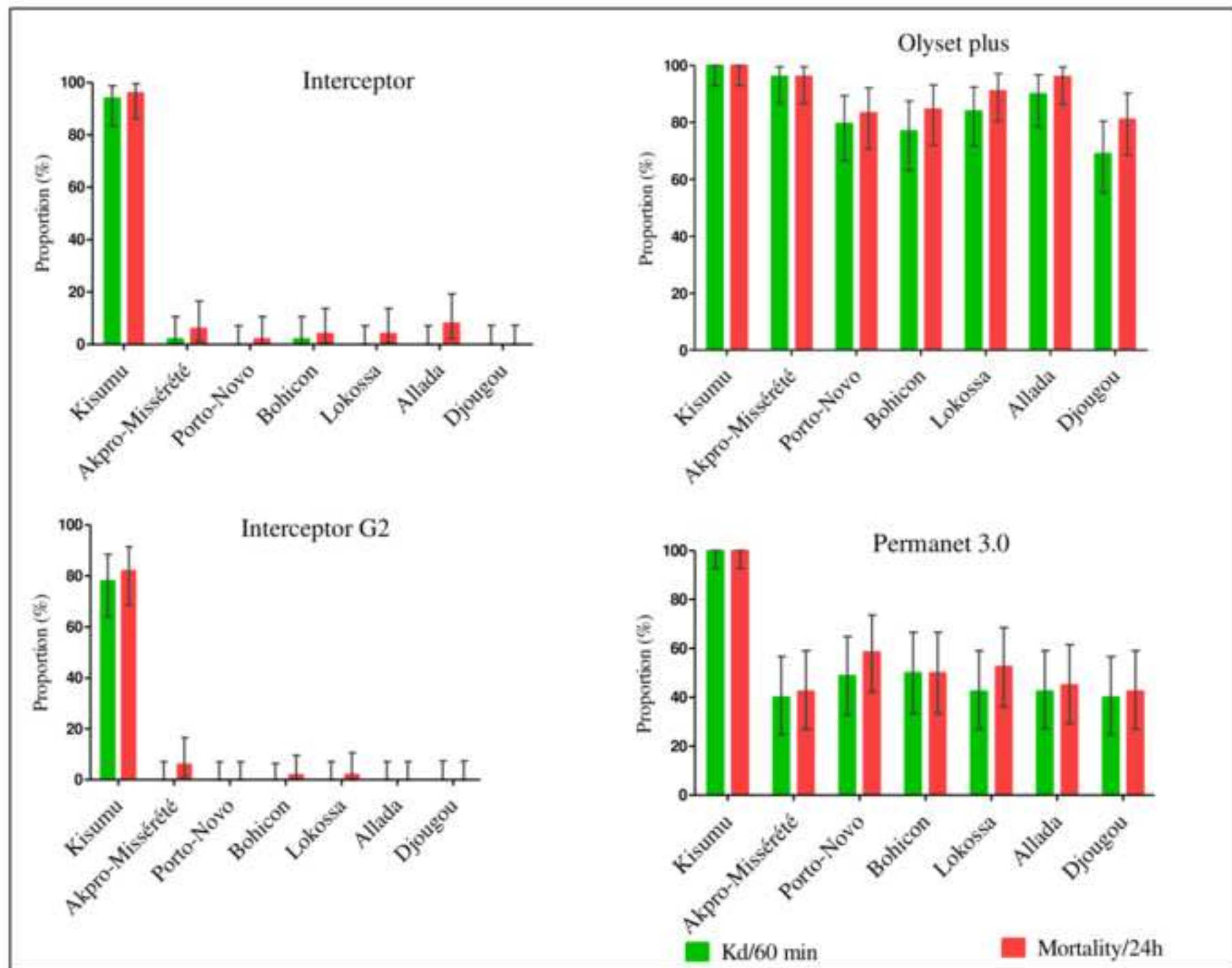


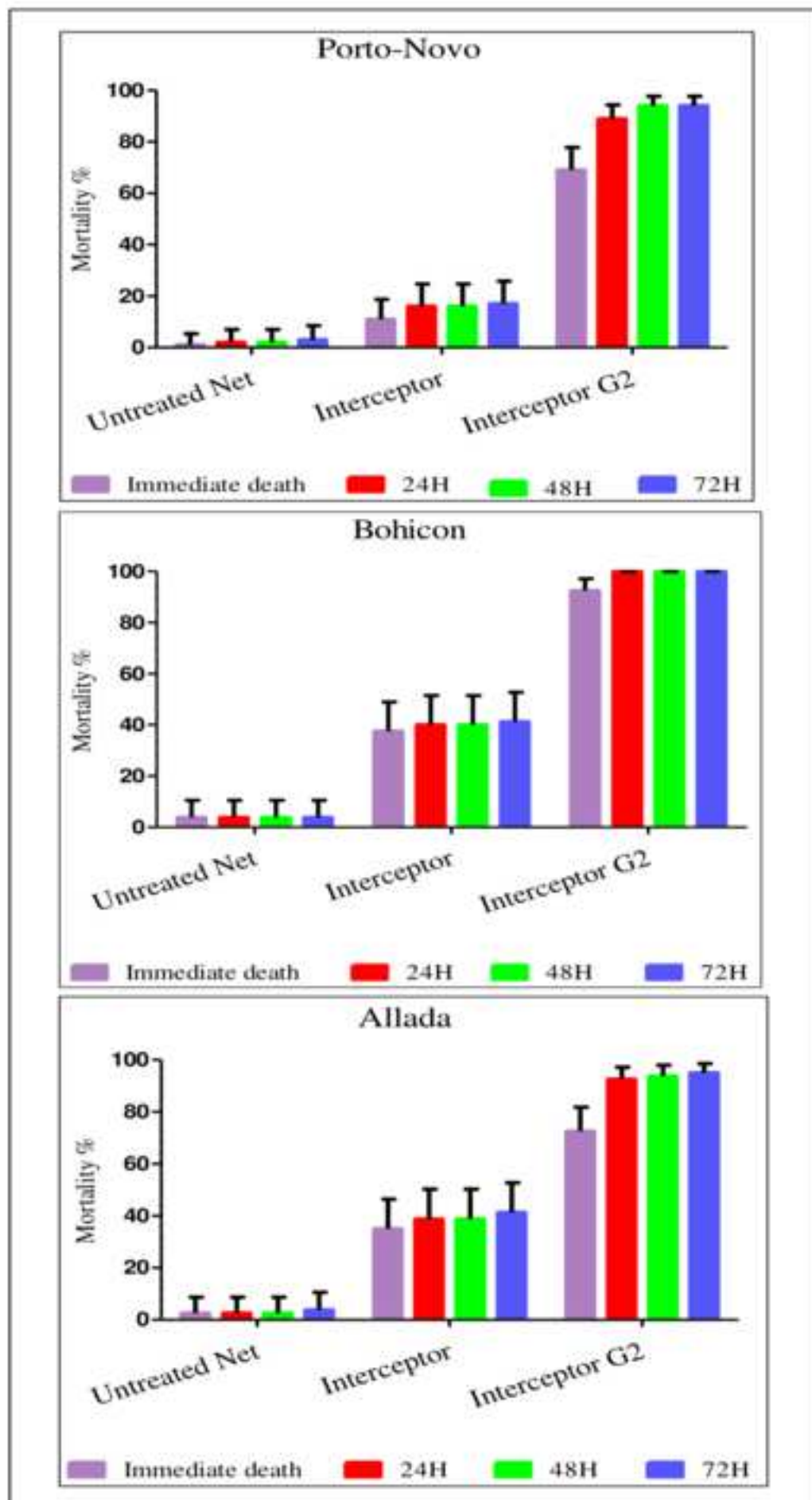
WHO Test











Declaration of interest’s statement

The authors declare no conflict of interest.



Vector-Borne Diseases, Surveillance, Prevention

Trophic preferences of *Anopheles coluzzii* (Diptera: Culicidae): what implications for malaria vector control in Benin?

Germain Gil Padonou^{1,2,3}, David Mahouton Zoungbédji^{1,2,3}, Arthur Sovi^{1,3,4}, Albert Sourou Salako^{1,*,5}, Alphonse Keller Konkon^{1,2,6}, Boulais Yovogan^{1,2,6}, Constantin Jesukèdè Adoha^{1,2,6}, Esdras Mahoutin Odjo^{1,2,6}, Razaki Osse^{1,5}, Haziz Sina^{2,6}, Renaud Govoétchan^{3,4,6}, Casimir Dossou Kpanou^{1,2,6}, Hermann W. Sagbohan^{1,2,6}, Lamine Baba-Moussa^{2,6}, Martin Akogbéto¹

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin, ²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin, ³Faculty of Agronomy, University of Parakou, Parakou, Benin, ⁴Faculty of Infectious and Tropical Diseases, The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK, ⁵École de gestion et d'exploitation des systèmes d'élevage, Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo, Porto-Novo, Bénin, ⁶Laboratory of Biology and Molecular Typing in Microbiology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, Abomey-Calavi, Benin *Corresponding author, mail: albertsourousalako@yahoo.fr

Subject Editor: Athanase Badolo

Received on 27 September 2022; revised on 14 January 2023; accepted on 3 February 2023

The main objective of the present study is to assess the preferences in terms of vertebrate hosts of *Anopheles coluzzii*, the main malaria vector in the pastoral area of Malanville, Benin, where rice cultivation and livestock are the main source of income for the populations. Adult mosquitoes were collected through pyrethrum spray catch, and human landing catch in two communes in Benin: Malanville, a pastoral area, and Porto-Novo, a nonpastoral area. Molecular species identification was performed through PCR within the *Anopheles gambiae* complex. Blood meal origin and *P. falciparum* sporozoite infection were determined using ELISA blood meal and circumsporozoite protein tests, respectively. Overall, 97% of females of *An. gambiae* s.l. were *An. coluzzii*, with biting behavior more pronounced outdoors in the pastoral area. In Malanville, the main vertebrate hosts on which females *An. coluzzii* blood fed were goats (44%), humans (24.29%), bovines (22%), and pigs (1.4%). Our results also showed that single-host blood meals (human: 24.29% or animal: 68%) were mostly observed compared to mixed blood meals (8.58%). The human biting rate (HBR) and *P. falciparum* sporozoite rate (SR) of *An. coluzzii* were 66.25 bites/man/night and 0.77%, respectively. However, in the nonpastoral zone (Porto-novo), 93.98% of samples were *An. coluzzii*. The latter blood-fed mostly (86.84%) on humans, with an estimated HBR of 21.53 b/m/n and SR of 5.81%. The present study revealed an opportunistic and zoophagic behavior of *An. coluzzii* in the Malanville area with an overall low mean SR.

Key words: trophic preference, *Anopheles coluzzii*, implication, vector control, malaria

Background

The biting behavior of mosquito vectors is an important factor in the epidemiology of the pathogens they transmit (Galvani and May 2005, Thongsripong et al. 2021). In the case of malaria, the human biting frequency of *Anopheles* vectors determines their probability of becoming infected with *Plasmodium*. This infection rate is a key indicator in evaluating the effectiveness of control tools (Killeen et al. 2000, Tirados et al. 2006).

In Africa, the main vectors of malaria include species (*An. coluzzii*, *Anopheles gambiae* s.s., and *Anopheles arabiensis*) of the *An. gambiae* complex, as well as the *An. funestus* group (Sinka et al. 2012, Akogbéto et al. 2018). Overall, *An. gambiae* s.s. and *An. coluzzii* are recognized as species that usually rest indoors (endophily), where they take their blood meal (endophagy) on humans (anthropophagy) (Akogbéto et al. 2018). The frequency of their access to human hosts is indicated by the relative proportion of human-fed specimens in a sample

of blood-fed mosquitoes. This indicator is called the human blood index (HBI). In some West African countries such as Senegal and Côte d'Ivoire, *An. gambiae* s.l. is anthropophilic with a rate of about 98% (Faye et al. 1995, Dossou-yovo 1998). Similarly, in southern and northern Benin, the same species is essentially anthropophilic and endophilic (Padonou et al. 2011, Akogbéto et al. 2018). This behavior may vary depending on the availability of human or animal host. According to some studies, the presence of animals increased the likelihood for humans to be infected by malaria Seyoum et al. 2002, Zeru et al. 2020. Indeed, they maintain that sleeping near livestock at night increases the risk of humans being bitten by *Anopheles* mosquitoes that originally are zoophilic, which could increase the transmission of malaria (Bogh et al. 2001). At the opposite, other studies indicate that animals act as a screen by being bitten instead of the human hosts (Hasyim et al. 2018, Mburu et al. 2021). Thus, in the prevention of transmission, domestic animals living in the vicinity of humans can attract *Anopheles* vectors, thus reducing the frequency of man-vector contact, and then the malaria transmission (Killeen et al. 2001, Muriu et al. 2008). Moreover, according to Killeen et al. (2014), the occurrence of bites on several vertebrate hosts can allow mosquito vectors to circumvent the most commonly used control interventions (Long-Lasting Insecticide-Treated Nets: LLINs, and Indoor Residual Insecticide Spraying: IRS). Indeed, as soon as the mosquitoes manage to take their blood meal on the animals outside the houses, they are no longer obligated to bite people indoors. Thus, they can easily circumvent the effect of LLINs and IRS, which are deployed inside houses for the control of endophilic and anthropophilic *Anopheles*.

Like many African countries, malaria remains a major public health problem in Benin, with an estimated death rate of 1.3%, despite the great efforts made (Ministère de la Santé du Bénin 2020). The Alibori region, to which the commune of Malanville belongs, remains one of the departments of northern Benin where malaria death is generally low (1.1%) (Ministère de la Santé du Bénin 2020). According to recent studies, *An. coluzzii*, which is the predominant species in the area, contributes the most to malaria transmission (Gnanguenon et al. 2014, Akogbéto et al. 2018). In addition, a relatively low *Plasmodium falciparum* sporozoite rate was observed in this vector in Malanville (Gnanguenon et al. 2014) where close livestock (cattle and goats) is an intensely practiced activity (Karim et al. 2013). It is in this context that the present study, carried out in the northern commune of Malanville, aims to evaluate the blood meal origin, and its implication in the control of *P. falciparum* transmission in *An. coluzzii*. The indicators measured in Malanville (pastoral area) were also simultaneously collected in Porto-Novo, a commune in southern Benin (Padonou et al. 2012) where livestock farming is not the main activity, and *An. coluzzii* is the predominant species. The results obtained in the two surveyed communes will be used to better guide vector control strategies in agropastoral areas.

Materials and Methods

Study Site

This study was carried out in May (dry month) and October (rainy month) 2019 on four sites, namely: Monkassa and Bodjècali located in the commune of Malanville in the far north of the Benin Republic, then Tokpota and Djassin located in the commune of Porto-Novo in the south of the country (Fig. 1).

The commune of Malanville is an area of dry savannah located between 11°51'48 north latitude and 3°23'3.29 east longitude. It is characterized by a long dry season covering the period from December to June, and a rainy season covering the rest of the year. From November to January, the temperature generally varies

between 16°C and 25°C, and the prevailing wind blowing there is the harmattan (Adam and Boko 1993). Its population was estimated at 168,641 (RGPH4 Benin 2015). Livestock was the main activity in Malanville, and Fulani accounted for about 62.5% of the population of the Alibori department to which this commune belongs to (Karim et al. 2013, Toko 2016). In this department, the Malanville commune is the only one where goat farming was much more developed. During the rainy season, some put the animals on a stake, which could be fixed ($52 \pm 5\%$) or mobile ($18 \pm 3\%$), while others kept them in a semi-clave ($23 \pm 4\%$) (Challaton et al. 2022). Of note, a few farmers (less 1%) occasionally led their animals to pasture. However, small ruminants ('ovine' and 'caprine') are often kept inside human dwellings to avoid overnight theft (Challaton et al. 2022) (Fig. 2). The proximity of the Niger River has enabled the establishment of an efficient irrigation system used for rice cultivation both in the dry and rainy seasons. This permanent presence of water promotes the proliferation of larvae of mosquito, vector of malaria.

The commune of Porto-Novo is located in the region of Ouémé, south-east of Benin (Fig. 1). The population of this commune was estimated at 264,320 inhabitants (RGPH4 Benin 2015). The commune has a sub-equatorial climate with an average monthly temperature varying between 21.9°C and 32.8°C. The year has four seasons which includes, two dry seasons (mid-November to mid-March, and mid-July to mid-September) and two rainy seasons (mid-March to mid-July and mid-September to mid-November). An average rainfall of 1200 mm was recorded in Porto-Novo in recent years (Guidibi and Gandonou 2006). Malaria incidence is stable in this department that is irrigated by the Ouémé River, Nokoué Lake, and the Porto-Novo lagoon, with an estimated death rate of 1.9% compared to 1.3% nationwide (Ministère de la Santé du Bénin 2020). Unlike Malanville, livestock farming is not a main activity in Porto-Novo.

Long-lasting insecticide-treated mosquito nets (LLINs) distributed every 3 years through mass distribution campaigns are the main tool used to prevent human-vector contact in the two surveyed districts. The percentage of households with at least one LLIN was 87.1% in the department of Alibori (Malanville) and 78% in the department of Ouémé (Porto-Novo) (Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique du Bénin (INSAE) 2019).

Mosquito Collection

Morning Pyrethrum Spray Catches (PSCs) and human landing catches (HLCs) were used for sampling adult mosquitoes. In each village, HLCs were carried out from 9 PM to 5 AM in 2 houses, with 1 collector indoors and a second one outdoors. This equals to a total of 4 collectors/site/night and 8 collectors/site/month, since two collection nights were organized each month. The collectors were rotated between the different houses to reduce the biases related to their ability to collect mosquitoes and their level of individual attractiveness. This collection method allowed evaluating the behavior (endophagy and exophagy) as well as the biting rate of the *Anopheles* vectors.

In each village, 25 houses were surveyed for the morning collection of mosquitoes resting indoors, using PSCs. This collection was carried out by spraying Rambo aerosol cans composed of pyrethroids (0.25% transfluthrin and 0.20% permethrin). This technique allowed collection of female mosquitoes in different physiological states (unfed, fed, semi-gravid, and gravid). In addition, the average density of mosquito vector per house was assessed.

Mosquito Identification

After each collection, the mosquitoes were morphologically identified using a binocular loupe, and the identification keys of Gillies and

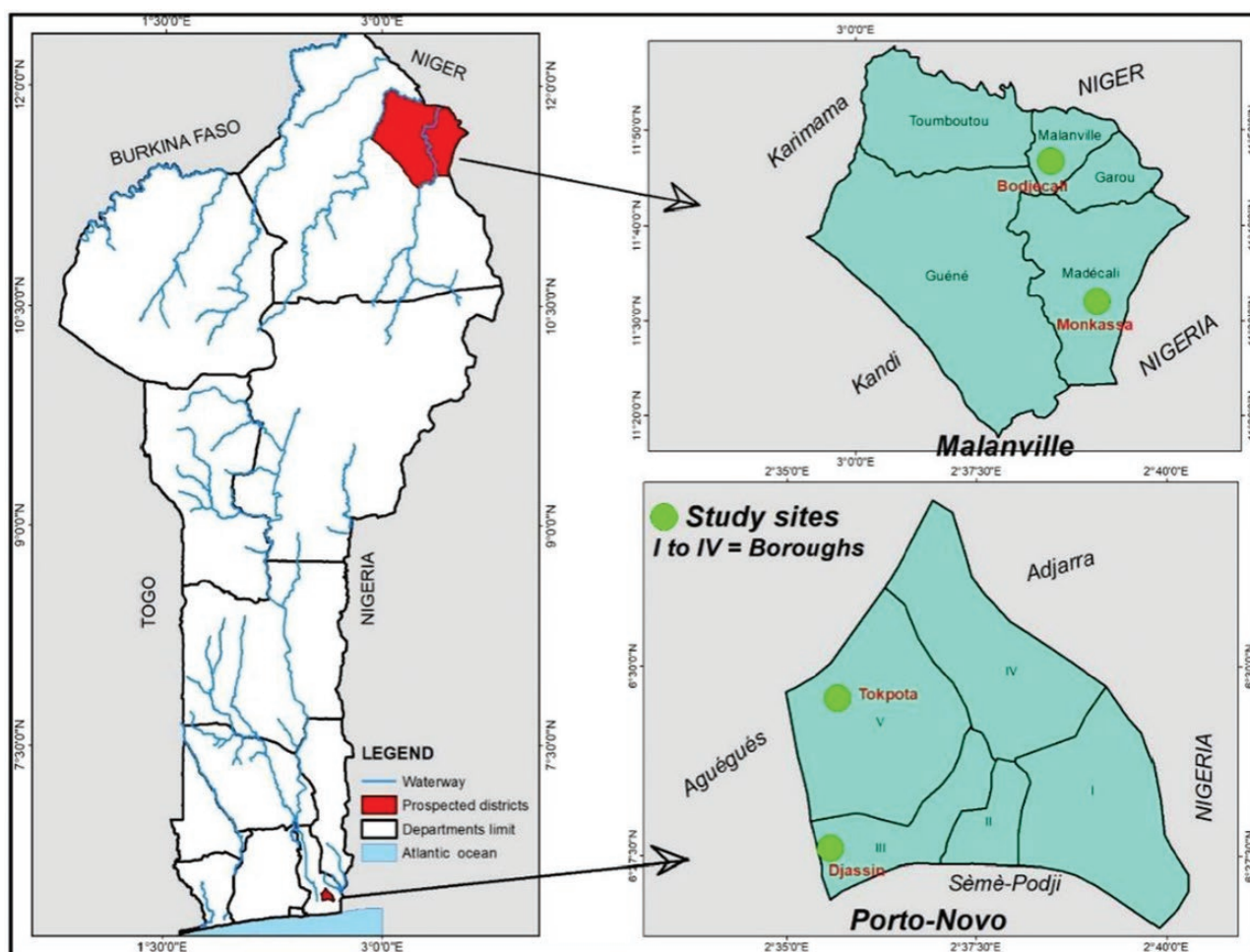


Fig. 1. Map showing the study area.



Fig. 2. Breeding of cattle and goats in the villages of Monkassa in Malanville (CREC, October 2019).

Meillon (1968), and Gillies and Coetzee (1987). Females *An. gambiae* s.l. collected by PSCs were preserved in labeled eppendorf tubes containing silica gel. This preservation was made according to the location of collection (indoors and outdoors) and the physiological state of the mosquitoes.

Laboratory Processing

A sub-sample of blood fed females *An. gambiae* s.l. which were selected at random was used. Thus, the head-thorax of each mosquito was used to look for the *P. falciparum* sporozoite infection using the ELISA CSP test performed according to the protocol

described by Wirtz et al. (1987). In addition, the blood-soaked abdomen of each mosquito was used to determine the origin of the blood meal using the ELISA blood meal test described by the protocol of Beier et al. (1988). This technique involves looking for the presence of antibodies specific to humans, bovine, goat, and pig in the blood meal of mosquitoes.

The legs and wings of the same specimens of *An. gambiae* s.l. were analyzed by PCR according to the protocol of Santolamazza et al. (2008). This technique allowed the identification of the molecular species present within the *An. gambiae* complex.

Measured Entomological Parameters

The entomological parameters measured in this study are as follows:

- Indoor and Outdoor human biting rate (number of *An. gambiae* s.l. mosquitoes collected indoor and outdoor divided by the number of man night);
- Proportion of each species of the *An. gambiae* complex;
- Sporozoite rate (SR) (number of mosquitoes found positive for *Plasmodium falciparum* sporozoite divided by the total number tested $\times 100$);
- Mean indoor vector density (total number of *An. gambiae* s.l. collected indoors by PSC divided by the total number of surveyed houses);
- Blood feeding rate (number of blood-fed and half-gravid mosquito vector divided by the total number collected by PSC)
- Anthropophagy rate (total number of vector mosquitoes having taken their blood meal on humans/divided by the total number of blood-fed ones) $\times 100$;
- Zoophagy rate (total number of mosquito vector having taken their blood meal on animal/divided by the total number blood fed) $\times 100$.

Data Analysis

The confidence intervals of the mean density and the human biting rate of *An. gambiae* s.l. were calculated using the Poisson method (Rothman 2012). The Chi-2 test for comparing proportions was used to compare the proportions of species of the *An. gambiae* complex, the SR, the rates of anthropophagy and blood-feeding between the pastoral area and the nonpastoral one.

These different parameters were collected concomitantly between the pastoral zone of Malanville (Bodjècali and Monkassa) and the nonpastoral zone of Porto-Novo (Djassin and Tokpota).

Data were analyzed with R statistics software, version 2.8 (R Core Team 2018).

Ethics

The protocol of the present study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee for Health Research of the CREC. At the four study villages, the consents of mosquito collectors, household and village heads were obtained before the activity was held. Collectors were selected in each village due to the fact that their exposure to mosquito bites provides them with some immunity. These collectors were previously trained to collect mosquitoes before they receive potentially infected bites. Collectors were vaccinated against yellow fever and regularly monitored. In the event of confirmed malaria, they were immediately treated by the team medical doctor.

Results

Mosquito Species Composition

A total of 4,887 mosquitoes belonging to three genera (*Anopheles*, *Culex* and *Mansonia*) were collected through both HLC and PSC. Overall, *An. gambiae* s.l. was the most abundant mosquito species (82.13%; 4,014/4,887) in the two study communes. This predominance of *An. gambiae* s.l. was much more pronounced in Malanville, a pastoral and rice-growing area (98.05%; 95% CI: 97.49–98.47; 3,260/3,325) compared to Porto-Novo, a nonpastoral area (48.27%; 95% CI: 45.76–50.78; 754/1,562) (Table 1). Only 18 specimens of *An. ziemanni* (0.37%; 95% CI: 0.22–0.59), 11 specimens of *An. pharoensis* (0.23%; 95% CI: 0.11–0.41), and 2 specimens of *An. nili* (0.04%; 95% CI: 0.007–0.016) were collected (Table 1).

Cx. quinquefasciatus was more prevalent in Porto-Novo (40.46%) than in Malanville (0.93%). Other species of *Culex* species encountered at very low proportions include *Cx. nebulosus* and *Cx. decens* in the two districts. Similarly, *Aedes aegypti* and *Mansonia africana* accounted for 2.18% and 6.53% in Porto-Novo, and 0.18% and 0.27% in Malanville (Table 1).

Overall, molecular species identification performed within the *An. gambiae* complex revealed that *An. coluzzii* (97.45%; 2,105/2,160) was the predominant species followed by, *An. gambiae* (2.45%; 53/2,160), and *An. arabiensis* (0.093%; 2/2,160) ($P < 0.0001$; $\chi^2 = 5,997.2$; $df = 2$) (Table 2). The same trend was observed in both Malanville and Porto-Novo (Table 2).

Table 1. Mosquito species composition in surveyed areas

Mosquito	Malanville	Porto-Novo	Total
Species	N (%; 95% CI)	N (%; 95% CI)	N (%; 95% CI)
<i>An. gambiae</i> s.l.	3,260 (98.05; 97.49–98.47)	754 (48.27; 45.76–50.78)	4,014 (82.14%; 81.02–83.19)
<i>An. nili</i>	2 (0.06; 0.01–0.024)	NA	2 (0.04; 0.007–0.016)
<i>An. pharoensis</i>	7 (0.21; 0.09–0.4)	4 (0.26; 0.08–0.7)	11 (0.23; 0.11–0.41)
<i>An. ziemanni</i>	3 (0.09; 0.02–0.3)	15 (0.96; 0.55–1.6)	18 (0.37; 0.22–0.59)
<i>Aedes aegypti</i>	6 (0.18; 0.07–0.4)	34 (2.18; 1.53–3.06)	40 (0.82; 0.59–1.1)
<i>Aedes gr. palpalis</i>	2 (0.06; 0.01–0.024)	NA	2 (0.04; 0.007–0.016)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	31 (0.93; 0.6–1.3)	632 (40.46; 38.02–42.94)	663 (13.57; 12.62–14.56)
<i>Culex nebulosus</i>	5 (0.15; 0.05–0.37)	16 (1.02; 0.6–1.7)	21 (0.43; 0.27–0.66)
<i>Culex annulirostris</i>	NA	5 (0.32; 0.11–0.79)	5 (0.10; 0.037–0.25)
<i>Mansonia africana</i>	9 (0.27; 0.13–0.53)	102 (6.53; 5.37–7.89)	111 (2.27%; 1.88–2.73)
Total	3,325	1,562	4,887

NA: Not Applicable.

Table 2. Proportion of molecular species within the *An. gambiae* complex in the two surveyed communes

	Malanville			Porto-Novo			All sites		
	HLC	PSC	Total	HLC	PSC	Total	HLC	PSC	Grand Total
N of <i>An. gambiae</i> s.l. tested	1,083	612	1,695	400	65	465	1,483	677	2,160
N of <i>An. coluzzii</i>	1,062	606	1,668	375	62	437	1,437	668	2,105
N of <i>An. gambiae</i>	19	6	25	25	3	28	44	9	53
N of <i>An. arabiensis</i>	2	0	2	0	0	0	2	0	2
Proportion of <i>An. coluzzii</i> (%)	98.06	99.02	98.41	93.75	95.38	93.98	96.90	98.67	97.45
P-value (Khi2)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

N: number; HLC: Human Landing Catche; PSC: Pyrethrum Spray Catche.

The two sibling species were present during both the dry (May) and the rainy (October) month in the two study communes (Table 3). Moreover, regardless of the month (rainy or dry), *An. coluzzii* remained predominant in the two study communes (Table 3).

Indoor and outdoor biting behavior of *An. gambiae* s.l.

In Malanville (pastoral area), the mean biting rate during the dry month was 43 bites/man/night (b/m/n) indoors against 38.75 b/m/n outdoors (RR= 1.10; $P = 0.196$). During the rainy month, this rate was significantly higher outdoors (102.5 b/m/n) than indoors (80.75 b/m/n) (RR= 1.26; $P < 0.001$) (Table 4). Combining data from the two study months shows a much more pronounced biting behavior outdoors.

In the nonpastoral area (Porto-Novo), the biting rates of *An. coluzzii* were similar indoors and outdoors during both the dry month (4.5 b/m/n at the indoors versus 5.75 b/m/n outdoors) and the rainy month (40.88 b/m/n indoors versus 35 b/m/n outdoors) ($P > 0.05$) (Table 4). The same trend was obtained after combining data of the two study months ($P = 0.054$).

Resting Behavior and Blood Feeding Rate of *An. coluzzii*

Table 5 presents the mean density of *An. coluzzii*, as well as its blood feeding rate in the two study communes.

Mean densities of 12.12 (95% CI: 09.03–16.51) and 1.24 (95% CI: 0.84–1.83) *An. coluzzii* per room were recorded respectively in Malanville and Porto-Novo (Table 5).

Overall, the blood feeding rate of *An. coluzzii* was 85.97% (95% CI: 82.89–88.58) in Malanville, against 64.52% (95% CI: 51.26–75.95) in Porto-Novo (Table 5).

Blood-meal Hosts

Of 420 blood-fed specimens of *An. coluzzii*, the blood meal origin was successfully identified in 388. Of the 350 *An. coluzzii* whose blood meal origin was identified in Malanville (pastoral zone), 44% (95% CI: 38.75–49.38; $n = 154$) took their blood meal on goat, 24.29% (95% CI: 19.95–29.19; $n = 85$) on human, 22% (95% CI: 17.84–26.78; $n = 77$) on bovine, and 1.1% (95% CI: 0.36–3.1; $n = 4$) on pigs. Blood meals of mixed origin have also been observed. Thus, 0.86% (95% CI: 0.22–2.7; $n = 3$), 3.43% (95% CI: 1.86–6.07; $n = 12$), 4.29% (95% CI: 2.5–7.12; $n = 15$) of the mosquito specimens analyzed took their blood meal on bovine-goat, bovine-human, and human-goat, respectively (Table 6).

In Porto-novo (non agro-pastoral area), of the 38 female mosquitoes collected, 86.84% (95% CI: 71.11–95.05; $n = 33$) took their blood meal on humans.

The anthropophilic index of *An. coluzzii* is very high in Porto-Novo (89.47%, 95% CI: 74.25–96.57; $n = 34$). In Malanville (pastoral zone), this index was 32% (95% CI: 27.19–37.20; $n = 112$) (Table 6).

Table 3. Proportion of *An. coluzzii* and *An. gambiae* in the dry and rainy months

Localities	Molecular species	Dry month	Rainy month
		(May 2019)	(October 2019)
Malanville	<i>An. coluzzii</i>	404	1,264
	<i>An. gambiae</i>	2	23
	% <i>An. coluzzii</i>	99.51	98.21
	P-value (Khi2)	<0.001	
Porto-Novo	<i>An. coluzzii</i>	92	345
	<i>An. gambiae</i>	7	21
	% <i>An. coluzzii</i>	92.93	94.26
	P-value (Khi2)	<0.001	<0.001

Sporozoite and Entomological Inoculation Rates

A total of 2,160 head-thoraxes of *An. coluzzii* were analyzed through ELISA CSP in the two study communes. Thus, out of the 1,695 specimens tested in Malanville, 13 were found positive, which is equivalent to a SR of 0.77% (95% CI: 0.42–1.34; $n = 1,695$) in Malanville. In Porto-Novo (nonpastoral area), out of 465 vector mosquito specimens, 27 were positive, which corresponds to a SR of 5.81% (95% CI: 3.93–8.44; $n = 465$).

As for the EIR, it was 37.5 infected bites/man/month (95% CI: 36.70–38.32) in Porto-Novo and 15.28 ib/m/m (95% CI: 15.02–15.46) in Malanville (Table 7).

Discussion

This study was conducted to generate data that can help improving vector control strategies that take into account the behavior of vectors and people living in pastoral areas. For this, the biting behavior and trophic preference of female *An. coluzzii* were studied in an agropastoral area (Malanville), and a nonagropastoral one (Porto-Novo) of Benin. The results of this study showed that the mosquito fauna of the two communes is dominated by *An. gambiae* s.l., the main malaria vector complex in Benin (Akogbeto et al. 1992, Padonou et al. 2012, Gnanguenon et al. 2014). The females of *An. gambiae* s.l. sampled by the two collection methods (PSC & HLC) were mainly (more than 97%) composed of *An. coluzzii*. This result is similar to that obtained by Akogbeto et al. (2018) in Kandi and Gogounou, two sites close to Malanville. This very high proportion of *An. coluzzii* in Malanville could be due to the high aridity of the commune which is close to Sahel, and the presence of permanent and semi-permanent larval breeding sites created by rice cultivation. Indeed, Diabaté et al. (2008) and, Lehmann and Diabate (2008) showed that these larval breeding sites are much more favorable to the development of larvae of *An. coluzzii*. Out of

Table 4. Indoor and outdoor human biting rates (HBR) in *An. gambiae* s.l. in Malanville and Porto-Novo

Districts	Localities Position	Dry month (May 2019)		Rainy month (October 2019)	
		Int	Ext	Int	Ext
Malanville	Monkassa	179	164	355	457
	Bodjècali	165	146	291	363
	Total	344	310	646	820
	HBR/night	43.00	38.75	80.75	102.50
	P-value (Wald)	0.196		<0.001	
	RR [CI-95%]	1.10 [0.94–1.29]		0.78 [0.71–0.87]	
Porto-Novo	Tokpota	24	17	152	143
	Djassin	12	29	175	137
	Total	36	46	327	280
	HBR/night	4.50	5.75	40.88	35.00
	P-value (Wald)	0.320		0.061	
	RR [CI-95%]	0.78 [0.49–1.23]		1.16 [0.99–1.37]	

HBR: Human Biting Rate; RR: Rate Ratio; CI: Confidence Interval; p-Wald: P-value of the significance of the ratio of Human Biting Rate between indoors and outdoors.

Table 5. Mean density and blood feeding rate of *An. coluzzii* in Malanville and Porto-novo

Communes	Villages	Nb of room	Nb of <i>An. coluzzii</i> collected	Density/Room [95% CI]	Nb (fed + half gravid)	Blood feeding rate % [95% CI]
Malanville(Pastoral area)	Monkassa	25	413	16.52 [11.03–25.82]	371	89.83 [86.40–92.49]
	Bodjècali	25	193	7.72 [05.07–12.22]	150	77.72 [71.06–83.24]
	Total	50	606	12.12 [09.03–16.51]	521	85.97 [82.89–88.58]
Porto-Novo (nonpastoral area)	Tokpota	25	40	1.6 [0.94–2.75]	24	60.00 [43.39–74.71]
	Djassin	25	22	0.88 [0.47–1.62]	16	72.73 [49.56–88.38]
	Total	50	62	1.24 [0.84–1.83]	40	64.52 [51.26–75.95]

the 2,160 mosquito specimens analyzed through PCR in Malanville, only 2 were *An. arabiensis*. According to Djogbénou et al. (2010) and Gnanguenon et al. (2014), *An. arabiensis* would have moved from the north to the center of Benin because of the intense drought and anthropic actions (destruction of forests for agriculture and timber harvesting, cattle transhumance, and urbanization). Indeed, in 1992s, a report of the presence of *An. arabiensis* in sympatry with *An. gambiae* s.s. in northern Benin was made by Akogbeto (1992). However, data collected more than 18 years later, by Aikpon et al. (2013) and Akogbeto et al. (2018) revealed its disappearance in the same region.

The biting behavior of *An. coluzzii* in Malanville (pastoral zone) was significantly more pronounced outdoors, whereas in Porto-Novo (nonpastoral zone), it was similar outdoors and indoors. This suggests either an abundance of zoophilic and exophagic vectors in Malanville, or high coverage of Insecticide-Treated Nets (ITNs), the main malaria vector control tool used in the area that played an important role. Indeed, the coverage of yolkool LLINs distributed during the 2017 campaign was estimated at 87.1% in the Alibori department (Malanville) compared to 78% in the Ouémé one (Porto-Novo), showing that the target of 80% coverage of LLINs required by the World Health Organization (WHO) in Malanville could have been exceeded (EDSB-V Bénin 2019). Moreover, the physical barrier and the excito-repellent effect of pyrethroid insecticides incorporated in LLINs prevent mosquitoes from taking blood meals and repel them outdoors (Gimnig et al. 2003). Malaria vectors that fail to blood-fed on humans indoors are forced to seek out other readily available animal hosts. Indeed, previous studies have reported a poor ability of malaria vectors to take their blood meal indoors,

and a greater likelihood of leaving houses with high mosquito net coverage (Mathenge et al. 2001, Soleimani-Ahmadi et al. 2012). Originally, *An. coluzzii* was known as a highly anthropophagous and endophagous species (Awolola et al. 2003, Wanji et al. 2003, Seyoum et al. 2012). For that, the exophagy of this species observed in Malanville (pastoral area) was unexpected and could be due to the deterrent effect of the livestock odor. Indeed, a strong aversion of *An. gambiae* s.l. to the livestock odor was reported by Pates et al. (2001). It is therefore possible that when bovines are near or inside a house in this Benin northern district, their odors cause an aversion in *An. coluzzii*, and result in a reduction of malaria transmission.

In Malanville, the main vertebrate hosts on which females *An. coluzzii* blood fed were goats (44%), humans (24.29%), bovines (22%), and pigs (1.4 %). However, in Porto-Novo (nonpastoral commune), the same vector showed a very pronounced anthropophagy behavior (86.84%). The finding that goat blood was more common than bovine and pig blood in Malanville was not surprising, as it was commonly observed that people kept goats indoors in special rooms at night, probably to protect against theft, while bovine and pigs were left outside. Orsborne et al. (2020) reached a similar conclusion, emphasizing that the availability of local hosts, even for known anthropophilic malaria vectors, is a powerful driver of host selection. Our results showed that the blood ingested by most *An. coluzzii* was from animals (68%) confirm the zoophilic behavior of this species in the Malanville pastoral area. These results are similar to those previously published in malaria-endemic areas of Honduras where animals were the most frequent source of blood meals (57%) for *Anopheles* vectors (Escobar et al. 2020). The low prevalence of human host blood

Table 6. Blood-meal origin in *Anopheles coluzzii*

	Monkassa	Bodjècali	Total Malanville	Proportions % [95% CI]	Tokpota	Djassin	Total Porto-Novo	Proportions % [95% CI]
Single blood meal								
Human	56	29	85	24.29 [19.95–29.19]	17	16	33	86.84 [71.11–95.05]
Goat	111	43	154	44.00 [38.75–49.38]	2	1	3	7.89 [02.06–22.48]
Bovines	51	26	77	22.00 [17.84–26.78]	0	0	0	NA
Pig	3	1	4	1.14 [0.36–3.10]	1	0	1	2.63 [0.13–15.43]
Mixed blood meals								
Bovines + goat	2	1	3	0.86 [0.22–2.69]	0	0	0	NA
Bovines + human	7	5	12	3.43 [1.86–6.07]	0	0	0	NA
Goat + human	11	4	15	4.29 [2.50–7.12]	1	0	1	2.63 [0.13–15.43]
Total	241	109	350		21	17	38	
Anthropophilic index (%)	30.71	34.86	32.00		85.71	94.12	89.47	
Mixed blood meals (%)	8.30	9.17	8.57		4.76	0.00	2.63	

NA: Not Applicable.

Rates of human and mixed blood meals are expressed as percentages of the total tested. Anthropophilic index are in italics.

Table 7. Sporozoite and entomological inoculation rates in *Anopheles coluzzii*

Variables	Malanville (pastoral area) Value [95% CI]	Porto-Novo (nonpastoral area) Value [95% CI]
HBR/night	66.25 [46.78–97.11]	21.53 [15.10–31.73]
Nb of head-thoraxes analyzed	1,695	465
Nb of positive head-thoraxes	13	27
SR (%)	0.77 [0.42–1.34]	5.81 [3.93–8.44]
EIR (ib/p/m)	15.28 [15.02–15.46]	37.50 [36.70–38.32]

Nb: number; HBR: human biting rate; SR: sporozoite rate; EIR: entomological inoculation rate; ib/p/m: infectious bites/person/month; %: percentage.

feeding (24%) by *An. coluzzii* observed here is in contrast to a study conducted in northern Benin in 2017, in which blood meals were almost entirely from humans (90.20%) (Akogbéto et al. 2018). However, goats and humans were found mainly indoors, while bovines were found mainly outdoors in Malanville. Since blood-fed mosquitoes are only collected indoors, it is possible that mosquitoes that fed on bovine blood did so outdoors and then returned indoors to rest. Our results also showed that single-host blood meals (human: 24.29% or, animal: 66%) were mostly observed compared to mixed blood meals (8.58%). In Malanville, the very marked trend of vectors to take their blood meal only from animals could constitute a brake on the transmission of malaria to humans, as previously observed by Ndenga et al. (2016) in Kenya. *An. coluzzii* could therefore be considered an opportunistic biter, feeding on both humans and cattle depending on the host availability (Hadis et al. 1997, Animut et al. 2013). This result suggests that zoophylaxis could help better control the transmission of malaria to humans in pastoral areas such as Malanville. According to Burkot et al. (1988) and Service (1991), several human communities have intentionally used livestock near or inside human dwellings to divert mosquitoes from humans to livestock. The diversion of *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* from humans to livestock, had been reported in southern Zambia

(Bulterys et al. 2009). This change in feeding behavior of vectors moving from humans to livestock is most likely the response of the vectors to increased mosquito net coverage, and proximity to livestock. Livestock-targeted interventions should be considered in these circumstances to control residual malaria transmission.

The HBR of *An. gambiae* s.l. was very high (66.25 p/h/n) in Malanville. The abundance of this vector in this commune could be due to the rural character of its two surveyed villages, and also by the cultivation of rice which is very favorable to the proliferation of *An. gambiae* s.l. (Koudou et al. 2007). It is possible that in the absence of pastoral activity in Malanville, the biting frequency of *An. gambiae* s.l. on humans is much higher than it is, due to the presence of a single host. However, the proportion of *An. coluzzii* specimens found positive for *Plasmodium falciparum* sporozoite was relatively low in Malanville (SR = 0.77%). In the nonpastoral area of Porto-novo, the HBR of *An. gambiae* s.l. was 21.53 p/h/n and its SR 5.81%. In Malanville, the fact that most *An. coluzzii* vectors took their blood meal on animals, could justify the low *P. falciparum* sporozoite rate. These results corroborate those obtained in Burkina Faso (Robert et al. 1991) and Senegal (Faye et al. 1993) which showed that the low prevalence of malaria is partly explained by a relatively high zoophily behavior within the populations of *An. gambiae* s.l. Similar results were observed in southern Zambia, where ownership of

livestock and other domestic animals and distance between houses are associated with a reduced risk of recurrent *P. falciparum* infection (Bulterys et al. 2009). Livestock ownership (or the presence of livestock near household dwellings) can be recommended as a passive zooprophylactic measure in areas with vector composition similar to that of northern Benin. Our results also suggest that household-level malaria interventions involving the application of insecticide on bovine and goats (Hewitt and Rowland 2002), can be effective, particularly if implemented with established interventions such as the use of ITNs.

The relatively high proportion of *An. coluzzii* specimens positive for *P. falciparum* circumsporozoite antigen observed in Porto-Novo could be due to increased human–vector contact facilitated by the presence of a single human host in the region or a misuse of LLINs.

However, many studies have also shown that the presence of symbiotic microbes (microsporidia and Wolbachia) in vectors contributes in some cases to the reduction of *Plasmodium* transmission capacity (Baldini et al. 2014, Jeffries et al. 2018, Gomes et al. 2017, Shaw et al. 2016, Herren et al. 2020). It is therefore important to characterize the nonpathogenic microsporidia that the *Anopheles* populations of this pastoral area could harbor and establish the link with their capacity to transmit *Plasmodium* sporozoite.

Although this study is limited insofar as it did not measure all potential social and biological confounders, we believe that most of the critical factors were accounted for in the multivariate analysis. The observed associations may likely suggest important determinants of *P. falciparum* infection in pastoral areas, and should be further investigated as potential malaria control measures.

The present study shows that the modification of the trophic preference of malaria vectors can be achieved by the practice of livestock. In addition, it could contribute to reducing the transmission of malaria in a context of frantic search for innovative strategies for a better control of malaria vectors.

Conclusion

This study revealed a high frequency of *An. coluzzii*, having taken their blood meal on animals in Malanville, a commune where it remains the main malaria vector. In addition, this species has an overall low SR. The change in trophic preference of *An. Coluzzii* (from human towards cattle) could be due to the strong presence of the animals in human dwellings. The practice of pastoralism associated with a pronounced zoophagy in vectors, could therefore be considered an indirect strategy for controlling malaria transmission. Our results also suggest that household-level malaria interventions involving bovines and goats, such as the application of insecticides to cattle, may be effective, if implemented in combination with ITN use.

Acknowledgments

We are grateful to the Benin Ministry of Health, which provided financial support for this study from the national health research budget. We would also like to thank the technicians of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou who provided technical support to the study.

References

Adam KS, Boko M. “Le Bénin” EDICEF, Paris; 1993.
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;5:102–111. <https://doi.org/10.5897/JVPB.2013.0118>.
Akogbeto M, Chippaux JP, Coluzzi M. Le paludisme urbain côtier à Cotonou (république du Bénin): étude entomologique. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.* 1992;40:233–239.
Akogbéto MC, Salako AS, Dagnon F, Aikpon R, Kouletio M, Sovi A, Sezonlin M. 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. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2452-9>.
Animut A, Balkew M, Gebre-Michael T, Lindtjørn B. Blood meal sources and entomological inoculation rates of anophelines along a highland altitudinal transect in south-central Ethiopia. *Malar. J.* 2013;12:76. <http://www.malariajournal.com/content/12/1/76>.
Awolola T, Ibrahim K, Okorie T, Koekemoer L, Hunt R, Coetzee M. Species composition and biting activities of anthropophilic *Anopheles* mosquitoes and their role in malaria transmission in a holo-endemic area of south-western Nigeria. *Afr. Entomol.* 2003;11:227–232. <https://hdl.handle.net/10520/EJC32558>.
Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Shaw WR, Dabiré RK, Diabaté A, Levashina EA, Catteruccia F. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nat. Commun.* 2014;5:85. <https://doi.org/10.1038/ncomms4985>.
Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP, Koeh DK. Blood meal identification by direct Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.* 1988;25:9–16. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.1.9>.
Bogh C, Clarke SE, Pinder M, Sanyang F, Lindsay SW. Effect of passive zooprophylaxis on malaria transmission in The Gambia. *J. Med. Entomol.* 2001;38:822–828. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.6.822>.
Bulterys PL, Mharakurwa S, Thuma PE. Cattle, other domestic animal ownership, and distance between dwelling structures are associated with reduced risk of recurrent *Plasmodium falciparum* infection in southern Zambia. *Trop. Med. Int. Health.* 2009;14:522–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02270.x>.
Burkot TR, Graves PM, Paru R, Lagog M. Mixed blood feeding by the malaria vectors in the *Anopheles punctulatus* complex (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1988;25:205–213. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.4.205>.
Challaton KP, Boko KC, Akouedegni CG, Alowanou GG, Houndonougbo PV, Hounzangbé-Adoté MS. Elevage traditionnel des caprins au Bénin: pratiques et contraintes sanitaires. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 2022;75:9–17. <https://doi.org/10.19182/remvt.36893>.
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. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-5>.
Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbéto M, Weill M, Chandre F. Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. *Acta Trop.* 2010;114:116–122. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.001>.
Dossou-Yovo J, Doannio JM, Diarrassouba S. Feeding preferences of malaria vectors in the city of Bouaké and in the surrounding villages of Côte d'Ivoire. *Bulletin de la société de Pathologie Exotique.* 1998;91:257–258.
Escobar D, Ascencio K, Ortiz A, Palma A, Sánchez A, Fontecha G. Blood meal sources of *Anopheles* spp. in malaria endemic areas of Honduras. *Insects.* 2020;11:450.
Faye O, Fontenille D, Hervé JP, Diack PA, Diallo S, and Mouchet J. Le paludisme en zone sahélienne du Sénégal. Données entomologiques sur la transmission. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1993;73:21–30.
Faye O, Gaye O, Fontenille D, Hebrard G, Konaté L, Sy N, Herve JP, Touré Y, Diallo S, Molez JF, Mouchet J. La sécheresse et la baisse du paludisme dans les Niayes du Sénégal. CNRS. 1995;5:299–305.
Galvani AP, May RM. Epidemiology: dimensions of superspreading. *Nature.* 2005;438:293–295. <https://doi.org/10.1038/438293a>.
Gillies M and Coetzee M. A supplement to the anopheline of the South of the Sahara (Afrotropical Region). *Publ. South African Inst. Med. Res.* 1987;55:143.
Gillies MT, De Meillon B. The anophelinae of Africa South of the Sahara, 2nd edition. *Publ. South Afr. Ins. Med Res.* 1968;54:12–36.

- Gimnig JE, Kolczak MS, Hightower AW, Vulule JM, Schoute E, Kamau L, Phillips-Howard PA, Kuile FO, Nahlen BL, Hawley W. Effect of permethrin-treated bed nets on the spatial distribution of malaria vectors in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003;68:115–120.
- Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Osse R, Oke-Agbo F, Azondekon R, Sovi A, Attolou R, Badirou K, Tokponnon FT, et al. Transmission patterns of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles gambiae* in Benin. *Malar. J.* 2014;13:444. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-444>.
- Gomes FM, Hixson BL, Tyner MDW, Ramirez JL, Canepa GE, Silva TLA, Molina-Cruz A, Keita M, Kane F, Traoré B, et al. Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2017;114:66–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716181114>.
- Guidibi ME, Gandonou BM. Monographie de la ville de Porto-Novo; 2006. p. 67. <https://knowledge-uclga.org/IMG/pdf/monographiedelacommunedeportonovo.pdf>.
- Hadis M, Lulu M, Makonnen Y, Asfaw T. Host choice by indoor-resting *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997;91:376–378.
- Hasyim H, Dhimal M, Bauer J, Montag D, Groneberg DA, Kuch U, Müller R. Does livestock protect from malaria or facilitate malaria prevalence? A cross-sectional study in endemic rural areas of Indonesia. *Malar. J.* 2018;17:302. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2447-6>.
- Herren JK, Mbaisi L, Mararo E, Makhulu EE, Mobegi VA, Butungi H, Mancini MV, Oundo JW, Teal ET, Pinaud S, et al. A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Nat. Commun.* 2020;11:2187. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16121-y>.
- Hewitt S, Rowland M. Control of zoophilic malaria vectors by applying pyrethroid insecticides to cattle. *Trop. Med. Int. Health.* 2002;4:481–486. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00433.x>.
- Institut National de la Statistique et de l'Analyse Économique (INSAE) et ICF. Enquête Démographique et de Santé au Bénin, 2017–2018. Cotonou, Bénin et Rockville, Maryland, USA; 2019. https://instad.bj/images/docs/insae-statistiques/enquetes-recensements/EDS/2017-2018/1.Benin_EDSBV_Rapport_final.pdf.
- Jeffries CL, Lawrence GG, Golovko G, Kristan M, Orsborne J, Spence K, Hurn E, Bandibabone J, Tantely LM, Raharimalala FN, et al. Novel *Wolbachia* strains in *Anopheles* malaria vectors from Sub-Saharan Africa. *Wellcome Open Res.* 2018;3:113. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14765.2>.
- Karim IYA, Dahouda M, Attakpa EY, Koutinhoun GB, Ahounou GS, Toleba SS, Balogoun BS. Diversité des systèmes d'élevages de bovins de race bovine Borgoudans la zone soudanienne du Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 2013;7:125–146. <http://ajol.info/index.php/ijbcs>.
- Killeen GF. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malar. J.* 2014;13:330. <http://www.malariajournal.com/content/13/1/330>.
- Killeen GF, Mckenzie FE, Foy BD, Bøgh C, Beier CJ. The availability of potential hosts as a determinant of feeding behaviours and malaria transmission by African mosquito populations. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001;95:469–476. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(01\)90005-7](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(01)90005-7).
- Killeen GF, Mckenzie FE, Foy BD, Schieffelin C, Billingsley PF, Beier JC. A simplified model for predicting malaria entomologic inoculation rates based on entomologic and parasitologic parameters relevant to control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000;62:535–544. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.535>.
- Koudou BG, Adja AM, Matthys B, Doumbia M, Cissé G, Koné M, Tanner M, Utzinger J. Pratiques agricoles et transmission du paludisme dans deux zones éco-épidémiologiques au centre de la Côte d'Ivoire. *Bull. SocPathol. Exot.* 2007;100:124–126.
- Lehmann T, Diabate A. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: a phenotypic perspective. *Infect. Genet. Evol.* 2008;8:737–746. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.06.003>.
- Mathenge E, Gimnig J, Kolczak M, Ombok M, Irungu L, and Hawley W. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 2001;38:531–536. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.4.531>.
- Mburu MM, Zembere K, Mzilahowa T, Terlouw AD, Malenga T, Berg H, Takken W, McCann RS. Impact of cattle on the abundance of indoor and outdoor resting malaria vectors in southern Malawi. *Malar. J.* 2021;2021:353. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03885-x>.
- Ministère la Santé du Bénin. 2020. Annuaire des statistiques sanitaires. Cotonou: Direction de la Programmation et de la Prospective. 2019. https://files.who.int/afahobckpcontainer/production/files/Annuaire_Statistique_2019.pdf.
- Muriu SM, Muturi EJ, Shililu JI, Mbogo CM, Mwangangi JM, Jacob BG, Irungu LW, Mukabana RW, Githure JI, Novak RJ. Host choice and multiple blood feeding behaviour of malaria vectors and other anophelines in Mwea rice scheme, Kenya. *Malar. J.* 2008;7:43. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-43>.
- Ndenga BA, Mulaya LN, Musaki KS, Shiroko JN, Dongus S, Fillinger U. Malaria vectors and their blood-meal sources in an area of high bed net ownership in the western Kenya highlands. *Malar. J.* 2016;15:76. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1115-y>.
- Orsborne J, Mohammed AR, Jeffries CL, Kristan M, Afrane YA, Walker T, Yakob L. Evidence of extrinsic factors dominating intrinsic blood host preferences of major African malaria vectors. *Sci. Rep.* 2020;10:741. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57732-1>.
- Padonou GG, Sezonlin M, Gbedjissi GL, Ayi I, Azondekon R, Djenontin A, Bio-Bangana S, Oussou O, Yadouleton A, Boakye D, 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.* 2011;3:59–68.
- 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. <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/262>.
- Pates HV, Takken W, Stuke K, Curtis CF. Differential behaviour of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human and cow odours in the laboratory. *Bull. Entomol. Res.* 2001;91:289–296. <https://doi.org/10.1079/ber200198>.
- R Core Team. R. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2018. <https://www.R-project.org>.
- RGPH4 Benin. 2015. Que retenir des effectifs de population en 2013?: p. 33. <https://instad.bj/images/docs/insae-statistiques/demographiques/population/Resultats%20definitifs%20RGPH4.pdf>.
- Robert V, Petrarca V, Coluzzi M, Boudin C, Carnevale P. Etude des taux de parturité et d'infection du complexe *Anopheles gambiae* dans la rizière de la vallée du Kou, Burkina Faso. In: *Le paludisme en Afrique de l'Ouest. Coll. Etudes et thèses*. Paris: ORSTOM Ed; 1991. p. 17–35. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_2/etudes_theses/34309.pdf.
- Rothman KJ. *Epidemiology: an introduction*. Oxford: Oxford University Press; 2012.
- 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. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-163>.
- Service M. Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. *Rev Saúde Públ Sao Paulo.* 1991;25:165–178. <https://doi.org/10.1590/s0034-89101991000300002>.
- Seyoum A, Balcha F, Balkew M, Ali A, Gebre-Michael T. Impact of cattle keeping on human biting rate of anopheline mosquitoes and malaria transmission around Ziway, Ethiopia. *East Afr. Med. J.* 2002;79:485–490. <https://doi.org/10.4314/eamj.v79i9.9121>.
- Seyoum A, Sikaala CH, Chanda J, Chinula D, Ntamungiro AJ, Hawela M, Müller JM, Russell TL, Briët OJT, Killeen GF. Human exposure to anopheline mosquitoes occurs primarily indoors, even for users of insecticide-treated nets in Luangwa Valley, South-east Zambia. *Parasit. Vectors.* 2012;5:101.
- Shaw WR, Marcenac P, Childs LM, Buckee CO, Baldini F, Sawadogo SP, Dabiré RK, Diabaté A, Catteruccia F. *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate

- with Plasmodium development. *Nat. Commun.* 2016;7:72. <https://doi.org/10.1038/ncomms11772>.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit. Vectors.* 2012;5:69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>.
- Soleimani-Ahmadi M, Vatandoost H, Shaeghi M, Raeisi A, Abedi F, Eshraghian M, Madani A, Safari R, Oshaghi MA, Abtahi M, et al. Field evaluation of permethrin long-lasting insecticide treated nets (Olyset®) for malaria control in an endemic area, southeast of Iran. *Acta Trop.* 2012;123:146–153. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.004>.
- Thongsripong P, Hyman JM, Kapan DD, Bennett SN. Human–Mosquito contact: a missing link in our understanding of mosquito-borne disease transmission dynamics. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2021;114:397–414. <https://doi.org/10.1093/aesa/saab011>.
- Tirados I, Costantini C, Gibson G, Torr SJ. Blood-feeding behaviour of the malarial mosquito *Anopheles arabiensis*: implications for vector control. *Med. Vet. Entomol.* 2006;20:425–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.652.x>.
- Toko RC. Place de l'élevage bovin dans l'économie rurale des peuls du nord Bénin [Thèse de doctorat de l'Université de Liège]; 2016. p. 234. https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/202622/1/Th%C3%A8se%20version%20finale_CHABI%20TOKO%20Roukayath.pdf.
- Wanji S, Tanke T, Atanga SN, Ajonina C, Nicholas T, Fontenille D. *Anopheles* species of the mount Cameroon region: biting habits, feeding behaviour and entomological inoculation rates. *Trop. Med. Int. Health.* 2003;8:643–649. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.01070.x>.
- Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot TR, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull. World Health Organ.* 1987;65:39–45.
- Zeru MA, Shibru S, Massebo F. Exploring the impact of cattle on human exposure to malaria mosquitoes in the Arba Minch area district of southwest Ethiopia. *Parasit. Vectors.* 2020;13:322. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04194-z>.



Article

Distribution and Abundance of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa

Germain Gil Padonou ^{1,2,*} , Alphonse Keller Konkon ^{1,2}, Albert Sourou Salako ¹,
David Mahouton Zoungbédji ^{1,2} , Razaki Ossè ^{1,3}, Arthur Sovi ^{1,4,5,*} , Roseric Azondekon ¹ ,
Aboubakar Sidick ¹, Juvénal Minassou Ahouandjinou ^{1,2}, Constantin Jesukèdè Adoha ^{1,2} ,
André Aimé Sominahouin ¹, Filémon Tatchémè Tokponnon ¹ , Bruno Akinro ¹, Haziz Sina ² ,
Lamine Baba-Moussa ² and Martin Codjo Akogbéto ¹

- ¹ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin; konkonkelleralphonse@gmail.com (A.K.K.); albertsourousalako@yahoo.fr (A.S.S.); davidzoungbedji91@gmail.com (D.M.Z.); aosse@gouv.bj (R.O.); roseric_2000@yahoo.fr (R.A.); sidick_aboubakar@yahoo.fr (A.S.); juveminassou@gmail.com (J.M.A.); adohaj.constantin@yahoo.fr (C.J.A.); andrsominahouin@yahoo.fr (A.A.S.); filemont@yahoo.fr (F.T.T.); akinrobruno@gmail.com (B.A.); akogbetom@yahoo.fr (M.C.A.)
- ² Laboratory of Biology and Molecular Typing in Microbiology, Department of Biochemistry and Cellular Biology, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou 05 BP 1604, Benin; sina.haziz@gmail.com (H.S.); lamineaid@yahoo.fr (L.B.-M.)
- ³ École de Gestion et d'Exploitation des Systèmes d'élevage, Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo, Porto-Novo 01 BP 55, Benin
- ⁴ Faculty of Agronomy, University of Parakou, Parakou BP 123, Benin
- ⁵ Faculty of Infectious and Tropical Diseases, Disease Control Department, The London School of Hygiene & Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK
- * Correspondence: pagergil@yahoo.fr (G.G.P.); arthur.sovi@lshtm.ac.uk (A.S.)



Citation: Padonou, G.G.; Konkon, A.K.; Salako, A.S.; Zoungbédji, D.M.; Ossè, R.; Sovi, A.; Azondekon, R.; Sidick, A.; Ahouandjinou, J.M.; Adoha, C.J.; et al. Distribution and Abundance of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, 439. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8090439>

Academic Editor: John Frean

Received: 10 August 2023

Revised: 30 August 2023

Accepted: 5 September 2023

Published: 7 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Updated information on the distribution and abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is crucial to prepare African countries, such as Benin, for possible arboviral disease outbreaks. This study aims to evaluate the geographical distribution, abundance and biting behaviour of these two vectors in Benin. Three sampling techniques were used in this study. The collection of *Aedes* spp. adults were made through human landing catch (HLC), immatures were captured with the use of ovitraps, and a dipping technique was used for the collection of *Aedes* spp. In 23 communes located along the North–South and East–West transect of Benin. Adult *Aedes* mosquitoes were collected indoors and outdoors using HLC. Mosquito eggs, larvae and pupae were collected from containers and ovitraps. The adult mosquitoes were morphologically identified, then confirmed using a polymerase chain reaction (PCR). Overall, 12,424 adult specimens of *Aedes* spp. were collected, out of which 76.53% (n = 9508) and 19.32% (n = 2400) were morphologically identified as *Ae. aegypti* and *Ae. Albopictus*, respectively. Geographically, *Ae. aegypti* was found across the North–South transect unlike *Ae. albopictus*, which was only encountered in the southern part of the country, with a great preponderance in Avrankou. Furthermore, an exophagic behaviour was observed in both vectors. This updated distribution of *Aedes* mosquito species in Benin will help to accurately identify areas that are at risk of arboviral diseases and better plan for future vector control interventions.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; distribution; abundance; biting behaviour; Benin

1. Background

The *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) tiger mosquito is currently one of the most invasive species that has successfully colonised most tropical and temperate regions globally [1]. Native to Southeast Asia, this species has spread to several other parts of the world except for Antarctica [1,2]. Genetic evidence suggests that this global invasion of *Ae. albopictus* is strongly associated with anthropogenic actions, such as the trade of

used tires (passive dispersal), transport (sea and land) and travel [3–5]. Additionally, Kamgang et al. [6] suggest that the ecological plasticity of the *Aedes* species allows them to proliferate in a wide range of climates and habitats. Given the ability of *Ae. albopictus* to tolerate low temperatures [7], it is now present in temperate regions where it lives in sympatry with *Ae. aegypti*. Both species were reported to share the same larval habitats in urban and peri-urban environments [8]. Such larval habitats can be domestic (water reservoirs and flowerpots), peri-domestic (discarded reservoirs and used tires) or natural breeding sites (tree holes and plant axils) [6,9]. The ease of expansion for *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* has created conducive conditions for the emergence of human arboviral diseases, such as Chikungunya, Zika, dengue fever and yellow fever, in new geographical areas [10]. Over the past 30 years, the distribution and epidemiological impact of these arboviral diseases on public health have increased considerably [11]. In Africa, *Ae. albopictus* was first identified in South Africa in 1989 and was quickly brought under control [12]. Two years later (1991), in West Africa, this vector was reported in the Delta State in Nigeria where it has since spread [4,13]. In Central Africa, *Ae. albopictus* was reported in Cameroon in 2000 [14] and has since expanded across the region. Curiously, this expansion of *Ae. albopictus* in Central Africa coincided with the emergence of dengue (denv), zika (zikv) and chikungunya (chikv) viruses in urban settings [15]. Paupy et al. [16] suspected that this mosquito would play a leading role in the occurrence of these diseases in the region. In West Africa, although the first detection of *Ae. albopictus* was reported in 1991 in Nigeria, there was no report of this *Aedes* species in neighbouring Benin until 2021, a country that shares 773 kilometres of border with Nigeria [17]. Between July and August 2010, two cases of dengue were diagnosed in France in travellers from Cotonou, Benin [18,19]. Between April and July 2019, eight confirmed cases of dengue, including two deaths were recorded in the departments of Atlantique, Littoral and Ouémé in southern Benin [20]. According to Padonou et al. [21], the diagnosis of confirmed dengue cases in a given area is an indication of the area's strong infestation by mosquitoes of the *Aedes* genus. Cases of yellow fever were reported in Nigeria, a country neighboring Benin [22]. In addition, the high frequency of people travelling between the two countries increases the risk of yellow fever in Benin.

Recently, the dengue serotype three was detected in *Aedes* vector populations in Benin [23]. Moreover, cases of dengue virus infections have been recorded in Rosso area in Senegal [24,25]. In 2022, dengue epidemics affected the economic capital of Côte d'Ivoire, with 380 detected cases [25]. In addition, several studies showed a strong association between the distribution of the vectors and the risk of occurrence of a disease [21,26]. In the case of arboviral diseases, the obtained results have enabled the development of risk maps [27–29]. These maps are useful for decision-making, as they allow for control interventions to target with precision the most affected areas. In Benin, the distribution area of *Ae. Albopictus* is still poorly known. Moreover, even though *Ae. Aegypti* is very often found in routine entomological collections, an update of its distribution area in the country is required. This study established the distribution map for *Ae. Aegypti* and *Ae. Albopictus* in Benin. This proposed tool is a prerequisite that will be used to prepare the country's response to potential arboviral diseases epidemics.

2. Methods

2.1. Study Area

This study was carried out in Benin, more specifically in 23 of the 77 communes in the country (Figure 1). Among the 23 investigated communes, ten were selected due to their closeness to Nigeria, where *Ae. Albopictus* was first detected three decades ago. The communes were classified into three zones (urban, peri-urban and rural), according to their degree of urbanization, presence of vegetation, population density, presence of modern infrastructure and type of houses.

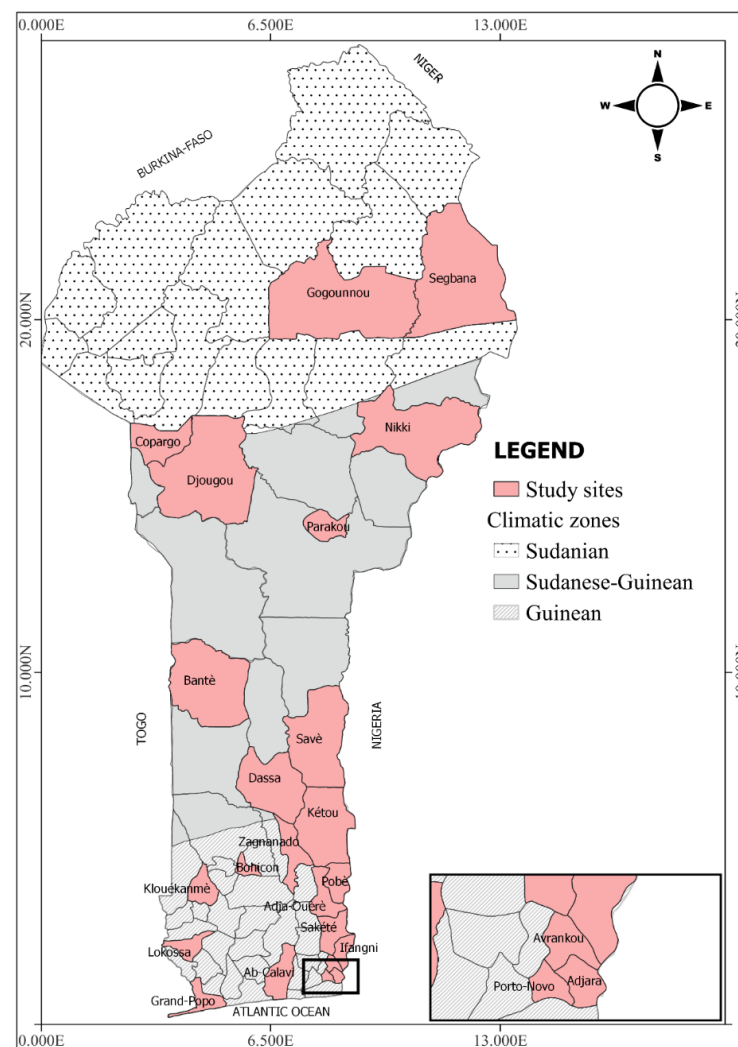


Figure 1. Map showing the study area * (* the map was drawn using the QGIS 3.32.2 Lima Software).

The 23 communes were selected according to their representativeness of the three major eco-climatic zones in the country [30].

2.1.1. Area of Degraded Forests with a Subequatorial Climate

This area is characterised by two rainy seasons (mid-March to mid-July and September to November) and two dry seasons (December to mid-March and mid-July to August). Its annual rainfall varies from 1300 to 1500 mm per year [31]. The communes surveyed in this area included Abomey-Calavi, Porto-Novo, Adjara, Avrankou, Ifangni, Sakété, Pobe, Kétou, Lokossa, Klouékanmè, Zagnanado, Bohicon and Grand Popo (Figure 1). Abomey-Calavi and Porto-Novo are the most urbanized while the others are peri-urban or rural.

2.1.2. Area of Savannas with a Sudano-Guinean Climate

This area has two seasons: a rainy season (April to October) and a dry season (November to March). Its annual rainfall varies between 1200 and 1300 mm [31]. The communes investigated in this area were urban (Parakou), peri-urban (Djougou and Dassa) and rural (Savè, Bantè, Nikki and Corpago) (Figure 1).

2.1.3. Area of Savannahs with a Sudanian Climate

A dry season from November to May and a rainy season from June to October characterise this area. Its climate is of the Sudanian type. The rural communes of Gogounou and Ségbana were investigated here [31] (Figure 1).

Overall, in each of these communes, the surveys were carried out in two villages that were selected at random. The geographical coordinates of the surveyed villages were recorded using a Global Positioning System (GPS) in order to map the distribution and density of *Ae. Albopictus* and *Ae. Aegypti*.

2.2. Mosquito Collection Techniques

To determine the different mosquito species of the *Aedes* genus, even those present at low frequencies in all the study communes, three sampling techniques were used between July 2021 and October 2022. These included the following.

2.2.1. Collection of Mosquito Immature Stages

Larvae and pupae were sampled both indoors and outdoors in different types of larval habitats, including the following.

- Domestic containers: flowerpots, drums, cups, water storage containers (cement-made cisterns and earthen jars), buckets, garbage cans, pet water bowls, bottles, mortars and barrels.
- Discarded containers: plastic bags, abandoned machinery (refrigerators, freezers) and tin cans.
- Tires
- Natural breeding sites: fruit shells, plant leaf axils, coconut and tree and root holes.
- Others: wheelbarrows, abandoned canoes and cars, and pipes in the ground.

These immature stages were then transported to the CREC where they were reared at insectary conditions (temperature: 28 ± 1 °C, relative humidity: 70–80%, 14 h: 10 h light: dark photoperiod) until adulthood.

2.2.2. Using the Ovitrap Method

The ovitraps used in this study were made from a painted black polyethylene container that contained 50 mL of water. A rectangular plywood support (5 cm × 20 cm) was introduced to the black polyethylene container to serve as a support for laying mosquito eggs. Twelve ovitraps were placed per site, with four sites surveyed per commune. These traps were approximately 100 metres apart from each other. They were fixed to a tree or a wall approx. 1.5 cm from the ground using a nail and a metal string for approx. 5 to 7 days in the domestic (yard) and peri-domestic environments. The ovitraps were regularly inspected to avoid egg hatching as much as possible. However, when the larvae were observed in the traps, they were collected and brought back to the insectary of the “Centre de Recherche Entomologique de Cotonou” (CREC) for rearing until adulthood. The adults were then identified, counted and released into cages. Between the fifth and seventh day, the ovitraps were withdrawn and the hardboard plate was brought back to the insectary of the CREC. The eggs that were laid were counted and put in water at the insectary to enable hatching and development until adulthood. The emerging adults were put into a refrigerator (−20 °C) for 15 min to immobilise them before they were identified. They were grouped into a pool of 10 individuals, taking into account their geographical origin, sex and date of collection, and then stored at −80 °C.

2.2.3. Human Landing Catch (HLC)

This method, which collects adult mosquitoes, was used in two sites (one central and one peripheral) that were selected in each commune. In each site, the collections using human bait were carried out from 7 a.m. to 6 p.m. in two houses, with one collector seated inside and a second outside each house, which resulted in a total of four collectors/site/day

and 16 collectors/commune/day. Indeed, two teams of eight collectors each were, therefore, formed per commune. The first team collected samples from 7 a.m. to 1 p.m. and was replaced by the second team from 1 p.m. to 6 p.m. The collectors used haemolysis tubes to capture the mosquitoes that tended to bite their bare feet and legs.

2.3. Morphological and Molecular Identification

The adult mosquitoes (males and females) from the three sampling methods (ovitrap method, collection of immature stages and HLC) were morphologically identified using a binocular microscope and the taxonomic keys from Edwards [32] and Yiau-Min [33]. The specimens of *Aedes* spp. were referenced, preserved on RNA Later and grouped according to their species, locality, date and location (indoor/outdoor).

The legs of the specimens of *Ae. albopictus* were used for the extraction of their DNA using the protocol of Linton et al. [34]. Due to a high degree of interspecific variation [35,36], the ITS2 nuclear ribosomal spacer gene was amplified by a PCR using the primers 5.8 S and 28 S [37,38]. The PCR product of *Ae. albopictus* was 509 bp and 518 bp according to the sequences published on GenBank M95127 [38] and L22060 [39], respectively. The PCR was performed in a volume of 50 µL containing a 1× PCR buffer, 2 mM of MgCl₂, 0.2 µM of each dNTP, 100 pM of each primer, 2 U of Taq DNA polymerase and 2 µL of DNA to be amplified. *Aedes aegypti* was used as the negative control. The amplification was carried out using a thermocycler according to the following programme: an initial denaturation at 94 °C for 10 min; 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min; an initial hybridization at 50 °C for 1 min and hybridization at 72 °C for 1 min. The final hybridization was performed at 72 °C for 10 min. The products were migrated onto 1.5% agarose gels containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide. The gels were photographed using a polaroid camera under UV illumination following standard procedures [40].

2.4. Ethical Considerations

The protocol of this study was reviewed and approved by the “Comité Institutionnel d’Ethique pour la Recherche en Santé du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou” (CIERS-CREC) (Ethical approval N°06-22/CREC/CIERS-CREC /SG). The collectors were selected from the different study sites and trained to collect mosquitoes before they were bitten. They were all vaccinated against yellow fever and subjected to regular check-ups at the nearest health facility. In the occurrence of fever, they were immediately taken care of.

2.5. Data Analysis

The data were analysed using the R statistical software, version 4.1.2 [41]. The Chi-square test of the comparison of the proportions was used to compare the distribution of each species according to the different eco-climatic areas. The species richness (S), which corresponded to the number of collected species, and their relative abundance (Pi) were computed ($P_i = n_i/N$, where n_i = number of species i ; N = total number of species encountered; $i = 1:S$) per study site.

The Shannon–Weaver index (H), which showed the diversity of the species, was determined for all 23 sites according to the following formula: $H = -\sum_{i=1}^S P_i \times \log_2(P_i)$ [42].

The equitability index was also calculated as $E = \frac{H}{\log_2 S}$ [43].

All these parameters were determined using the combined number of *Aedes* species obtained with the three sampling techniques to assess the proportion of the main dengue vectors and estimate the level of risk.

The higher or lower biting risk for each collector from each mosquito species (*Ae. aegypti* or *Ae. albopictus*) was calculated as the number of mosquito species collected divided by the number of collectors per day. The Poisson method was used to estimate the confidence intervals of the HBRs and compare them between the study sites and locations (indoors and outdoors). The risk of receiving greater or fewer bite(s) from each mosquito species (*Ae. aegypti* or *Ae. albopictus*) indoors compared to outdoors was assessed by calculat-

ing the rate ratio (RR). A difference was considered significant when the p-value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Diversity of the Aedes Mosquito Species in Benin

A total of 12,424 specimens of *Aedes* spp. were collected over a two-year period using the three sampling methods. The predominant species were *Ae. aegypti* (76.53% [75.77–77.27], n = 9508) and *Ae. albopictus* (19.32% [18.63–20.02], n = 2400). The other *Aedes* species included *Ae. luteocephalus* (3.50% [3.18–3.84]; n = 435), *Ae. (Neomelaniconion) palpalis* (0.45% [0.34–0.58]; n = 56), *Ae. vittatus* (0.13% [0.07–0.21]; n = 16) and *Ae. africanus* (0.07% [0.03–0.14]; n = 9) (Table 1). The lowest number of *Aedes* were observed in Savè (n = 114) and the highest in Ifangni (n = 4106). The observed species richness was six, four and three, respectively, for the subequatorial, Sudano-Guinean and Sudanian areas (Table 2). According to the equitability index (E), the abundance of species from the *Aedes* genus was low (0.07 [0.03–0.012]) in the Sudanian area, as well as in the Sudano-Guinean area (0.08 [0.05–0.10]). The same applied to the Shannon–Weaver indices, which revealed a low diversity in the northern (H = 0.08 [0.03–0.13]) and central (H = 0.11 [0.08–0.14]) regions of Benin. Meanwhile, the equitability and Shannon–Weaver indices were relatively close to one in southern Benin and were, respectively, E = 0.42 [0.41–43] and H = 0.76 [0.74–0.77].

Table 1. *Aedes* mosquito composition and abundance in the study sites between July 2021 and October 2022.

Localities (Communes)	<i>Ae aegypti</i>	<i>Ae albopictus</i>	<i>Ae africanus</i>	<i>Ae vittatus</i>	<i>Ae (Neome- laniconion) palpalis</i>	<i>Ae luteo- cephalus</i>	Total	Taxa (S)
	ni (Pi)	ni (Pi)	ni (Pi)	ni (Pi)	ni (Pi)	ni (Pi)	N	
Ifangni	1964 (47.83)	1731 (42.16)	0	0	1 (0.02)	410 (9.99)	4106	4
Kétou	139 (82.74)	22 (13.10)	1 (0.60)	0	3 (1.79)	3 (1.79)	168	5
Sakété	128 (55.41)	44 (19.05)	8 (3.46)	2 (0.87)	49 (21.21)	0	231	5
Pobè	771 (87.71)	92 (10.47)	0	0	0	16 (1.82)	879	3
Adja-Ouèrè	482 (87.96)	66 (12.04)	0	0	0	0	548	2
Porto-Novo	1653 (92.14)	133 (7.41)	0	0	0	4 (0.22)	1790	3
Adjara	128 (85.33)	22 (14.67)	0	0	0	0	150	2
Avrankou	178 (46.97)	196 (51.72)	0	2 (0.53)	3 (0.79)	0	379	4
Abomey-Calavi	181 (87.44)	26 (12.56)	0	0	0	0	207	2
Bohicon	252 (89.68)	29 (10.32)	0	0	0	0	281	2
Zangnanado	189 (96.92)	6 (3.08)	0	0	0	0	195	2
Lokossa	200 (100)	0	0	0	0	0	200	1
Klouekanmè	251 (100)	0	0	0	0	0	251	1
Grand-Popo	600 (100)	0	0	0	0	0	600	1
Djougou	241 (100)	0	0	0	0	0	241	1
Copargo	301 (100)	0	0	0	0	0	301	1
Savè	114 (100)	0	0	0	0	0	114	1
Parakou	314 (98.74)	0	0	4 (1.25)	0	0	318	2
Nikki	152 (98.70)	0	0	1 (0.65)	0	1 (0.65)	154	3
Bantè	551 (100)	0	0	0	0	0	551	1
Dassa	206 (86.19)	33 (13.81)	0	0	0	0	239	2
Ségbana	210 (99.52)	0	0	1 (0.47)	0	0	211	2
Gogounou	303 (97.74)	0	0	6 (1.93)	0	1 (0.32)	310	3
Total	9508	2400	9	16	56	435	12,424	-
Proportion (Pi) (%) [95% CI]	76.53 [75.77– 77.27]	19.32 [18.63– 20.02]	0.07 [0.03–0.14]	0.13 [0.07–0.21]	0.45 [0.34–0.58]	3.50 [3.18–3.84]	-	-

ni or N: number; Pi: proportion; CI: confidence interval.

Table 2. *Aedes* mosquito diversity indices in Benin.

Eco-Geographical Zones	Total	Taxas (S)	Equitability (J) [IC-95%]	Shannon (H) [IC-95%]
Subequatorial climate (Oueme, Plateau, Atlantic, Mono, Couffo and Zou regions)	9985	6	0.42 [0.41–0.43]	0.76 [0.74–0.77]
Sudanese-Guinean climate (Collines, Donga and Borgou regions)	1918	4	0.08 [0.05–0.10]	0.11 [0.08–0.14]
Sudanese climate (Alibori region)	521	3	0.07 [0.03–0.012]	0.08 [0.03–0.13]

3.2. Distribution and Abundance of *Aedes* Mosquitoes across the Study Sites

Twenty-three study communes distributed across the three eco-climatic areas were included in this study (Figure 2). *Ae. albopictus* was identified in 12 communes, including 11 (Avrankou, Adjara, Porto-Novo, Abomey-Calavi, Ifangni, Sakété, Pobè, Kétou, Adja-Ouère, Bohicon and Zangnanado) in the south of the country where the climate is subequatorial and 01 (Dassa) in the centre of the country with a Sudano-Guinean climate. No specimens of *Ae. albopictus* were observed in the remaining 11 communes.

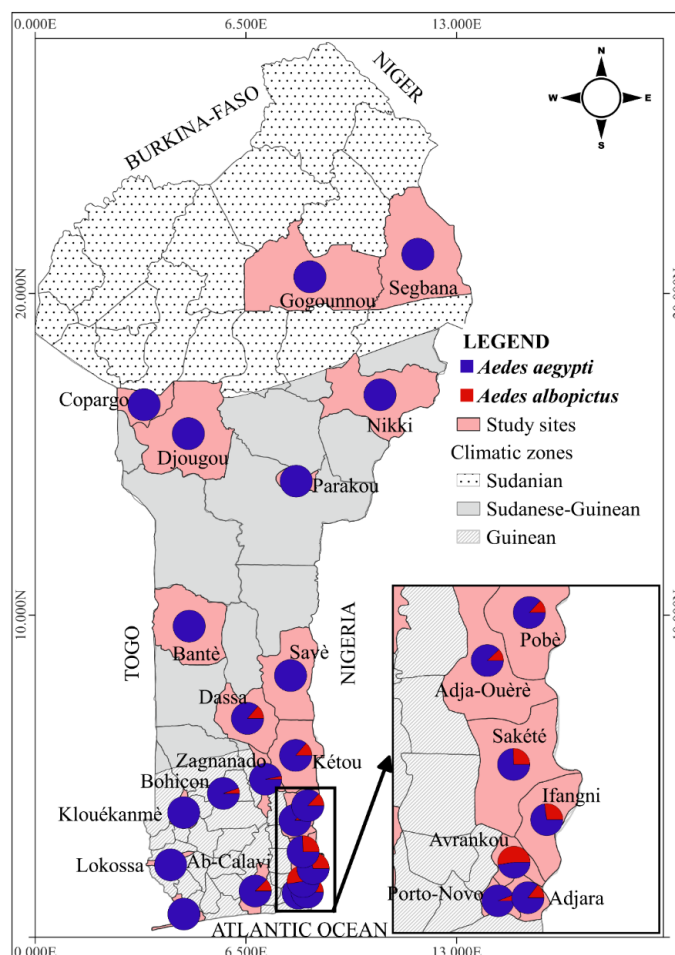


Figure 2. Distribution and relative abundance of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* on a North–South Benin transect * (* the map was drawn using the QGIS 3.32.2 Lima Software).

Specifically, in Southern Benin (subequatorial climate), the following species of *Aedes* spp. were reported: *Ae. aegypti* 71.27% (n = 7116); *Ae. albopictus* 23.71% (n = 2367); *Ae. luteocephalus* 4.34% (n = 433) and other *Aedes* species 0.69% (n = 69) (Table 3). In this climatic zone, *Ae. albopictus* was not collected in three communes (Lokossa, Klouékanmè and Grand-Popo).

However, the highest frequency of this mosquito species was recorded in Avrankou, a rural commune (51.72%: n = 196), and the lowest frequencies were recorded in Porto-Novo, an urban commune (7.41%: n = 133), and Zangnanado, a rural commune (3.08%: n = 6) (Table 1).

Table 3. Distribution and abundance of *Aedes* species by climate type in Benin.

Eco-Climatic Zones	<i>Ae aegypti</i>	<i>Ae albopictus</i>	<i>Ae luteocephalus</i>	<i>Others Aedes</i>	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Subequatorial climate (Oueme, Plateau, Atlantic, Mono, Couffo and Zou regions)	7116 (71.27)	2367 (23.71)	433 (4.34)	69 (4.34)	9985
Sudanese-Guinean climate (Collines, Donga and Borgou regions)	1879 (97.97)	33 (1.72)	1 (0.05)	5 (0.26)	1918
Sudanese climate (Alibori region)	513 (98.46)	0	1 (0.19)	7 (1.34)	521

Among the nine communes surveyed in the Sudano-Guinean and Sudanian areas, *Ae. Albopictus* was only collected in Dassa, a peri-urban commune, with a frequency of 1.35% (33/2439) (Table 3). As observed in Southern Benin (subequatorial climate), *Ae. aegypti* was also the predominant *Aedes* species in the northern part of the country where the climate was of the Sudano-Guinean or Sudanian type.

Table 4 shows the *Aedes* species composition and abundance according to the sampling method. Of the 12,424 specimens of *Aedes* spp. that were collected, the abundance and percentage for each was: ovitrap 66.75% (n = 8294); HLC 27.11% (n = 3368) and the collection of immature stages 6.13% (n = 762). *Ae. aegypti* (76.53%, 9508/12,424) and *Ae. albopictus* (19.32%, 2400/12,424) were the most abundant *Aedes* species collected using all three collection methods. Furthermore, the highest *Aedes* species diversity was observed using HLC.

Table 4. Abundance and diversity of *Aedes* species using the sampling method in Benin.

Climates and <i>Aedes</i> Species	Human Landing Catch (HLC)	Larvae and Pupae Collection	Ovitrap Method	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	N
Subequatorial climate				
<i>Ae aegypti</i>	1398 (19.65)	151 (2.12)	5567 (78.23)	7116
<i>Ae albopictus</i>	131 (5.53)	54 (2.28)	2182 (92.18)	2367
<i>Ae luteocephalus</i>	4 (0.92)	0 (0.00)	429 (99.08)	433
<i>Ae palpalis</i>	56 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	56
<i>Ae africanus</i>	3 (33.33)	6 (66.67)	0 (0.00)	9
<i>Ae vitatus</i>	4 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4
Sudano-Guinean climate				
<i>Ae aegypti</i>	1480 (78.77)	348 (18.52)	51 (2.71)	1879
<i>Ae albopictus</i>	33 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	33
<i>Ae vitatus</i>	4 (80.00)	0 (0.00)	1 (20.00)	5
<i>Ae luteocephalus</i>	0 (0.00)	1 (100.00)	0 (0.00)	1
Sudanian climate				
<i>Ae aegypti</i>	253 (49.32)	197 (38.40)	63 (12.28)	513
<i>Ae vitatus</i>	2 (28.57)	5 (71.43)	0 (0.00)	7
<i>Ae luteocephalus</i>	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (100.00)	1

Table 4. Cont.

Climates and <i>Aedes</i> Species	Human Landing Catch (HLC)	Larvae and Pupae Collection	Ovitrap Method	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	N
All areas				
<i>Ae. aegypti</i>	3131 (32.93)	688 (7.32)	5681 (59.75)	9508
<i>Ae. albopictus</i>	164 (6.83)	54 (2.25)	2182 (90.92)	2400
<i>Ae. luteocephalus</i>	4 (0.92)	1 (0.23)	430 (98.85)	435
<i>Ae. palpalis</i>	56 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	56
<i>Ae. africanus</i>	3 (33.33)	6 (66.67)	0 (0.00)	9
<i>Ae. vitatus</i>	10 (62.50)	5 (31.25)	1 (6.25)	16
Total	3368 (27.11)	762 (6.13)	8294 (66.75)	12,424

Ae. *Aedes*.

3.3. Molecular Identification of *Ae. albopictus*

A sample of 315 mosquitoes morphologically identified as *Ae. albopictus* were processed using a PCR. All the individuals that were analysed showed a 509 bp fragment, confirming them as *Ae. albopictus* (Table 5).

Table 5. Molecular identification of *Ae. albopictus* in Benin.

Localities (Communes)	N-Tested	N-Confirmed
Abomey-Calavi	26	26
Adjara	22	22
Avrankou	30	30
Ifangni	30	30
Kétou	22	22
Porto-Novo	30	30
Bohicon	29	29
Adja-ouère	30	30
Dassa	30	30
Pobè	30	30
Zangnanado	6	6
Sakété	30	30
Total	315	315

N: number.

3.4. Human Biting Rate (HBR) in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*

The biting rates of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* varied significantly from commune to commune, according to the location (indoor or outdoor). Overall, the mean biting rate for the whole study area was 4.31 bites/person/day (b/p/d) [4.02–4.61] for *Ae. aegypti* against 0.95 b/p/d [0.81–1.09] for *Ae. albopictus* (Tables 6 and 7). The biting rate of *Ae. Aegypti* was four times higher than *Ae. albopictus* ($p < 0.001$).

The highest biting rate of *Ae. aegypti* was recorded in July 2021 (rainy season) in Porto-Novo (9.38 b/p/d [7.93–11.00]) and the lowest in Avrankou in August 2022 (0.19 b/p/d [0.038–0.55]) (Table 6). For *Ae. albopictus*, the highest biting rate was observed in August 2022 in Avrankou (2.75 b/p/d [2.00–3.69]) and the lowest in Porto-Novo (0.38 b/p/d [0.14–0.82]) in July 2021 (Table 7).

The data also revealed that the mean outdoor HBR was higher in both species (7.02 b/p/d for *Ae. aegypti* and 1.51 b/p/d for *Ae. albopictus*) than the mean indoor HBR (1.59 b/p/d for *Ae. aegypti* and 0.39 b/p/d for *Ae. albopictus*). Similarly, the rate ratio (RR) < 1 observed for both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Tables 6 and 7) indicated that the risk for receiving mosquito bites was lower indoors than outdoors.

Table 6. HBR in *Ae aegypti* between July 2021 and October 2022.

Localities (Communes)	Periods	Nb <i>Ae aegypti</i> Collected			HBR/Day			CI-95%	
		Indoors	Outdoors	Total	Indoors	Outdoors	RR and CI-95%	Total HBR /Day	
Porto-Novo	May 2021	41	70	111	5.13 ^a	8.75 ^b	0.58 [0.38–0.87]	6.94	[5.71–8.35]
	July 2021	5	145	150	0.63 ^a	18.13 ^b	0.03 [0.01–0.08]	9.38	[7.93–11.00]
	October 2022	9	22	31	1.13 ^a	2.75 ^b	0.4 [0.16–0.92]	1.94	[1.32–2.75]
Total	Rainy season (May 2021–October 2022)	55	237	292	2.29 ^a	9.88 ^b	0.23 [0.17–0.31]	6.08	[5.41–6.82]
Ifangni	May 2021	7	49	56	0.88 ^a	6.13 ^b	0.14 [0.05–0.32]	3.5	[2.64–4.54]
	July 2021	13	40	53	1.63 ^a	5 ^b	0.32 [0.16–0.62]	3.31	[2.48–4.33]
	Rainy season (May–July 2021)	20	89	109	1.25 ^a	5.56 ^b	0.22 [0.13–0.37]	3.41	[2.80–4.11]
Kétou	Dry season (August 2022)	2	20	22	0.25 ^a	2.5 ^b	0.1 [0.01–0.41]	1.38	[0.86–2.08]
Avrankou	Dry season (August 2022)	1	2	3	0.13 ^a	0.25 ^a	0.5 [0.00–9.6]	0.19	[0.038–0.55]
Overall total	Dry and rainy seasons (May 2021–August 2022)	153	674	827	1.59 ^a	7.02 ^b	0.23 [0.19–0.27]	4.31	[4.02–4.61]

Nb: number; HBR: human biting rate; CI: confidence intervals; RR: rate ratio; HBR of *Ae aegypti* with different superscript (a, b) are significantly different ($p < 0.05$).

Table 7. HBR of *Ae albopictus* between July 2021 and October 2022.

Localities (Communes)	Periods	Nb <i>Ae albopictus</i> Collected			HBR/Day			Total HBR /Day	CI-95%
		Indoors	Outdoors	Total	Indoors	Outdoors	RR and CI-95%		
Porto-Novo	May 2021	2	5	7	0.25 ^a	0.63 ^a	0.4 [0.04–2.44]	0.44	[0.17–0.90]
	July 2021	1	5	6	0.13 ^a	0.63 ^b	0.2 [0.004–1.79]	0.38	[0.14–0.82]
	October 2022	2	13	15	0.25 ^a	1.63 ^a	0.15 [0.02–0.68]	0.94	[0.52–1.54]
Total	Rainy season (May 2021–October 2022)	5	23	28	0.21 ^a	0.96 ^b	0.22 [0.06–0.58]	0.58	[0.39–0.84]
Ifangni	May 2021	6	15	21	0.75 ^a	1.87 ^a	0.4 [0.13–1.09]	1.31	[0.81–2.00]
	July 2021	5	9	14	0.63 ^a	1.13 ^a	0.55 [0.15–1.84]	0.88	[0.48–1.47]
	Rainy season (May–July 2021)	11	24	35	0.69 ^a	1.50 ^b	0.46 [0.20–0.97]	1.09	[0.76–1.52]
Ketou	Dry season (August 2022)	0	12	12	0.00 ^a	1.50 ^b	0 [0.00–0.36]	0.75	[0.39–1.31]
Avrankou	Dry season (August 2022)	5	39	44	0.63 ^a	4.88 ^b	0.13 [0.04–0.32]	2.75	[2.00–3.69]
Overall total	Dry and rainy seasons (May 2021–August 2022)	37	145	182	0.39 ^a	1.51 ^b	0.25 [0.17–0.37]	0.95	[0.81–1.09]

Nb: number; HBR: human biting rate; CI: confidence intervals; RR: rate ratio; HBR of *Ae albopictus* with different superscript (a, b) are significantly different ($p < 0.05$).

3.5. Type of Breeding Sites

In the study area, the predominant mosquito larval habitats that were encountered included domestic containers (92.71% indoors and 85.90% outdoors), followed by tires (5.47% indoors and 13% outdoors). Discarded containers (1.42% indoors and 0% outdoors), natural containers (0.20% indoors and 0.73% outdoors) and other types of breeding sites (0.20% indoors and 0.37% outdoors) were also found, but at very low frequencies (<2%) (Figure 3).

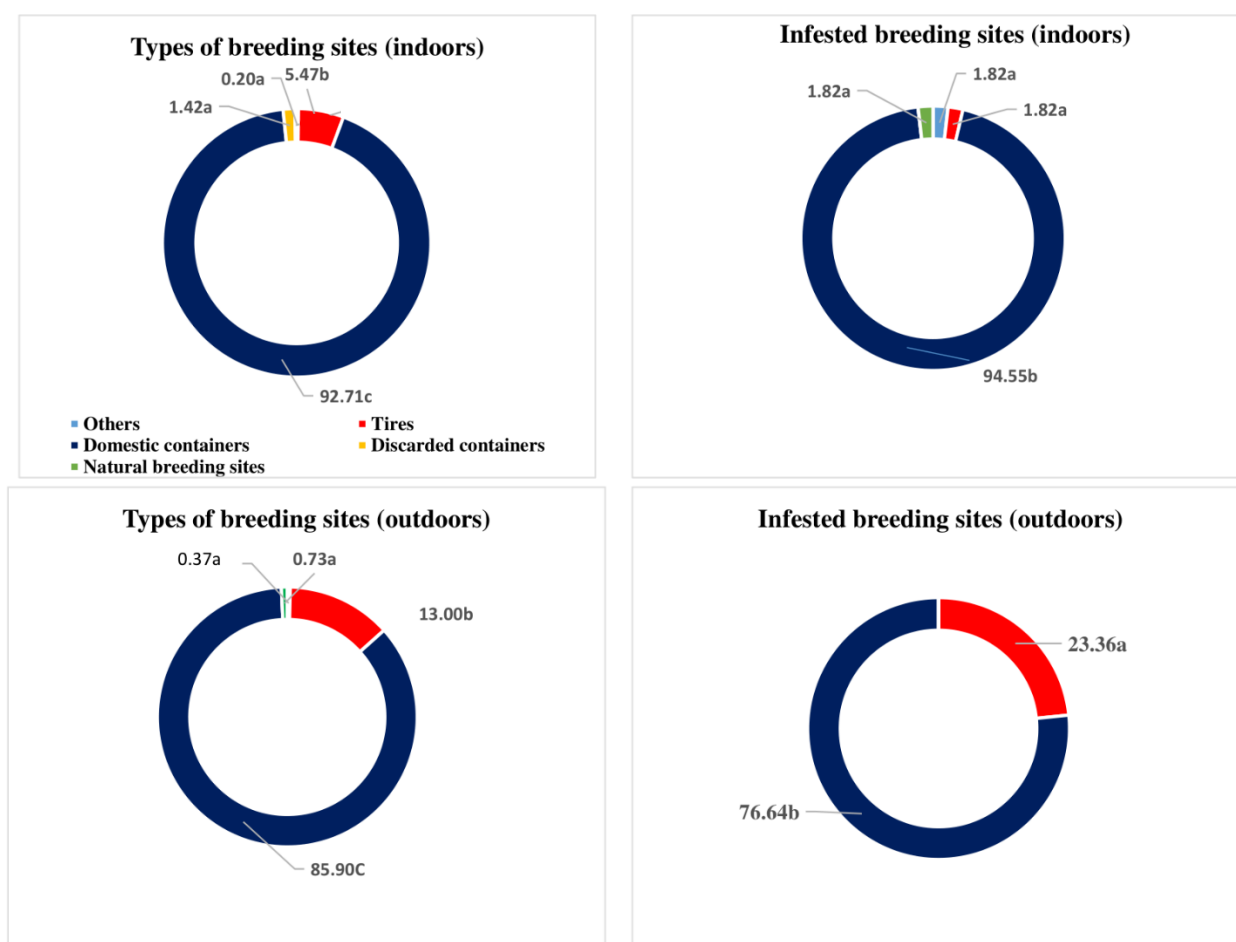


Figure 3. Proportion of the different types of breeding sites, as well as the positive sites inside and outside houses, in the study area.

When indoors, the breeding sites infested with *Aedes* larvae were mostly (94.55%) domestic containers (water storage containers: cement-made cisterns, earthen jars, flower-pots, drums, cups, buckets, garbage cans, pet water bowls, bottles, mortars, barrels). When outdoors, three quarters of the positive *Aedes* breeding sites were also domestic containers (76.64%) (plastic bags, abandoned refrigerators and freezers, tin cans and coconuts) and the rest was composed of tires (23.36%).

4. Discussion

Ae albopictus, a mosquito vector of arboviral diseases, has expanded its distribution area globally due to its ability to adapt to climate change and new environments [44–46]. The alarming increase in dengue fever cases in some West African countries in recent years has received relatively less attention in Benin. This situation is justified by the lack of information about the distribution of the main vectors that are involved. To the best of our knowledge, only one study confirmed the presence of *Ae. albopictus* in Benin [17]. This study provides an overview of the distribution and abundance of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in Benin and further identifies four other species of the *Aedes* genus.

The previous studies conducted in much smaller areas revealed the presence of four *Aedes* species in Cotonou [47] and three in Abomey-Calavi [21]. In the present study, *Ae. aegypti* was morphologically identified in all the surveyed communes with a relatively high frequency, ranging from 46.97% to 100%. This high abundance of *Ae. aegypti* could be

justified by the native character of this species since its introduction [48]. The distribution pattern of *Ae. albopictus* is very recent [17]. Our findings supported the competitive superiority of *Ae. aegypti* to *Ae. albopictus* in all the ecological settings. These findings were in accordance with previous studies in Benin and Ghana [49,50]. This abundance of *Ae. aegypti* in Africa and particularly in Benin was significantly associated with unprecedented urbanization, poor management of solid waste, the movement of people and goods and, above all, climate change [51]. Numerous studies had already mentioned this cohabitation between the two species in Brazil [52], Malaysia [53] and neighboring Nigeria [54]. It has been reported that competition during larval development is shaping the distribution of both species [55]. Additionally, the previous studies suggested that the invasion of *Ae. albopictus* in most parts of the world has induced a decline in the abundance of *Ae. aegypti* over time and could even lead to its disappearance when both of them share the same larval breeding site due to the satyrization effect [56]. However, this deserves further investigation and regular surveillance of the *Aedes* population dynamics. In our context in Benin, the conditions (ecological, climate or resources) were perhaps not yet sufficient for the rapid spread and dominance of *Ae. Albopictus*, as previously reported in other African countries invaded by this species such as Cameroon, Côte d'Ivoire and Nigeria [57].

Aedes aegypti was found cohabiting with *Ae. albopictus* at 12/23 sites in this study. Given that Benin is located in the same eco-geographical region and shares approximately 773 km of border with Nigeria, it is, therefore, not surprising that the same trend was observed in certain communes of Benin that border Nigeria. This trend was further sustained by the fact that the two species shared the same ecological niches/larval habitats. Similarly, in Mayotte, *Ae. albopictus* coexisted with *Ae. aegypti* in 40% of the breeding sites [56]. This was also observed in the Southern communes of Benin that were surveyed in the present study. The broadly similar relative abundance of *Ae. Albopictus* (51.72%) compared to the native species *Ae. aegypti* (46.97%) in Avrankou was not surprising since *Ae. Albopictus* had been described as one of the most invasive [44]. In neighboring Nigeria, for example, *Ae. albopictus* was detected in 1991 [13]. Since then, the published data have shown that the species has become well established and has already exhibited dominance over *Ae. aegypti* in some parts of the country [58]. Moreover, both the rural and peri-urban characters of Avrankou could have favored the coexistence of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in this commune. According to Forattini et al. [59], Brady et al. [60] and Brown et al. [61], the urban environment could favor the proliferation of *Ae. aegypti*, while rural and suburban areas could be much more favorable to the development of *Ae. albopictus*. This hypothesis was supported by the work of Kamgang et al. [62] in Cameroon and the Central African Republic who showed that *Ae. albopictus* preferentially colonised containers that contained plant debris or were surrounded by vegetation; the types of larval habitats often found in rural areas.

In the study area, the *Aedes* larvae colonised mostly domestic breeding sites, both indoors and outdoors. This could have been due to poor water storage practices since water is generally stored for a long time in uncovered and sometimes unwashed jars, buckets and barrels for drinking, laundry, dishwashing and various construction activities. The water contained in tires abandoned outdoors also served as excellent breeding sites for *Aedes* mosquitoes. This showed the importance of the sensitization of the populations and the need to avoid both long periods of water storage and keeping anything outdoors that can retain water.

Our study assessed the distribution of *Aedes* mosquito species in different geographical areas in Benin. Although the invasive species *Ae. albopictus* has been recognised to colonise and adapt under different climate conditions, its distribution in Benin was restricted to the regions with a subequatorial climate. This was previously reported by Adeleke et al. [63] who also noticed that the mosquitoes rapidly spread in the southern part of neighboring Nigeria after its first detection in 1991.

However, it has been reported that the invasion of this mosquito in some countries started in coastal areas [64] and subsequently progressed inland [46]. The low altitude of

the coastal region of Benin justified the high abundance of *Ae. Albopictus* in the coastal communes compared to the communes in the center and the north of the country where it was not detected. According to Farjana et al. [65], the presence and the population density of these invasive species were highly dependent on climatic factors, such as the temperature, precipitation and relative humidity. No specimen of this species was collected under the Sudanian and Sudano-Guinean climates observed in northern part of Benin, which were more arid or semi-arid with relatively higher temperatures. The presence of *Ae. aegypti* and the absence of *Ae. albopictus* was associated with a better tolerance to desiccation by *Ae. aegypti* unlike *Ae. albopictus* [66]. Our findings were in accordance with the previous studies in Cameroon [67] and the Central African Republic [6]. However, it should be noted that the other studies reported the presence of *Ae. albopictus* in semi-arid and arid areas in Pakistan and Saudi Arabia, where dengue fever outbreaks have previously been reported [68,69]. In this context, the systematic sampling of mosquitoes conducted during longitudinal surveys covering both dry and rainy seasons with a good spatial coverage are essential for assessing the real distribution area of *Ae. albopictus*, particularly in arid areas.

The ovitraps collected the greatest number of *Aedes* spp. in this study. This result suggested that ovitraps were more attractive to gravid females and facilitated the sampling of *Aedes*. This confirmed the results of the previous studies that reported that, in many outbreaks, ovitraps showed a positivity for the presence of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, whereas with larval collection or HLC, lower numbers of these vectors were detected [70,71].

The molecular data confirmed the presence of *Ae. albopictus* in the twelve communes where it was morphologically identified. This result was similar to that obtained by Yadouleton et al. [17] who confirmed the presence of this species in Benin using molecular evidence.

The evaluation of the biting behavior of *Ae. Aegypti* and *Ae. albopictus* performed in this study showed that these two vectors were mostly exophagic. This could be justified by the daytime biting behavior of *Aedes* mosquito species and the fact that the human hosts spent more time outdoors during the day. A similar trend was observed in Ghana [50] and Reunion Island. This exophagic behaviour of these main vectors could limit the effectiveness of vector control interventions that are often deployed inside homes, such as long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS). However, some studies conducted in Asia, Latin America [56,72], Côte d'Ivoire and Niger [73,74] revealed that *Ae. aegypti* was endophagic.

Although our study established the identification and distribution of *Ae. albopictus* in new localities in Benin, it did not focus on the diversity of the subspecies of *Ae. Aegypti* s.l. This was a limitation that offered possibilities for future studies on *Ae. aegypti* subspecies in Benin. Another limitation worth noting was the sequencing of cytochrome oxidase 1 gene (COX1) in *Ae. albopictus*, which would have made it possible to establish phylogenetic links between this species found in southeastern Benin and the original species from Asia [75]. In addition, the Breteau, Container and House indices, which are commonly used to measure the risk incurred in terms of arbovirus transmission [76,77], could have been assessed to strengthen the present study.

5. Conclusions

This study provided the first data on the distribution, abundance and biting behaviour of the main arbovirus vectors *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in Benin. It revealed that *Ae. albopictus* was well established in the southern part, but not in the northern part of Benin. Our findings supported the idea that arid climates prevailing in the northern part of Benin were not favorable for the establishment of the invasive species *Ae. albopictus*. A predominance of *Ae. aegypti* over *Ae. albopictus* was observed in all the investigated communes, with the exception of Avrankou, a southeastern commune of Benin bordering Nigeria. The study also reported that *Ae. aegypti* has become established in the domestic environment in Benin, with a high biting frequency of up to 4.02 bites/per person/day. The exophagic nature of these two vectors could limit the effectiveness of vector control

interventions that are often implemented indoors (LLINs and IRS). The current study provided a map showing the distribution of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* and will henceforth serve as a basis for the epidemiological surveillance of these vectors in Benin.

Author Contributions: Conceptualization, G.G.P., A.K.K., A.S.S., R.O., F.T.T. and M.C.A.; Methodology, J.M.A., C.J.A., A.K.K., L.B.-M., H.S. and M.C.A.; Software, A.A.S., B.A., A.K.K. and C.J.A.; Validation, G.G.P., A.K.K., A.S.S., R.A., R.O. and M.C.A.; Formal analysis, B.A., A.K.K. and A.S.S.; Investigation, A.K.K., A.S.S., A.A.S., B.A., D.M.Z., H.S., J.M.A., A.S. (Aboubakar Sidick) and A.S. (Arthur Sovi); Resources, G.G.P., L.B.-M. and M.C.A.; Data curation, A.K.K., D.M.Z. and A.S.S.; Writing-Original draft preparation, G.G.P., A.K.K., A.S.S. and A.S. (Arthur Sovi); Writing-Review and editing, A.A.S., D.M.Z., J.M.A., C.J.A., B.A., H.S., R.O., F.T.T., R.A., L.B.-M., M.C.A. and A.S. (Aboubakar Sidick); Visualization, G.G.P., H.S., L.B.-M. and M.C.A.; Supervision, G.G.P., A.S.S., R.O., F.T.T., R.A., L.B.-M., A.S. (Arthur Sovi) and M.C.A.; Project administration, G.G.P.; Funding acquisition, G.G.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The present study was financially supported by the Benin Ministry of Health, Grant MOH-20.

Institutional Review Board Statement: The protocol of the present study was reviewed and approved by the Comité Institutionnel d’Ethique pour la Recherche en Santé du Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CIERS-CREC) (Ethical approval N°06-22/CREC/CIERS-CREC/SG). The collectors used were selected from the different study sites and trained to collect mosquitoes before they bit. They all were vaccinated against yellow fever and were subjected to regular check-ups at the nearest health facility. In the occurrence of fever, they were immediately taken care of.

Informed Consent Statement: Informed written consent was requested from the heads of the sampled households and adult mosquito collectors.

Data Availability Statement: The datasets that were analysed in this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank the technicians and researchers of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) who provided technical support to the study both in the field and laboratory. We also acknowledge the local populations of the surveyed sites for their cooperation, as well as their leaders.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kraemer, M.U.; Sinka, M.E.; Duda, K.A.; Mylne, A.Q.; Shearer, F.M.; Barker, C.M.; Moore, C.G.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E.; Bortel, W.V.; et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* **2015**, *4*, e08347. [[CrossRef](#)]
2. Lwande, O.W.; Obanda, V.; Lindström, A.; Ahlm, C.; Evander, M.; Näslund, J.; Bucht, G. Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk factors for arbovirus pandemics. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2020**, *20*, 71–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Eritja, R.; Palmer, J.R.B.; David, R.; Sanpera-Calbet, I.; Bartumeus, F. Direct evidence of adult *Aedes albopictus* dispersal by car. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kraemer, M.U.; Reiner, R.C., Jr.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Gilbert, M.; Pigott, D.M.; Yi, D.; Johnson, K.; Earl, L.; Marczak, B.L.; et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 854–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ibáñez-Justicia, A. Pathways for introduction and dispersal of invasive *Aedes* mosquito species in Europe: A review. *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* **2020**, *38*, 1–10.
6. Kamgang, B.; Ngoagouni, C.; Manirakiza, A.; Nakoune, E.; Paupy, C.; Kazanji, M. Temporal patterns of abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and mitochondrial DNA analysis of *Ae. albopictus* in the Central African Republic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2590. [[CrossRef](#)]
7. Marini, G.; Manica, M.; Arnoldi, D.; Inama, E.; Rosà, R.; Rizzoli, A. Influence of temperature on the life-cycle dynamics of *Aedes albopictus* population established at temperate latitudes: A laboratory experiment. *Insects* **2020**, *11*, 808. [[CrossRef](#)]
8. Ferreira-de-Lima, V.H.; Câmara, D.C.P.; Honório, N.A.; Lima-Camara, T.N. The Asian tiger mosquito in Brazil: Observations on biology and ecological interactions since its first detection in 1986. *Acta Trop.* **2020**, *205*, 105386. [[CrossRef](#)]
9. Simard, F.; Nchoutpouen, E.; Toto, J.C.; Fontenille, D. Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J. Med. Entomol.* **2005**, *42*, 726–731. [[CrossRef](#)]
10. Leta, S.; Beyene, T.J.; De Clercq, E.M.; Amenu, K.; Kraemer, M.U.G.; Revie, C.W. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int. J. Infect. Dis.* **2018**, *67*, 25–35. [[CrossRef](#)]

11. Girard, M.; Nelson, C.B.; Picot, V.; Gubler, D.J. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine* **2020**, *38*, 3989–3994. [CrossRef] [PubMed]
12. Cornel, A.J.; Hunt, R.H. *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1991**, *7*, 107–108. [PubMed]
13. Savage, H.M.; Ezike, V.I.; Nwankwo, A.C.N.; Spiegel, R.; Miller, B.R. First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: Implications for arboviral transmission. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1992**, *8*, 101–103. [PubMed]
14. Fontenille, D.; Toto, J.C. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 1066–1067. [CrossRef]
15. Ngoagouni, C.; Kamgang, B.; Nakoune, E.; Paupy, C.; Kazanji, M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: What consequences for emerging diseases? *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 191. [CrossRef]
16. Paupy, C.; Ollomo, B.; Kamgang, B.; Moutailler, S.; Rousset, D.; Demanou, M.; Hervé, J.; Leroy, E.; Simard, F. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of dengue and chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 259–266. [CrossRef]
17. Yadouleton, A.; Hounkanrin, G.; Tchibo, C.; Bialonski, A.; Schmidt-Chanasit, J.; Jöst, H. First Detection of the Invasive Mosquito Vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa, 2021. *J. Med. Entomol.* **2022**, *59*, 1090–1094. [CrossRef]
18. Gautret, P.; Botelho-Nevers, E.; Charrel, R.N.; Parola, P. Dengue virus infections in travellers returning from Benin to France, July–August 2010. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 36. [CrossRef]
19. Eckerle, I.; Kapaun, A.; Junghanss, T.; Schnitzler, P.; Drosten, C.; Janisch, T. Dengue virus serotype 3 infection in traveler returning from West Africa to Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 175–177. [CrossRef]
20. Allanon, V.; Yanogo, P.; Sawadogo, B.; Akpo, Y.; Noudeke, D.N.; Saka, B.; Sourakatou, S. Investigation of dengue cases in the Atlantic, Littoral and Ouémé departments, Benin, April–July 2019. *J. Interv. Epidemiol. Public Health* **2021**, *3*, 5.
21. Padonou, G.G.; Ossè, R.; Salako, A.S.; Aikpon, R.; Sovi, A.; Kpanou, C.; Sagbohan, H.; Akadiri, Y.; Lamine, B.M.; Akogbeto, M.C. Entomological assessment of the risk of dengue outbreak in Abomey-Calavi Commune, Benin. *Trop. Med. Health* **2020**, *48*, 20. [CrossRef]
22. World Health Organization (WHO). Yellow Fever—African Region (AFRO). 2023. Available online: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON431> (accessed on 29 August 2023).
23. Tchibo, C.; Hounkanrin, G.; Yadouleton, A.; Bialonski, A.; Agboli, E.; Lühken, R.; Schmidt-Chanasit, J.; Jöst, H. Surveillance of arthropod-borne viruses in Benin, West Africa 2020–2021: Detection of dengue virus 3 in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mil. Med. Res.* **2022**, *9*, 64. [CrossRef]
24. Dieng, I.; Barry, M.A.; Talla, C.; Sow, B.; Faye, O.; Diagne, M.M.; Sall, A.A.; Fall, G.; Faye, O. Analysis of a Dengue Virus Outbreak in Rosso, Senegal 2021. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 420. [CrossRef]
25. European Centre for Disease Prevention and Control. Dengue Worldwide Overview. 2022. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly> (accessed on 8 August 2023).
26. Miller, E.; Huppert, A. The Effects of Host Diversity on Vector-Borne Disease: The Conditions under Which Diversity Will Amplify or Dilute the Disease Risk. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80279. [CrossRef] [PubMed]
27. Jentes, E.S.; Pomeroy, G.; Gershman, M.D.; Hill, D.R.; Lemarchand, J.; Lewis, R.F.; Staples, J.E.; Tomoro, O.; Wilder-Smith, A.; Monath, T.P. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: Consensus of the WHO Informal Working Group on Geographical Risk of Yellow Fever. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 622–632. [CrossRef]
28. Brady, O.J.; Gething, P.W.; Bhatt, S.; Messina, J.P.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G.; Moyes, C.L.; Farlow, A.W.; Scott, T.W.; Hay, S.I. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1760. [CrossRef]
29. Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; Drake, J.M.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G.; Sankoh, O. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507. [CrossRef] [PubMed]
30. Gnanglè, C.P.; Kakai, R.G.; Assogbadjo, A.E.; Vodounnon, S.; Yabi, J.A.; Sokpon, N. Tendances climatiques passées, modélisation, perceptions et adaptations locales au Bénin. *Climatologie* **2011**, *8*, 27–40. [CrossRef]
31. Ministère de l'Environnement, de l'Habitat et de l'Urbanisme. *Rapport National Sur la Diversité Biologique au Bénin*; Ministère de l'Environnement, de l'Habitat et de l'Urbanisme: Cotonou, Benin, 1998; 69p. Available online: <https://www.cbd.int/doc/world/bj/bj-nr-01-fr.pdf> (accessed on 8 August 2023).
32. Edwards, F.W. *Mosquitoes of the Ethiopian Region. III. Culicine Adults and Pupae*; OUP: Oxford, UK, 1941.
33. Yiau-Min, H. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Afrotropical Region with keys to the species (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* **2004**, *700*, 1–120.
34. Linton, Y.-M.; Harbach, R.E.; Chang, M.S.; Anthony, T.G.; Matusop, A. Morphological and molecular identity of *Anopheles* (*Cellia*) *sundaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. *Syst. Entomol.* **2001**, *26*, 357–366. [CrossRef]
35. Beckingham, K. Insect rDNA. In *The Cell Nucleus, Part A*; Busch, H., Rothblum, L., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1982; pp. 205–269.
36. Collins, F.H.; Paskewitz, S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.* **1996**, *5*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]

37. Porter, C.H.; Collins, F.H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *45*, 271–279. [CrossRef] [PubMed]
38. Wesson, L.; Eisenberg, D. Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Protein Sci.* **1992**, *1*, 227–235. [CrossRef]
39. Kjer, K.M.; Baldrige, G.D.; Fallon, A.M. Mosquito large subunit ribosomal RNA: Simultaneous alignment of primary and secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1217*, 147–155. [CrossRef] [PubMed]
40. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; CSHL: New York, NY, USA, 1989.
41. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 8 August 2023).
42. Shannon, C.E. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* **1948**, *27*, 379–423. [CrossRef]
43. Rothman, K.J. *Epidemiology: An Introduction*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2012.
44. Knudsen, A.B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitol* **1995**, *37*, 91–97.
45. Medlock, J.M.; Hansford, K.M.; Schaffner, F.; Versteirt, V.; Hendrickx, G.; Zeller, H.; Bortel, W.V. A review of the invasive mosquitoes in Europe: Ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 435–447. [CrossRef]
46. Bonizzoni, M.; Gasperi, G.; Chen, X.; James, A.A. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol.* **2013**, *29*, 460–468. [CrossRef]
47. Anges, Y.; Gado, D.; Ahadji-Dabla, K.M.; Ramziyath, A.; Carine, T.; Achaz, A.; Roland, T.; Lamine, B.M. Evaluation du comportement trophique de *Aedes aegypti* dans la ville de cotonou au sud du Bénin. *Eur. Sci. J.* **2018**, *14*, 70–79. [CrossRef]
48. Djènontin, A.; Bio-Bangana, S.; Moiroux, N.; Henry, M.C.; Bousari, O.; Chabi, J.; Ossè, R.; Koudénoukpo, S.; Corbel, V.; Akogbéto, M.; et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasites Vectors* **2010**, *3*, 83. [CrossRef]
49. Ndille, E.E.; Doucoure, S.; Damien, G.; Mouchet, F.; Drame, P.M.; Cornelie, S.; Noukpo, H.; Yamadjako, S.; Djenontin, A.; Moiroux, N.; et al. First Attempt to Validate Human IgG Antibody Response to Nterm-34kDa Salivary Peptide as Biomarker for Evaluating Exposure to *Aedes aegypti* Bites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1905.
50. Captain-Esoah, M.; Baidoo, P.K.; Frempong, K.K.; Adabie-Gomez, D.; Chabi, J.; Obuobi, D.; Amlalo, G.K.; Veriegh, F.B.; Donkor, M.; Asoala, V.; et al. Biting Behavior and Molecular Identification of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Subspecies in Some Selected Recent Yellow Fever Outbreak Communities in Northern Ghana. *J. Med. Entomol.* **2020**, *57*, 1239–1245. [CrossRef] [PubMed]
51. Kampango, A.; Furu, P.; Sarath, D.L.; Haji, K.A.; Konradsen, F.; Schiøler, K.L.; Alifrangis, M.; Saleh, F.; Weldon, C.W. Risk factors for occurrence and abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes bromeliae* at hotel compounds in Zanzibar. *Parasites Vectors* **2021**, *14*, 544. [CrossRef] [PubMed]
52. Braks, M.A.; Honorio, N.A.; Lourencqo-De-Oliveira, R.; Juliano, S.A.; Lounibos, L.P. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J. Med. Entomol.* **2003**, *40*, 785–794. [CrossRef] [PubMed]
53. Chen, C.D.; Nazni, W.A.; Lee, H.L.; Seleena, B.; Masri, S.M.; Chiang, Y.F.; Sofian-Azirun, M. Mixed breeding of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse in four dengue endemic areas in Kuala Lumpur and Selangor, Malaysia. *Trop. Biomed.* **2006**, *23*, 224–227. [PubMed]
54. Chukwuekezie, O.C.; Nwankwo, A.C.; Nwosu, E.O. Diversity and distribution of *Aedes* mosquitoes in Nigeria. *N. Y. Sci. J.* **2018**, *11*, 50–57.
55. Braks, M.A.H.; Honorio, N.A.; Lounibos, L.P.; Lourenco-De-Oliveira, R.; Juliano, S.A. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2004**, *97*, 130–139. [CrossRef]
56. Camara, D.C.; Codeço, C.T.; Juliano, S.A.; Lounibos, L.P.; Riback, T.I.; Pereira, G.R.; Honorio, N.A. Seasonal Differences in Density but Similar Competitive Impact of *Aedes albopictus* (Skuse) on *Aedes aegypti* (L.) in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157120. [CrossRef]
57. Egid, B.R.; Coulibaly, M.; Dadzie, S.K.; Kamgang, B.; McCall, P.J.; Sedda, L.; Toe, K.H.; Wilson, A.L. Review of the ecology and behaviour of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Western Africa and implications for vector control. *Curr. Res. Parasitol. Vector Borne Dis.* **2022**, *2*, 100074. [CrossRef]
58. Juliano, S.A.; Lounibos, L.P. Ecology of invasive mosquitoes: Effects on resident species and on human health. *Ecol. Lett.* **2005**, *8*, 558–574. [CrossRef]
59. Forattini, O.P. *Culicidaeologia Médica—Identificação, Biologiae Epidemiologia*; Edusp: São Paulo, Brazil, 2002; Volume 2.
60. Brady, O.J.; Johansson, M.A.; Guerra, C.A.; Bhatt, S.; Golding, N.; Pigott, D.M.; Delatte, H.; Grech, M.G.; Leishnam, P.T.; Maciel-de-Freitas, R.; et al. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites Vectors* **2013**, *6*, 351. [CrossRef] [PubMed]
61. Brown, J.E.; Evans, B.R.; Zheng, W.; Obas, V.; Barrera-Martinez, L.; Egizi, A.; Zhao, H.; Caccone, A.; Powell, J.R. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution* **2013**, *68*, 514–525. [CrossRef] [PubMed]
62. Kamgang, B.; Happi, J.Y.; Boisier, P.; Njiokou, F.; Herve, J.P.; Simard, F.; Paupy, C. Geographic and ecological distribution of the dengue and chikungunya virus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in three major Cameroonian towns. *Med. Vet. Entomol.* **2010**, *24*, 132–141. [CrossRef] [PubMed]

63. Adeleke, M.A.; Sam-Wobo, S.O.; Garza-Hernandez, J.A.; Oluwole, A.S.; Mafiana, C.F.; Reyes-Villanueva, F.; Rodriguez-Perez, M.A.; Mafiana, C.F. Twenty-three years after the first record of *Aedes albopictus* in Nigeria: Its current distribution and potential epidemiological implications. *Afr. Entomol.* **2015**, *23*, 348–355. [[CrossRef](#)]
64. Bennett, K.L.; Gómez, C.; Almanza, A.; Rovira, J.R.; McMillan, W.O.; Enriquez, V.; Barraza, E.; Diaz, M.; Sanchez-Galan, J.E.; Whiteman, A.; et al. High infestation of invasive *Aedes* mosquitoes in used tires along the local transport network of Panama. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 264. [[CrossRef](#)]
65. Farjana, T.; Tuno, N.; Higa, Y. Effects of temperature and diet on development and interspecies competition in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* **2012**, *26*, 210–217. [[CrossRef](#)]
66. Juliano, S.A.; O'Meara, G.F.; Morrill, J.R.; Cutwa, M.M. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Ecologia* **2002**, *130*, 458–469. [[CrossRef](#)]
67. Tedjou, A.N.; Kamgang, B.; Yougang, A.P.; Njiokou, F.; Wondji, C.S. Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007137. [[CrossRef](#)]
68. Humphrey, J.M.; Cleton, N.B.; Reusken, C.B.E.M.; Glesby, M.J.; Koopmans, M.P.G.; Abu-Raddad, L.J. Dengue in the Middle East and North Africa: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005194. [[CrossRef](#)]
69. Khan, J.; Khan, I.; Amin, I. A comprehensive entomological, serological and molecular study of 2013 dengue outbreak of swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147416. [[CrossRef](#)]
70. Nascimento, K.L.C.; da Silva, J.F.M.; Zequi, J.A.C.; Lopes, J. Comparison Between Larval Survey Index and Positive Ovitrap Index in the Evaluation of Populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) North of Paraná, Brazil. *Environ. Health Insights* **2020**, *14*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Okoye, C.F.; Onyido, A.E.; Chikwendu, J.I. Abundance of mosquito vectors of human diseases at the Awka campus of Nnamdi Azikiwe University, Awka Anambra state Nigeria. *Microbes Infect.* **2023**, *4*, 259–267. [[CrossRef](#)]
72. Reinhold, J.M.; Lazzari, C.R.; Lahondère, C. Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A review. *Insects* **2018**, *9*, 158. [[CrossRef](#)]
73. Diarrassouba, S.; Dossou-Yovo, J. Atypical activity rhythm in *Aedes aegypti* in a sub-sudanian savannah zone of Côte d'Ivoire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1997**, *90*, 361–363. (In French) [[PubMed](#)]
74. Labbo, R.; Doumma, A.; Mahamadou, I.; Arzika, I.; Soumana, A.; Kadri, S.; Idi, I.; Testa, J. Distribution and relative densities of *Aedes aegypti* in Niger. *Med. Sante Trop.* **2019**, *29*, 47–54.
75. Futami, K.; Valderrama, A.; Baldi, M.; Minakawa, N.; Rodriguez, R.M.; Chaves, L.F. New and Common Haplotypes Shape Genetic Diversity in Asian Tiger Mosquito Populations from Costa Rica and Panamá. *J. Econ. Entomol.* **2015**, *108*, 761–768. [[CrossRef](#)]
76. Bowman, L.R.; Runge-Ranzinger, S.; McCall, P.J. Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2848. [[CrossRef](#)]
77. Sanchez, L.; Vanlerberghe, V.; Alfonso, L.; Marquetti, M.C.; Guzman, M.G.; Bisset, J.; van der Stuyft, P. *Aedes aegypti* larval indices and risk for dengue epidemics. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 800–806. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

RESEARCH

Open Access



Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in southern Benin, West Africa

Alphonse Keller Konkon^{1,2*}, Germain Gil Padonou^{1,2}, Razaki Osse^{1,3}, Albert Sourou Salako¹, David Mahouton Zoungbédji^{1,2}, Haziz Sina^{2,4}, Arthur Sovi^{1,5,6}, Filemon Tokponnon¹, Rock Aïkpon^{7,8}, Herbert Noukpo¹, Lamine Baba-Moussa^{2,4} and Martin Codjo Akogbéto¹

Abstract

Background The emergence of insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes could undermine efforts to control arboviruses. The present study aims to assess in some communes of Southern Benin, the susceptibility level of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) to insecticides commonly used in public health, as well as mechanisms involved.

Methods Females *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* collected in Ifangni, Porto-Novo, Avrankou, Adjarra and Kétou from June 2021 to October 2022, were exposed to: deltamethrin 0.05%, permethrin 0.75%, alpha-cypermethrin 0.05%, pirimiphos methyl 0.25% and bendiocarb 0.1%, following the standard WHO susceptibility tube test protocol. In some sites, pre-exposure to the synergist PBO was used to verify if pyrethroid resistance of populations of *Aedes* was mediated by oxidases.

Results Full susceptibility to deltamethrin and permethrin was observed in all tested populations of *Ae. albopictus*. However, with alphacypermethrin, a suspected resistance was observed in Adjarra (94.67%), Ifangni (93%) and Porto-Novo (94%), and a resistance in Avrankou (83%). The PBO-alphacypermethrin tests performed, led to a full susceptibility (100%) in all four sites, which confirms the full involvement of oxidases in resistance of all tested populations of *Ae. albopictus* to alphacypermethrin. At the opposite, *Aedes aegypti* was either resistant or suspected of being resistant to all tested pyrethroids in all four sites, except in Ifangni where a full susceptibility to alphacypermethrin was observed. The full susceptibility of *Ae. aegypti* to bendiocarb and pirimiphos-methyl in all communes suggests that these two insecticides can be good candidates for an effective control of pyrethroid-resistant *Aedes* vector populations. Use of permethrin and deltamethrin could also be considered for controlling populations of *Ae. albopictus*.

Conclusion Results of the present study will help guide strategy to implement for an effective control of *Aedes* vector populations in Benin.

Keywords *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, Insecticide resistance diagnostics, Benin

*Correspondence:

Alphonse Keller Konkon

konkonkelleralphonse@gmail.com

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



© The Author(s) 2023. **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/>.

Background

Aedes aegypti is the main indigenous vector of arboviruses in Africa [1]. In Benin, it remains abundant in both the south and the north parts of the country [2, 3]. Recent studies have reported the presence of *Aedes albopictus*, a vector native to Asia, in Southern Benin [4, 5]. Indeed this mosquito species is known to be invasive, and was involved in several cases of arbovirus epidemics [6, 7]. Dengue which was considered more prevalent in Asia and Latin America, has now spread to several West African countries [8], where all four serotypes of the virus are actively circulating [9]. This worrying situation deserves more attention, as severe forms of the disease are often found in areas where more than two serotypes of the virus coexist [10, 11].

Several cases of dengue fever have been diagnosed in European tourists returning from Benin in recent years [12–14]. Indeed, those travelers have tested positive for DENV-1, a virus serotype native to Asia [14]. Moreover, DENV-3 was recently detected in a sample of *Aedes aegypti* from Porto-Novo, the political capital of Benin [15].

Several factors make Benin a country likely to experience an arbovirus epidemic. These factors include: the high demographic growth, the development of trade of second hand cars and tires, the development of tourism, the presence of two major vectors of arboviruses, the growing urbanization of the country, and its proximity with Nigeria, an endemic country with which it shares a 773 km border. Except for yellow fever for which an effective vaccine is available, the other arboviruses have no curative or preventive treatment [16]. As a result, vector control appears to be the only way to control the disease transmission [17]. This control could be through the use of chemicals for killing immature stages or adult mosquitoes, the destruction of vector breeding sites resulting in the reduction of their density, and the sensitization of the population on good practices for water conservation and sanitation. Even with a strong community engagement, it is quite difficult to identify and destroy all breeding sites in the environment. Therefore, chemical control through the implementation of spatial spraying, and use of long lasting insecticidal nets (LLINs) may be the most effective way to control dengue vectors. Several studies have recently reported resistance of *Aedes aegypti* to pyrethroids and carbamates in Africa and Asia [18–20]. *Ae. aegypti* is well adapted to urban habitats and, therefore, is generally more susceptible to insecticide exposure and resistance than *Ae. Albopictus* [21]. In West Africa, most of the available data on resistance of *Aedes* mosquitoes to insecticides, are for *Ae. aegypti* only, despite the reported introduction of *Ae. albopictus* in Nigeria since 1971. Recently, 238 and 380 confirmed cases of dengue

fever have been recorded in Senegal and Côte d'Ivoire, respectively [22, 23]. To plan an effective and sustainable control strategy against arbovirus vectors in Benin, there is an urgent need to determine the susceptibility level of *Ae. albopictus* to insecticides commonly used in public health, and update data on the resistance status of *Ae. aegypti*. The present study aims to assess the resistance profile of these two main vectors of arboviruses, in Benin.

Methods

Study area

The study was carried out in the urban and peri-urban areas of 6 communes belonging to two departments in Southern Benin. These are the communes of Avrankou, Adjara, and Porto-Novo in the department of Ouémé and the communes of Kétou, Ifangni and Pobè in the department of Plateau (Fig. 1). These communes that mostly neighbor Nigeria, were surveyed because of the presence recently reported of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* [6]. The whole study area is characterized by a subequatorial climate with two rainy seasons (March to July, and September to November) and two dry seasons (November to February and July to August) with rainfall ranging from 1200 to 1500 mm/year. There are three groups of ecosystems, namely, coastal plain ecosystems, bar land plateau ecosystems and Lama depression clay ecosystems. Long-lasting insecticidal nets (LLINs) distributed every three years throughout the country, and repellents are the main vector control tools used in the study area.

Mosquito collection

Three sampling techniques were used to collect immature stages and adults of *Aedes spp.* from July 2021 to October 2022. Irrespective of the collection method, the morphological identification of adult mosquitoes was performed using the taxonomic keys of Edwards [24] and Huang & Rueda [25].

Larvae collection

Immature stages of *Aedes spp.* were sampled from various breeding sites (abandoned jars, tires, cans, and other containers) using the dipping technique. They were filtered and stored in labeled jars, and then transported to the insectary of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) for rearing until adulthood.

Ovitraping method

The ovitraps were used as part of the present study. They were made of polyethylene bottles which were filled with 50 cl of water. A hardboard plate (5 cm by 20 cm) immersed into the water, served as support for the eggs laid. A total of 12 ovitraps were set per site. These traps were hung on a tree/wall at a height of 1.5 m from the

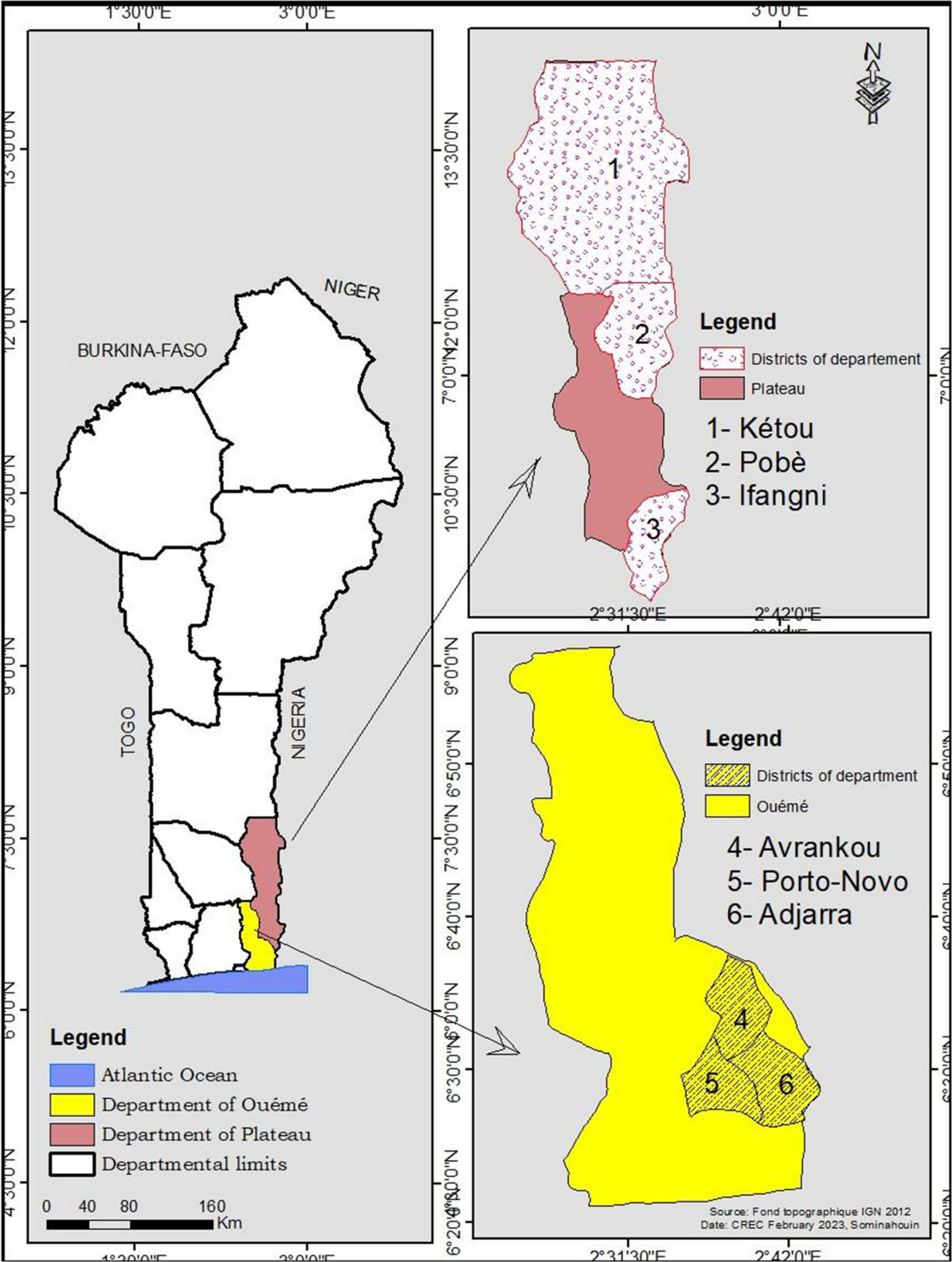


Fig. 1 Map showing the study area

ground, using a nail and a metal string, and left for one week in the domestic or peri-domestic environment. To avoid egg-hatching, the inspection of traps occurred on a daily basis. They were removed after 7 days, and the eggs laid on the hardboard plates were brought back to the insectary and put in water. After the hatching, the larvae were reared until adult stage.

Human landing catches

This method was used to collect adults of *Aedes* spp. during the day. In all study communes, mosquito collections were conducted both indoors and outdoors, with a first group of collectors that worked from 7:00 am to 1:00 pm and which was replaced by a second group from 1:00 pm to 6:00 pm. At each collection point, a volunteer with bare-legged and barefoot serving as bait, collected mosquitoes using hemolysis tubes and a flashlight. The specimens of *Aedes* spp. that were collected, were released in cages and transported to the insectary.

Biological materials

Females *Ae. aegypti* field-collected as larvae, were used for the WHO susceptibility tube testing.

For *Ae. albopictus*, mosquitoes from the three collection methods were reared at the insectary, in order to have a sufficient number of individuals of F1 generation. Only the females mosquito of this generation, were used for the WHO susceptibility tube testing.

Insecticide susceptibility tests

WHO susceptibility tube tests were performed according to the WHO protocol [26], using non-blood-fed females *Ae. aegypti* (F0) and *Ae. albopictus* (F1), aged 2–5 days. These mosquitoes were exposed to the following products:

- deltamethrin (0.05%), permethrin (0.75%), and alphacypermethrin (0.05%);
- alphacypermethrin (0.05%) + PBO (4%).

Batches of 20–25 mosquitoes were introduced into each tube carpeted with an insecticide-treated paper for a 1-h exposure. The number of mosquitoes knocked down by the insecticide at different time intervals (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min) was recorded. A batch of 20–25 mosquitoes exposed to an insecticide-free paper was used as a control.

The PBO synergist is an inhibitor of oxidases [27]. It helped assessing the involvement of oxidases in the pyrethroid resistance observed in the populations of *Aedes*. The PBO-pyrethroid, and pyrethroid-only tests were performed simultaneously on the same mosquito populations. After 60 min of exposure, mosquitoes were

transferred into observation tubes and kept at 25 °C and 80% humidity, with free access to a 10% sweetened juice. Mortality after 24 h was determined according to the WHO protocol.

Biochemical analyses

Thirty females *Ae. aegypti* from each district, aged 2–5 days, and non-previously exposed to any insecticide, were used for biochemical analyses. These were performed to compare the expression level of detoxification enzymes (mixed function oxidases, non-specific esterases and glutathione S-transferases) of different populations of *Aedes aegypti* to the reference susceptible strain (Rockefeller), following the protocol described by Hemingway et al. [28].

Data analysis

Mortality rates from the susceptibility tube tests were interpreted according to the WHO protocol [26]. When a mosquito population had a mortality rate between 98 and 100%, it was considered susceptible. When mortality was between 90 and 97%, the population was suspected of resistance. Below a mortality rate of 90%, the population was said resistant. The 24-h mortality rates and the 60-min knockdown rates were compared using the Chi-square test for comparison of proportions. A linear regression with analysis of variance was used to assess the variation in enzyme activity for each mosquito population. The Mann–Whitney *U* test was used to compare the enzyme activity between the field mosquito populations and the susceptible laboratory strain (Rockefeller). Statistical analyses were performed using R 3.3.2 software [29].

Results

Mortality and knockdown rates

In total, 3517 females *Aedes* (1787 *Ae. aegypti*, and 1730 *Ae. albopictus*), were bioassayed.

Table 1 shows the pyrethroid-induced mortalities in the different *Aedes* mosquito populations. After 60 min of exposure to the different insecticides, the knockdown rates observed in *Ae. albopictus* was very high in all communes, ranging between 94 and 100% (Table 1). A 100% mortality rate was observed in the different populations of *Ae. albopictus* exposed to deltamethrin and permethrin, which indicates a full susceptibility of these populations to the two tested pyrethroids (Table 1). Similarly, the population of *Ae. albopictus* from Kétou showed full susceptibility to alphacypermethrin (100%). However, with the same product, a suspected resistance was observed in Adjara (94.67% [86.19–98.27]), Ifangni (94.38% [86.78–97.91]) and Porto-Novo (95.7%

Table 1 Mortality observed 24 h after exposure of *Aedes albopictus* to permethrin, deltamethrin and alpha-cypermethrin

Insecticides	Districts	Nb of <i>Aedes albopictus</i> tested	Mean knockdown after 60 min (%) (95% CI)	Mean mortality (%) after 24 h (95% CI)	Resistance status
Alpha-cypermethrin (0.05%)	Avrankou	100	100 [95.38–100]	83 [73.89–89.50]	R
	Adjarra	75	100 [93.92–100]	94.67 [86.19–98.27]	SR
	Porto-Novo	93	95.7 [88.73–98.61]	95.7 [88.73–98.61]	SR
	Kétou	89	100 [94.84–100]	100 [94.84–100]	S
	Ifangni	89	94.38 [86.78–97.91]	94.38 [86.78–97.91]	SR
Deltamethrin (0.05%)	Avrankou	92	100 [95.00–100]	100 [95.00–100]	S
	Adjarra	100	100 [95.38–100]	100 [95.38–100]	S
	Porto-Novo	93	100 [95.05–100]	100 [95.05–100]	S
	Kétou	90	100 [94.89–100]	100 [94.89–100]	S
	Ifangni	90	100 [94.89–100]	100 [94.89–100]	S
Permethrin (0.75%)	Avrankou	93	100 [95.05–100]	100 [95.05–100]	S
	Adjarra	85	100 [94.61–100]	100 [94.61–100]	S
	Porto-Novo	94	98.93 [93.37–99.94]	100 [95.10–100]	S
	Kétou	95	100 [95.15–100]	100 [95.15–100]	S
	Ifangni	95	100 [95.15–100]	100 [95.15–100]	S

Nb number, R resistance, SR suspected resistance, S susceptibility

[88.73–98.61]), and a resistance in Avrankou (83% [73.89–89.50]) (Table 1).

In the populations of *Ae. aegypti*, a different trend was observed, with much more variable 60-min knockdown rates. Indeed, irrespective of the pyrethroid insecticide, these rates ranged from 63.51% [51.45–74.16] in Porto-Novo to 100% [95.29–100] in Ifangni (Table 2). 24-h post-exposure, populations of *Ae. aegypti* from Avrankou (91% [83.16–95.54]), Adjarra

(93.75% [85.38–97.67]), Porto-Novo (93.51% [84.89–97.58]) and Kétou (95.65% [88.61–98.59]) showed a suspected resistance to alpha-cypermethrin (0.05%), while the one of Ifangni displayed a full susceptibility to the same insecticide (Table 2). With deltamethrin (0.05%), a suspected resistance was observed in Avrankou (95% [88.17–98.14]), Adjarra (95.29% [87.73–98.48]), Ifangni (90.91% [83.00–95.49]), and Kétou (93.87% [86.62–97.48]), while there was a

Table 2 Mortality observed 24 h after exposure of *Aedes aegypti* to permethrin, deltamethrin and alpha-cypermethrin

Insecticides	Districts	Nb of <i>Aedes aegypti</i> tested	Mean knockdown after 60 min (95% CI)	Mean mortality after 24 h (95% CI)	Resistance status
Alpha-cypermethrin (0.05%)	Avrankou	100	91.00 [83.16–95.54]	91.00 [83.16–95.54]	SR
	Adjarra	80	93.75 [85.38–97.67]	93.75 [85.38–97.67]	SR
	Porto-Novo	77	93.51 [84.89–97.58]	93.51 [84.89–97.58]	SR
	Kétou	92	95.65 [88.61–98.59]	95.65 [88.61–98.59]	SR
	Ifangni	98	100.00 [95.29–100]	100.00 [95.29–100]	SS
Deltamethrin (0.05%)	Avrankou	100	95.00 [88.17–98.14]	95.00 [88.17–98.14]	SR
	Adjarra	85	95.29 [87.73–98.48]	95.29 [87.73–98.48]	SR
	Porto-Novo	74	63.51 [51.45–74.16]	63.51 [51.45–74.16]	R
	Kétou	98	93.87 [86.62–97.48]	93.87 [86.62–97.48]	SR
	Ifangni	99	90.91 [83.00–95.49]	90.91 [83.00–95.49]	SR
Permethrin (0.75%)	Avrankou	99	89.89 [81.79–94.78]	89.89 [81.79–94.78]	R
	Adjarra	90	84.44 [74.93–90.93]	84.44 [74.93–90.93]	R
	Porto-Novo	84	77.38 [66.70–85.50]	77.38 [66.70–85.50]	R
	Kétou	95	84.21 [74.97–90.60]	84.21 [74.97–90.60]	R
	Ifangni	100	97 [90.84–99.22]	97 [90.84–99.22]	SR

Nb number, R resistance, SR suspected resistance, S susceptibility

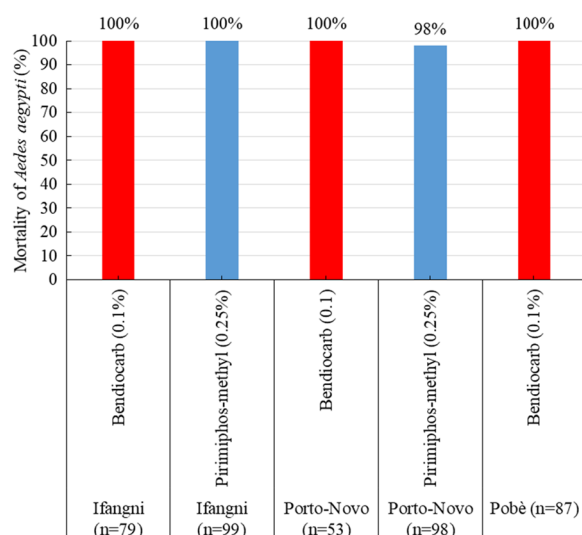


Fig. 2 Mortalities observed 24 h after exposure of *Ae. aegypti* to bendiocarb and pirimiphos methyl

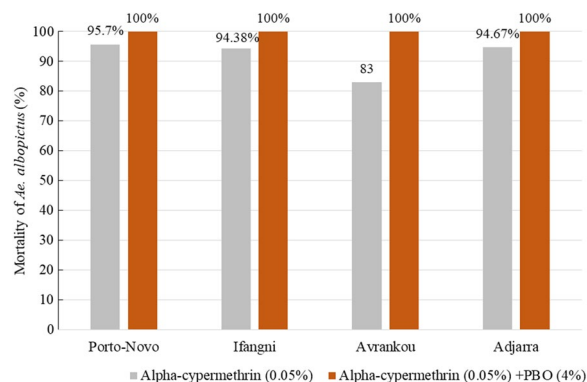


Fig. 3 Mortality rates of *Aedes albopictus* with alpha-cypermethrin alone and alpha-cypermethrin + PBO

resistance to the same product in Porto-Novo (63.51% [51.45–74.16]). Furthermore, resistance to permethrin was observed in all tested populations of *Ae. aegypti*, except for the Ifangni strain that displayed a suspected resistance (97% [90.84–99.22]) (Table 2).

Figure 2 shows the mortality induced by bendiocarb and pirimiphos methyl. Overall, all tested populations of *Ae. aegypti* displayed a full susceptibility (mortality rates $\geq 98\%$) with these two products.

The PBO-alpha-cypermethrin tests performed with the four field strains of *Ae. albopictus* led to a mortality rate = 100% and higher than the one for the insecticide alone, indicating a full involvement of oxidases and esterases in alphacypermethrin resistance (Fig. 3).

Expression of oxidases, esterases and GSTs in *Aedes aegypti*

Figure 4 shows the mean levels of enzyme activities in the field populations of *Ae. aegypti*, and in the reference susceptible strain (Rockefeller).

The results show an overexpression of GSTs in the population of *Ae. aegypti* from Pobè ($P < 0.0001$) compared to the Rockefeller susceptible strain (Fig. 4A). A significantly elevated oxidase activity was observed in the populations of *Ae. aegypti* from Pobè and Ifangni, compared with that of the Rockefeller susceptible strain ($P > 0.001$) (Fig. 4B). In contrast, no overexpression of the α and β esterase activity was seen in all the tested populations compared with the Rockefeller susceptible strain (Fig. 4C, D).

Discussion

Studies on insecticide resistance profile have long been performed in Benin in *Anopheles* vectors of malaria, but very little is done on *Aedes* responsible for arboviruses, even though the country is close to countries Nigeria, Ghana, Cote d'Ivoire, Burkina-Faso that in recent years have become dengue endemic. Recently, *Ae. albopictus*, a highly invasive Asian mosquito, has entered Benin and lives in sympatry with *Aedes aegypti* in urban and peri-urban areas [4]. Both species are described as the main vectors of arboviruses [3, 4]. The present study provides knowledge on their insecticide resistance profile, which will help to better orient the vector control strategy to implement in case of a dengue epidemic.

Findings of the present study showed full phenotypic susceptibility of the different populations of *Ae. albopictus* tested to permethrin and deltamethrin, despite the widespread resistance observed of *Anopheles* vectors and *Ae. aegypti* to these two pyrethroids in Benin [4, 30]. This could be because permethrin and deltamethrin are among the type II pyrethroids with high toxicity. However, with alpha-cypermethrin, *Ae. albopictus* was resistant in Avrankou, and suspected of resistance in Adjarra, Porto-Novo and Ifangni. This shows the beginning of the emergence of resistance of *Ae. albopictus* to alphacypermethrin, a type I pyrethroid with a relatively low toxicity compared to type IIs. Previous studies had already revealed a relative susceptibility of this mosquito species to pyrethroids [21]. This onset of resistance of *Ae. albopictus* to pyrethroids was reported by Ngo et al. [31] and Yougang et al. [32] in the cities of Douala and Yaoundé in Cameroon, respectively. According to these authors, this rapid expansion of resistance in *Ae. albopictus* could result from domestic or organic pollutants, as this species is widely distributed in water tanks, spare tires and discarded containers, which are widely distributed in cultivated agricultural sites [33]. It is also possible that

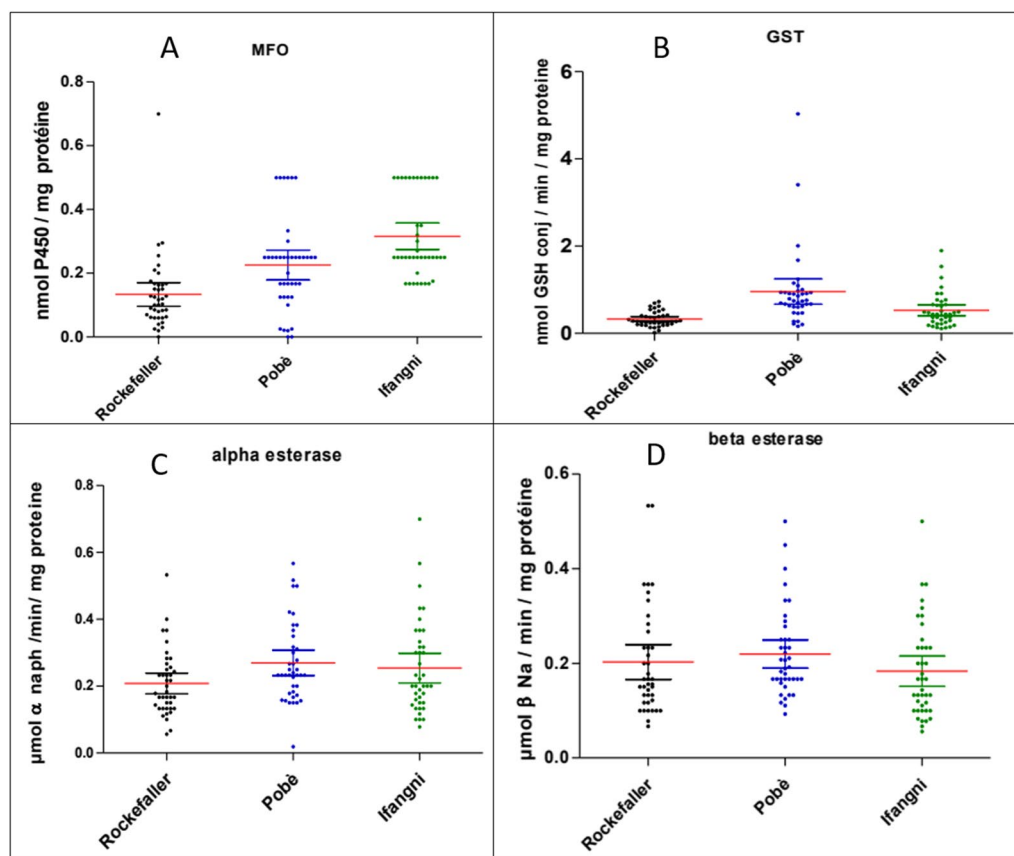


Fig. 4 Activities of glutathione-S-transferase (A), mono-oxygenase (B), β -esterases (C), and α -esterases (D) in *Ae. aegypti* collected at Pobè and Ifangni

the susceptibility of this species has been affected by the increased use of repellent insecticides in peri-urban settings. However, this resistance of *Ae. albopictus* to alpha-cypermethrin was reversed by the synergist PBO in all communes, confirming the involvement of oxidases in pyrethroid resistance in the localities studied [34]. The deployment of next-generation LLINs combining the PBO synergist with a pyrethroid insecticide could be considered an alternative option for an effective control of populations of *Ae. albopictus*. At the opposite, *Ae. aegypti* was found to be much more resistant or suspected of being resistant to pyrethroids. Similar observations were previously made in Cameroon [32]. This supports the hypothesis of an occurrence of a strong insecticide resistance selection in *Ae. aegypti* relative to *Aedes albopictus*. It is likely that these species exhibit different biting and resting behaviors, which could explain variable insecticide exposure. Indeed, *Ae. aegypti* has been frequently collected indoors in urban environments, while *Ae. albopictus* is much more sampled outdoors in a peri-urban environment. This particular behavior of *Ae. aegypti* could

expose it more to indoor insecticide-based interventions such as insecticide sprays, aerosols, or LLINs to prevent nuisance in urban settings [35–38]. This high resistance of *Ae. aegypti* compared to *Ae. albopictus* has been reported in different epidemiological settings in Central and West African countries [39–41] such as Benin [3]. Reduced susceptibility of *Aedes* mosquitoes to pyrethroids is widespread and has been reported in several countries [17]. Our results corroborate previous studies from Thailand that reported high resistance to deltamethrin and permethrin in *Ae. aegypti* [42, 43]. Our biochemical data revealed the overexpression of MFOs and GSTs in populations of *Ae. aegypti* from Ifangni and Pobè. Oxidases are involved in the detoxification of pyrethroids in mosquitoes [44, 45]. The enormous quantities of insecticides of the same class used in agriculture could be at the origin of this overproduction of oxidases. The glutathione-S-transferase activity observed in our vector populations confirms the strong resistance to DDT observed by Yadouleton et al. [2] in *Ae. aegypti* in Benin. High GST expression may be due to overexpression of the GST2 gene [45].

In contrast, the low esterase activity observed would certainly be because the vectors from Ifangni and Pobè have not been or are weakly exposed to carbamates and organophosphates. However, a full susceptibility of populations of *Ae. aegypti* to bendiocarb and pyrimiphos-methyl was observed in all the surveyed communes. This can be explained by the low esterase activity observed in Ifangni and Pobè, where the use of pyrimiphos methyl and carbamates is low. It would be also interesting to characterize the *Kdr* and *Ace-1R* resistance mechanisms in populations of *Aedes* vectors, as they are commonly found in *Anopheles* mosquitoes. Carbamates and organophosphates could also be considered a good alternative for the control of arbovirus vectors in Benin in case of epidemics. Though our findings suggest that permethrin and deltamethrin could also be used, there is a growing concern that *Ae. albopictus* develop resistance to these pyrethroid insecticides. *Ae. aegypti* may develop other resistance mechanisms, such as behavioral or physiological one, to circumvent the modes of action of these insecticides. It would be interesting to investigate all the resistance mechanisms in *Ae. aegypti* to establish its full resistance profile to make good vector control decisions.

Conclusion

The present study showed full susceptibility of *Ae. albopictus* to deltamethrin and permethrin but widespread resistance to pyrethroids in *Ae. aegypti* in the study area. This suggests that these insecticides (deltamethrin and permethrin) can be used in arboviruses control programs in sites where *Ae. albopictus* is reported as the main vector. Given pyrethroids resistance observed in *Ae. aegypti*, and the emergence alpha-cypermethrin resistance in *Ae. albopictus*, rational use of insecticides, especially pyrethroids, should be encouraged to help reduce insecticide pressure. The synergist PBO increased the mortality of *Ae. albopictus* to alpha-cypermethrin, showing the involvement of oxidases. However, full susceptibility of *Ae. aegypti* to bendiocarb and pyrimiphos methyl was observed in all study communes.

Given the increasing number of dengue cases in neighboring countries, strategies to improve vector control and prevent the spread of the diseases in Benin are urgently needed.

Abbreviations

CREC	Centre de recherche entomologique de cotonou
WHO	World Health Organization
LLINs	Long-lasting insecticidal nets
GST	Glutathione-S-transferase
DDT	Dichlorodiphenylchloroethane
MFO	Mixed function oxygenases

PBO	Piperonyl butoxide
HLC	Human landing catches

Acknowledgements

We are grateful to the Ministry of Health of Benin who financially supported this study through the national research budget. We also thank the technicians and researchers of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC) who provided technical support to the study both in the field and in the laboratory.

Author contributions

The original study was conducted by GGP, KKA, RO, ASS, and MCA who also supplied the data. The idea for the study was conceptualized and generated by GGP, KAK, RO, ASS, LB, and MCA. Data were collected by KAK, MDZ, ASS, AS, RA, HN and HS. KAK, ASS, AS and GGP drafted the manuscript. Statistical data analysis by ASS and KAK. GGP, LB and MCA provided intellectual criticism on the content of the manuscript. All authors have read and approved the final submitted manuscript.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets that were analyzed in this study are available from the corresponding author and the lead author.

Declarations

Ethics for approval and consent to participate

The protocol for this study was reviewed and approved by the Institutional Health Research Ethics Committee of the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CIERS-CREC) of Benin in accordance with favorable ethical opinion N°06-22/CREC/CIERS-CREC/SG. The risk of mosquito collectors contracting yellow fever was minimized by identifying them on site as they already had some immunity due to their prolonged exposure to mosquitoes. They have all been vaccinated against yellow fever and are regularly monitored. In the event of a confirmed outbreak of fever, they are immediately attended to by the team doctor. Larval survey in jars, tires and domestic containers is carried out with the consent of the house owners.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604, Cotonou, Benin. ²Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ³École de Gestion et d'exploitation des Systèmes d'élevage de l'Université Nationale d'Agriculture de Porto-Novo, Porto-Novo, Benin. ⁴Department of Biochemistry and Cellular Biology, Laboratory of Biology and Molecular Typing in Microbiology, University of Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. ⁵Faculty of Agronomy, University of Parakou, Parakou, Benin. ⁶Faculty of Infectious and Tropical Diseases, The London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. ⁷Ministère de la Santé, 08 BP 882, Cotonou, Benin. ⁸Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie Et Mathématiques (UNSTIM), Abomey, Benin.

Received: 6 February 2023 Accepted: 9 April 2023

Published online: 21 April 2023

References

- Frédéric S, Elysée N, Jean CT, Didier F. Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J Med Entomol*. 2005;42:726–31.

2. Anges Y, Gado D, Ahadj-Dabla KM, Ramziyath A, Carine T, Achaz A, et al. Evaluation du comportement trophique de *Aedes aegypti* dans la ville de cotonou au sud du Bénin. *Eur Sci J*. 2018;14:70–9.
3. Padonou GG, Ossè R, Salako AS, Aikpon R, Sovi A, Kpanou C, et al. Entomological evaluation of the risk of dengue epidemic in the commune of Abomey-Calavi, Benin. *Trop Med Health*. 2020;48(1):1–9.
4. Yadouleton A, Hounkanrin G, Tchiboza C, Bialonski A, Schmidt-Chanasit J, Jöst H. First detection of the invasive mosquito vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa, 2021. *J Med Entomol*. 2022;59(3):1090–4.
5. Padonou GG, Konkon KA, Salako SA, Zougbedji MD, Ossè R, Tokponnon F, et al. Distribution and abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa. In press.
6. Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*. 2019;4:854–63.
7. Abdalgader T, Banerjee M, Zhang L. Spatially weak synchronization of spreading pattern between *Aedes albopictus* and dengue fever. *Ecol Modell*. 2022;473:110123.
8. Stoler J, Dashti R, Anto F, Fobil JN, Awandare GA. Deconstructing malaria: West Africa as the next front for dengue fever surveillance and control. *Acta Trop*. 2014;134:58–65.
9. Tinto B, Kania D, Kagone TS, Dicko A, Traore I, de Rekeneire N, et al. Circulation du virus de la dengue en Afrique de l'Ouest—Une problématique émergente de santé publique. *Médecine/sciences*. 2022;38(2):152–8.
10. Gubler DJ. Epidemic Dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002;10(2):100–3.
11. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
12. Gautret P, Botelho-Nevers E, Charrel RN, Parola P. Dengue virus infections in travellers returning from Benin to France, July–August 2010. *Euro Surveill*. 2010;15:36.
13. Eckerle I, Kapaun A, Junghans T, Schnitzler P, Drosten C, Jänisch T. Dengue virus serotype 3 infection in a traveler returning from West Africa in Germany. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(1):175.
14. Fourié T, Luciani L, Amrane S, Zandotti C, Leparc-Goffart I, Ninove L, et al. Dengue virus type 1 infection in traveler returning from Benin to France, 2019. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8):1946–9.
15. Tchiboza C, Hounkanrin G, Yadouleton A, et al. Surveillance of arthropod-borne viruses in Benin, West Africa—2021: detection of dengue virus 3 in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Military Med Res*. 2022;9:64.
16. Londono-Renteria B, Troupin A, Colpitts TM. Arbovirosis and potential transmission blocking vaccines. *Parasit Vectors*. 2016;9:516.
17. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koo SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in major *Aedes* vectors of human-infecting arboviruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):e0005625.
18. Sene NM, Mavridis K, Ndiaye EH, Diagne CT, Gaye A, Ngom EHM, et al. Insecticide resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* populations from Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(5):e0009393.
19. Jangir PK, Prasad A. Spatial distribution of insecticide resistance and susceptibility in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in India. *Int J Trop Insect Sci*. 2022;42:1019–44.
20. Toé HK, Zongo S, Moussa W, Guelbeogo BK, Mafalda V, Madou T, et al. Multiple insecticide resistance and first evidence of V410L kdr mutation in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) from Burkina Faso. *Med Vet Entomol*. 2022;36(3):309–19.
21. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pest Biochem Physiol*. 2012;104(2):126–31.
22. Dieng I, Barry MA, Talla C, Sow B, Faye O, Diagne MM, et al. Analysis of a dengue virus outbreak in Rosso, Senegal 2021. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7(12):420.
23. European Centre for Disease Prevention and Control. Dengue worldwide overview. 2022.
24. Edwards FW. Mosquitoes of the Ethiopian region. III. Culicine adults and pupae. London: British Museum (Natural History); 1941. p. 499.
25. Huang YMIN, Leopoldo MR. Pictorial keys to the sections, groups, and species of the *Aedes* (Finlaya) in the Afrotropical Region (Diptera: Culicidae) *Zootaxa*. 2017; 4221:131–141.
26. World Health Organization. Testing procedures for monitoring insecticide resistance in malaria vector mosquitoes. Geneva: World Health Organization; 2013.
27. Khot AC, Bingham G, Field LM, Moores GD. A new assay reveals esterase blockade by piperonyl butoxide. *Pest Manag Sci*. 2008;64(11):1139–42.
28. 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.
29. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2011.
30. Kpanou CD, Sagbohan HW, Dagnon F, Padonou GG, Ossè R, Salako AS, et al. Characterization of the resistance profile (intensity and mechanisms) of *Anopheles gambiae* in three communes of northern Benin, West Africa. *Malar J*. 2021;20(1):1–2.
31. Ngo Hondt OE, Ngo Hiol JV, Tonga C, Ga FD, Kekeunou S. Competitive adaptation of *Aedes albopictus*, Skuse 1894 in the presence of *Aedes aegypti* Linné 1862 in temporary larvae breeding sites and in the context of pyrethroids resistance in Douala (Cameroon). *Bull Ent Soc Amer*. 2020;113(2):79–87.
32. Yougang AP, Kamgang B, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Njiokou F, Wondji CS. Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *PLoS ONE*. 2020;15(6):e0234572.
33. Wilke ABB, Vasquez C, Carvajal A, Medina J, Chase C, Cardenas G, et al. Proliferation of *Aedes aegypti* in urban environments mediated by the availability of key aquatic habitats. *Sci Rep*. 2020;10(1):12925.
34. Lumjuan N, Wicheer J, Leelapat P, Choochote W, Somboon P. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aldehyde dehydrogenases involved in pyrethroid metabolism. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e102746.
35. Chen CD, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Center and Selangor State, Malaysia. *Trop Biomed*. 2005;22(2):207–16.
36. Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol*. 2005;42(5):844–9.
37. Ouattara LP, Sangaré I, Namountougou M, Hien A, Ouari A, Soma DD, et al. Surveys of arbovirus vectors in four cities stretching along a railway transect of Burkina Faso: risk transmission and insecticide susceptibility status of potential vectors. *Front Vet Sci*. 2019;6:140.
38. Marcombe S, Fustec B, Cattel J, Chonephetsarath S, Thammavong P, Phommavan N, et al. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):e0007852.
39. Amelia-Yap ZH, Chen CD, Sofian-Azirun M, Low VL. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: current status and management perspectives. *Parasit Vectors*. 2018;11:332.
40. Namountougou M, Soma DD, Balboné M, Kaboré DA, Kientega M, Hien A, et al. Monitoring insecticide sensibility in *Aedes Aegypti* populations from the two biggest cities, Ouagadougou and Bobo-Dioulasso, in Burkina Faso: implication of metabolic resistance. *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(2):84.
41. Leong CS, Vythilingam I, Wong ML, Sulaiman WY, Lau YL. *Aedes aegypti* (Linnaeus) larvae from dengue outbreak areas in Selangor exhibiting pyrethroid resistance but susceptible to organophosphates. *Acta Trop*. 2018;185:115–26.
42. Somboon P, Prapanthadara LA, Suwonkerd W. Insecticide susceptibility testing of *Anopheles minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med*. 2003;34(1):87–93.
43. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*. 1988;9(3):295–318.
44. Ishaaya I. Detoxifying enzymes of insects: their importance in pesticide synergism and resistance. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1993;22(1–2):263–76.
45. 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(11):e27760.

Publisher's Note

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



International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906

CODEN: IJMRK2

IJMR 2023; 10(4): 01-06

© 2023 IJMR

www.dipterajournal.com

Received: 01-04-2023

Accepted: 03-05-2023

Alphonse Keller Konkon¹ Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Germain Gil Padonou**¹ Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Albert Sourou Salako**

Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

David Mahouton Zoungbédji¹ Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin**Juvenal Minassou Ahouandjinou**

Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

Arsène Jacques YH Fassinou

Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

Haziz Sina

Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

Lamine Baba-Moussa¹ Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin
² Laboratoire de biologie et de typage moléculaire en microbiologie, Département de biochimie et de biologie cellulaire, Bénin**Martin Akogbéto**

Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin

Corresponding Author:**Alphonse Keller Konkon**¹ Centre de Recherche entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou 06 BP 2604, Benin² Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, Benin

Association of Culicidae larvae and effectiveness of 0.4% S-methoprene Mosquilarv in reducing *Aedes* density in southern Benin

Alphonse Keller Konkon, Germain Gil Padonou, Albert Sourou Salako, David Mahouton Zoungbédji, Juvenal Minassou Ahouandjinou, Arsène Jacques YH Fassinou, Haziz Sina, Lamine Baba-Moussa and Martin Akogbéto

DOI: <https://doi.org/10.22271/23487941.2023.v10.i4a.679>

Abstract

This study evaluated the efficacy of Mosquilarv containing 0.4% S-methoprene in reducing population densities of *Aedes* spp. Oviposition traps treated with 1.5 mg Mosquilarv granules containing 0.4% S-methoprene and untreated controls were placed in houses where natural breeding sites of *Aedes* spp. are often found traps were collected 7 days later, eggs were counted and kept under rearing conditions until complete emergence of larvae in control traps and death or emergence of larvae in traps treated with 0.4% Mosquilarv. Our results show a predominance of the *Aedes* vector species collected in Porto-Novo and Ifangni. *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* share the same ovitraps. The results revealed a considerable reduction in emergence in treated ovitraps, ranging from 64.42% to 93.53%. Mosquilarv with 0.4% S-methoprene showed interesting results in reducing the density of *Aedes* spp vectors and could be considered as a response and prevention tool for possible dengue epidemics in Benin.

Keywords: S-methoprene, ovitrap, *Aedes*, dengue, sympatry, Benin

1. Introduction

In recent years, several cases of dengue epidemics have been reported in the West African region ^[1]. Indeed, dengue fever outbreaks have been reported in Ivory Coast ^[2], Burkina Faso, Senegal, and Nigeria ^[3]. Several other arboviruses are prevalent in the same African zone. For instance, Cape Verde has recorded the Zika virus, and chikungunya was detected in Senegal in 2015 ^[4]. Moreover, recent epidemics have involved Rift Valley fever in Niger in 2016, with epidemic foci in Senegal and Mali ^[5], as well as Lassa fever in Nigeria. Dengue is a disease caused by a Flavivirus mainly transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. This disease has been rapidly expanding worldwide over the past decade. In 2019, 4.2 million cases of dengue were reported, with 125 countries at risk worldwide and 20,000 deaths occurring annually ^[6,7]. In Benin, cases of dengue have been reported among both native people and French tourists in recent years ^[8-10]. Children are the most vulnerable to dengue infection, but it should be noted that the incidence increases in older age groups ^[11]. Several factors, most of them man-made, increase the risk of the disease, such as urbanization, unprecedented population growth in major cities, and poor lifestyle hygiene, which promote the reproduction of the vector population ^[12]. *Aedes albopictus* has made its way into Benin and is increasingly populating localities in the south of the country. *Aedes aegypti* is found throughout Benin, both in urban and peri-urban areas that are becoming densely populated, confirming the anthropophilic nature of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. In fact, since 1950, the density of the urban human population has tripled in Africa. Slums are associated with an increased risk of dengue infection, as the artificial collection of water increases the habitat available to *Aedes* vectors. Control and elimination of dengue vectors remain the most important options in long-term dengue control programmes. Without an effective vaccine and specific treatment, integrated vector management approaches such as source reduction,

insecticide use, biological control, public education and awareness, and personal protection offer the most promising results. Insecticide use remains a major component of antivector control strategy, especially during an epidemic. The insecticides frequently used belong to the pyrethroid class, against which vectors have developed resistance. Insect Growth Regulators (IGRs) present themselves as an alternative. Insect growth regulators (IGRs) are a group of chemicals containing substances with growth retarding and inhibiting properties^[13]. Generally, insect growth regulators are effective larvicides against mosquito larvae and have low toxicity to mammals and a good safety margin for most other non-target organisms^[14]. Based on this foundation, this study was initiated to evaluate the effectiveness of Mosquilarv at 0.4% S-methoprene for controlling dengue vectors in Benin.

2. Materials and methods

2.1 Study site

The study area is in the southeast of Benin and includes the municipalities of Porto-Novo and Ifangni. These municipalities have a subequatorial humid climate with two rainy seasons and two dry seasons. In both study municipalities, two districts and two villages from each of these districts were selected, including one peripheral and one central village. Oviposition traps used for collecting *Aedes* eggs were placed in the districts of Anavié, Tokpota, Dowa, and Gbodjè in the municipality of Porto-Novo, and in the districts of Banigbé, Igolo, Doke, and Babudjo in the municipality of Ifangni (Figure 1).

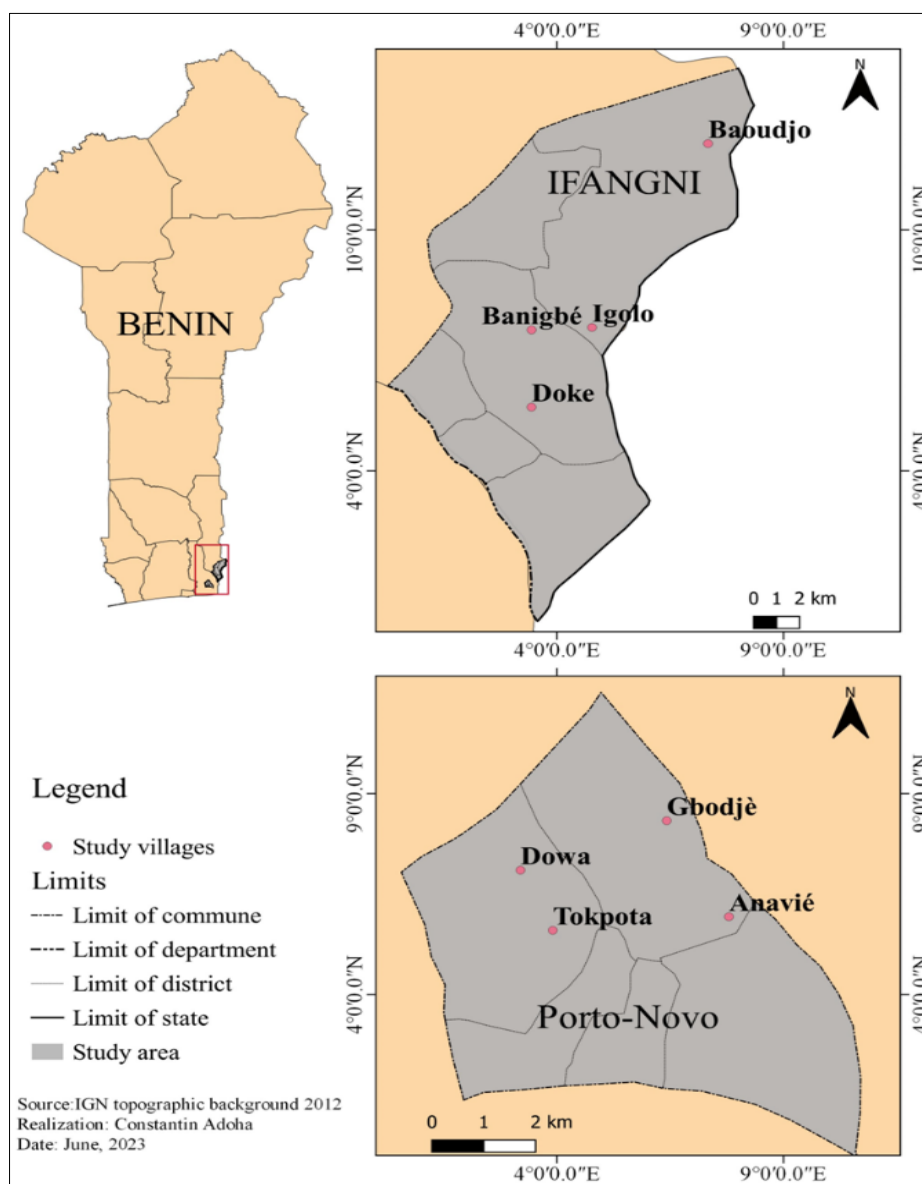


Fig 1: Study sites in the municipalities of Porto-Novo and Ifangni

2.2 Installation and Treatment of Oviposition Traps with 0.4% S-methoprene Mosquilarv

Oviposition traps, or oviposition containers, were made using cut polyethylene bottles with a volume of 80 cl, painted black. They were filled with 50 cl of water, and a 5 cm by 20 cm isorel plaque was placed in the water to serve as a support for

the eggs. A total of 24 oviposition traps were set up per village, with 12 control traps and 12 traps treated with 1.5 mg of Mosquilarv granules containing 0.4% S-methoprene. The oviposition traps were spaced approximately 100 meters apart. The traps were placed at a height of 1.5 cm above the ground, suspended by a nail and a metal string, either on a

tree or a wall, and left in place for a week in domestic environments (Within the courtyards) or in peri-domestic areas. They are inspected regularly every day by local agents recruited in such a way as not to give the eggs time to hatch. This frequent monitoring ensured that any eggs that might hatch did not have enough time to develop into adults. The isorel supports with the eggs were collected, wrapped in absorbent paper, and brought back to the laboratory for egg counting per trap. After counting, the supports were immersed in water collected from the field traps to facilitate egg hatching. The larvae were fed throughout the trial with a yeast broth at a concentration of 10 mg/l at regular two-day intervals until complete emergence in the control group. After hatching, the emerged adults were counted, identified, and categorized based on whether they originated from the control traps, or the traps treated with 0.4% S-methoprene Mosquilarv.

2.3 Statistical Analysis

The chi-square test of proportion comparison was used to compare the proportions of eggs and the emergence rate in the oviposition traps treated with 0.4% S-methoprene Mosquilarv compared to the control. A descriptive analysis of mosquito

diversity was conducted after emergence using proportions. The Reduction Rate (RR) of emergence by Mosquilarv was calculated using the following formula: $RR = (Pre-test - Pctrl/Pctrl) * 100$, where RR is the reduction rate, Pre-test is the proportion of mosquitoes that emerged from the treated traps, and Pctrl is the proportion of mosquitoes that emerged from the untreated traps. All analyses were performed using version 4.1.3 of the R software.

3. Results

3.1 Species of Culicidae Collected in Oviposition Traps

The species of Culicidae trapped in the oviposition traps were studied. The data analysis reveals the presence of three species in the municipalities of Ifangni and Porto-Novo, including two dengue vector species, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, as well as *Culex quinquefasciatus*. In Porto-Novo, *Aedes aegypti* was the most abundant species (89.70%), followed by *Aedes albopictus* (8.02%) and *Culex quinquefasciatus* (2.28%) (Table 1). In Ifangni, a similar trend was observed, with the abundance of *Aedes aegypti* (77.18%) followed by *Aedes albopictus* (19.52%) and *Culex quinquefasciatus* (3.31%).

Table 1: Species of Culicidae Collected in Oviposition Traps

Municipalities	Districts	<i>Aedes aegypti</i> % (n)	<i>Aedes albopictus</i> % (n)	<i>Culex quinquefasciatus</i> % (n)
Porto-Novo	Anavié	60.29 (123)	29.41(60)	10.29 (21)
	Tokpota	92.07 (267)	5.86(17)	2.07 (6)
	Dowa	97.84 (317)	2.16 (7)	0(0)
	Gbodje	96.99 (355)	3.01 (11)	0 (0)
	Total	89.70 (1062)	8.02(95)	2.28 (27)
Ifangni	Banigbe	83.45 (489)	13.65 (80)	2.90(17)
	Igolo	93.66 (133)	6.34(9)	0(0)
	Doke	71.53(201)	24.20(68)	4.27 (12)
	Baoudjo	69.33 (391)	26.60(150)	4.08 (23)
	Total	77.18 (1214)	19.52 (307)	3.31 (52)

n: count; %: percentage

Association or non-association of Culicidae species in the oviposition traps and collection sites

In the districts of Anavié, Tokpota, Dowa, and Gbodje in the municipality of Porto-Novo, as well as in Banigbe, Igolo, Doke, and Baoudjo in the municipality of Ifangni (Table 2), *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* share the same oviposition traps. The two species are described as sympatric in the oviposition traps. This is also the case for *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, but not in all districts such as Dowa and

Gbodje in Porto-Novo and Igolo in Ifangni. The associations *Ae. aegypti/Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus/Cx. quinquefasciatus* are identical regardless of the locality. However, this sympatric relationship was not observed in the oviposition traps for the species triplet *Aedes albopictus/Aedes aegypti/Culex quinquefasciatus*. *Ae. albopictus* was not found alone in the oviposition traps, nor was *Cx. quinquefasciatus*, unlike *Ae. aegypti*.

Table 2: Association or non-association of Culicidae species in the oviposition traps and collection sites

Species	Association or non-association in the oviposition traps							
	Municipality of Porto-Novo				Municipality of Ifangni			
	Districts				Districts			
	Anavié	Tokpota	Dowa	Gbodje	Banigbe	Igolo	Doke	Baoudjo
<i>Aedes albopictus/Aedes aegypti</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Aedes aegypti/Culex quinquefasciatus</i>	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes
<i>Ae. albopictus/Culex quinquefasciatus</i>	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes
<i>Aedes albopictus/Aedes aegypti/Culex quinquefasciatus</i>	No	No	No	No	No	No	No	No
<i>Aedes aegypti</i> seule	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Aedes albopictus</i> alone	No	No	No	No	No	No	No	No
<i>Culex quinquefasciatus</i> alone	No	No	No	No	No	No	No	No

3.2 Evaluation of the degree of infestation by *Aedes*

According to figure 2, a large proportion of the nests were

positive (nests with eggs on the isorel supports) in both Ifangni and Porto-Novo. Positive rates of 95.83%, 87.5%,

70.83% and 66.67% were recorded in the districts of Baoudjo, Banigbe, Igolo and Doke respectively. In Porto-Novo, the

rates were 62.5%, 66.67%, 62.5% and 54.17% in Anavie, Tokpota, Dowa and Gbodje respectively.

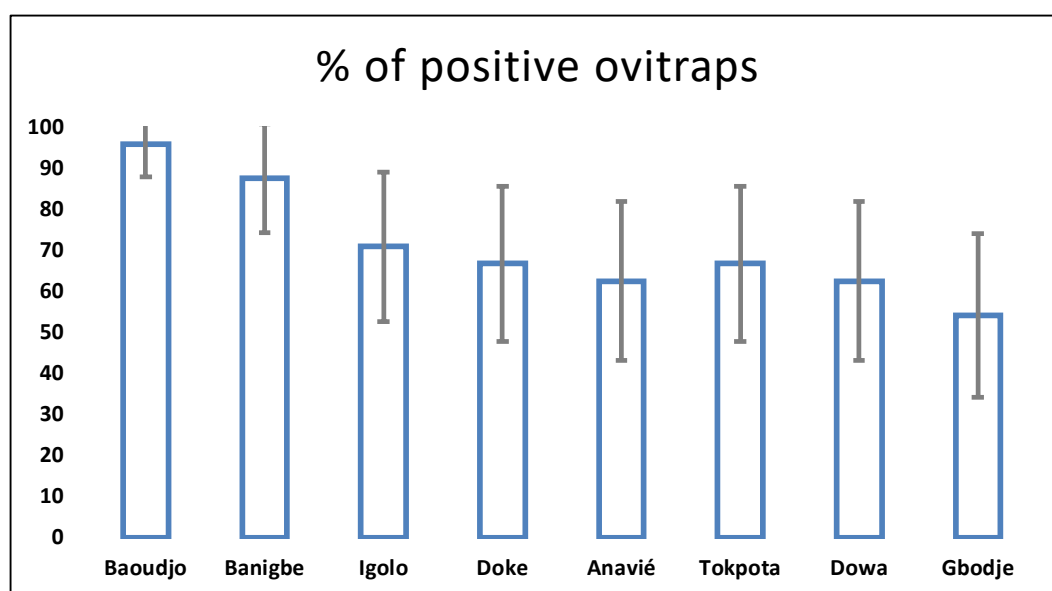


Fig 2: Proportions of positive oviposition traps in Ifangni and Porto-Novo.

3.3. Estimation of the risk of infestation of oviposition traps by *Aedes* eggs

The proportions of eggs counted from the plates of the pondoir traps vary depending on each locality and indirectly reflect the degree of infestation of the traps. In the Porto-Novo municipality, a significant difference was observed between the treated and untreated pondoir traps in the Tokpota (CTRL: 60.86%; Test: 39.12%), Dowa (CTRL: 69.40%; Test: 30.60%), and Gbodjè (CTRL: 75.89%; Test: 24.11%) districts, where the proportion of eggs in the treated traps is higher than in the control traps. At Anavie no difference was observed between the proportion of eggs collected by treated and control traps (CTRL: 46.76%; Test: 53.24%). A

difference was observed between the proportions of eggs collected from the treated and untreated traps in the Igolo and Doke districts of the Ifangni municipality. The proportions of eggs collected from the treated traps (64.44%) were significantly higher than those collected from the untreated traps (35.56%) in Igolo, while the opposite was observed in Doke (CTRL: 57.55%; Test: 42.45%). In the Banigbe and Baoudjo districts, no difference was observed between the proportions of eggs in the treated and untreated traps. Overall, considering all localities, no significant difference was observed for the proportions of eggs between the two categories of traps.

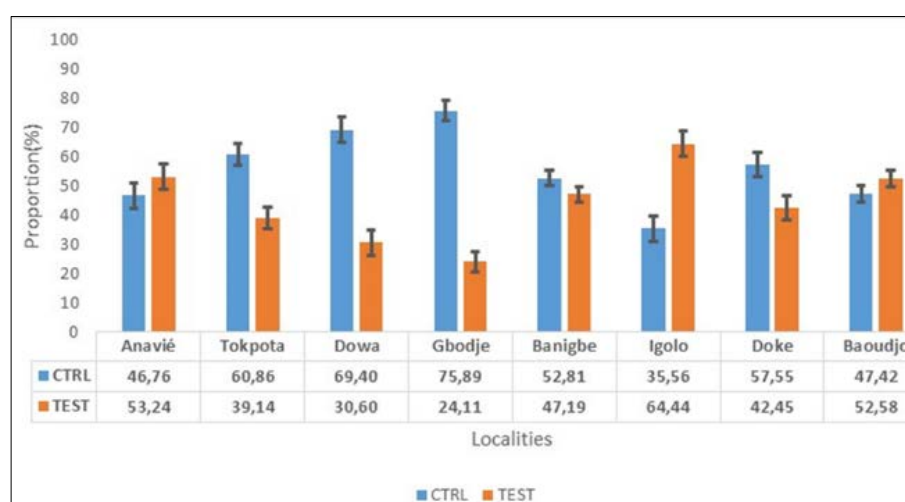


Fig 3: Degree of infestation of ovitraps by *Aedes* spp. eggs.

3.4. Impact of Mosquilarv on the inhibition of *Aedes* spp. larval development

A total of 1341 eggs were collected from the control oviposition site (untreated) and 785 from the Mosquilarv-treated oviposition site in the Porto-Novo municipality. Upon

complete emergence, 1038 adults were collected from the control traps and 146 from the test traps. The emergence rates ranged from 61.46% to 92.01% with an average of 77.40% in the control group. In the test group, the emergence rates ranged from 9.96% to 26.09% with an average of 18.60%. In

the Ifangni municipality, 1714 eggs were collected from the control traps compared to 1752 from the treated traps. The emergence data showed a total of 1412 adults emerged from the control group compared to 161 adults from the ponds treated with Mosquilarv. The emergence rates ranged from 73.33% to 88.59% with an average of 82.38% in the control group. However, in the test group, it ranged from 5.29% to

13.98% with an average of 9.19%. Overall, the emergence rates in the untreated traps were significantly higher than those in the treated traps regardless of the considered locality ($P=0.001$). The results revealed a considerable reduction in emergence in the treated ponds ranging from 64.42% to 93.53% (Table 3).

Table 3: Impact of Mosquilarv on the inhibition of larval development of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*

Districts	Number of collected eggs		Number of hatched eggs		Number of emerged mosquitoes				Emergence rate (%)		P-value	Reduction (%)
					<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>				
	CTRL	TEST	CTRL	TEST	CTRL	TEST	CTRL	TEST	CTRL	TEST		
Anavié	238	271	238	271	101	55	22	5	74.37	9.96	< 0.001	-86.608
Tokpota	384	247	384	247	217	15	52	2	61.46	21.86	< 0.001	-64.42
Dowa	313	138	313	138	281	7	36	0	92.01	26.09	< 0.001	-71.64
Gbodje	406	129	406	129	328	9	27	2	83.00	22.48	< 0.001	-72.91
Total	1341	785	1341	785	927	86	137	9	77.40	18.60	< 0.001	-75.97
Banigbe	677	605	677	605	557	80	32	0	81.83	5.29	< 0.001	-93.53
Igolo	165	299	165	299	112	9	21	0	73.33	7.02	< 0.001	-90.42
Doke	320	236	320	236	171	65	30	3	77.50	13.98	< 0.001	-81.957
Baoudjo	552	612	552	612	331	133	57	18	88.59	12.25	< 0.001	-86.16
Total	1714	1752	1714	1752	1171	287	140	21	82.38	9.19	< 0.001	-88.84

CTRL: Control

4. Discussion

The two main vectors responsible for arboviruses, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, are present in Benin^[15, 16]. The most abundant, *Aedes aegypti*, is distributed throughout the national territory, while the second (*Aedes aegypti*) is found and widespread in a few municipalities in the south of Benin^[15]. Furthermore, a recent study has shown that *Aedes aegypti* has developed resistance to pyrethroid insecticides commonly used for bed net impregnation^[17]. Moreover, recent research has mentioned that not only are the arbovirus vectors abundant, but they are also carriers of the dengue virus in Benin^[18]. In this worrisome situation, it is necessary to take the epidemic threat seriously and prepare for a response. The response or prevention of arbovirus epidemics involves vector control through the reduction of vector populations. This reduction can be achieved through chemical control using insecticides, including growth regulators. Mosquito oviposition traps treated with 0.4% S-methoprene (Mosquilarv) are an alternative. Our results have shown a high rate of positive oviposition traps for *Aedes* eggs regardless of the location. This result can be explained by the presence of a significant number of gravid mosquitoes in the area searching for a suitable oviposition site. These gravid mosquitoes may have bitten residents in the locations where the oviposition traps were placed. Indeed, female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* require blood to bring their eggs to maturity. Being more anthropophilic, these vectors prefer to take blood from humans. Therefore, these gravid mosquitoes may have certainly taken their blood meal from unprotected individuals. Furthermore, our results report no significant difference in the proportions of eggs collected in the oviposition traps treated with Mosquilarv compared to untreated control traps. This result could be explained by the fact that Mosquilarv does not have a repellent effect but acts as a larvicide. It does not repel gravid mosquitoes but prevents larvae from the eggs laid by these mosquitoes from completing their larval development to emerge as a threat to the population.

At the emergence of larvae from the oviposition trap eggs, three species were morphologically identified. In order of abundance, they are *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus*. Similar results were obtained by Padonou *et al.*^[15], who also found additional species such as *Aedes vittatus* and *Aedes anthocephalus* involved in sylvatic transmission of arboviruses. In the neighbourhoods of Porto-Novo and the Ifangni municipality, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* shared the same oviposition traps and were classified as sympatric. These results are consistent with previous studies that reported in India that *Aedes* species reproduced in all available artificial containers filled with stagnant water^[19]. In Central Africa, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* often shared the same larval habitats, with *Ae. albopictus* preferring discarded tires while *Ae. aegypti* preferred domestic containers^[20]. The associations of *Ae. aegypti*/*Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus*/*Cx. quinquefasciatus* confirm the anthropophilic nature of the three species and the coexistence of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Cx. quinquefasciatus* in domestic environments as reported by Lopez-Solis *et al.*^[21].

Our results revealed a considerable reduction in the emergence of *Aedes* larvae by Mosquilarv. This could be explained by the chemical composition of this product, with the bioactive molecule being methoprene, a growth regulator that has already proven to be a powerful larvicide against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae, like pyriproxyfen^[22]. Growth regulators have always shown interesting larvicidal effects and significantly reduce the population of *Aedes* vectors^[23]. Although our study confirmed the effectiveness of Mosquilarv as a potential future tool for combating the main arbovirus vectors, it was not conducted with positive controls such as pyriproxyfen, a powerful growth regulator whose efficacy has been confirmed by several studies^[22]. Furthermore, it should be noted that community-based evaluation under natural conditions is still needed to truly confirm its effectiveness in practical vector control, considering other species of mosquitoes.

5. Conclusion

The results of this study have confirmed the anthropophilic and sympatric nature of the main dengue vector species, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. This situation poses a threat to the health of the populations in this region of Benin. Vector-borne disease control programs should strengthen entomological surveillance in this locality. The significant reduction in the emergence rate of *Aedes* spp. by Mosquilarv observed in the results of this study is valuable information for the response and control of dengue vectors during an epidemic. It is necessary to conduct a Phase 3 study with a larger spatial and temporal coverage to confirm, in a community setting, the effectiveness of 0.4% S-methoprene Mosquilarv in reducing the density of *Aedes* and other Culicidae mosquitoes in Benin.

6. Declaration of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest

6. References

- World Health Organization. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes. 2nd ed. Geneva; c2016.
- Ruche GL, Renaudat TC, Caro A, Ledrans V, Martine, *et al.* Augmentation de la dengue importée de Côte d'Ivoire et d'Afrique de l'Ouest en France. Bureau régional de l'OMS pour l'Asie du Sud-Est; c2010.
- Omatola CA, Onoja AB, Moses E, Mahmud M, Mofolorunsho CK. Dengue in parts of the Guinea Savannah region of Nigeria and the risk of increased transmission, *International Health*. 2021;13(3):248-252.
- Demamou M, Sadeuh-Mba SA, Vanhecke C, Ndikweti R, Kouna TI, Inais NM, *et al.* Molecular characterization of chikungunya virus from three regions of Cameroon. *Virologica sinica*. 2015;30(6):470-473.
- Nanyingi, Mark O, Peninah M, Stephen GK, Gerald MM, Samuel MT, *et al.* « A Systematic Review of Rift Valley Fever Epidemiology 1931-2014 ». *Infection Ecology & Epidemiology*. 2015;5(1):28024.
- Husnayain A, Fuad A, Lazuardi L. Correlation between Google Trends on dengue fever and national surveillance report in Indonesia. *Glob Demanou Maurice, Sadeuh-Mba Serge Alain, Vanhecke Christophe, Ndikweti Rene, Kouna Tsala Irene, Inais Nsioza Marthe, Njouom Richard*. Molecular characterization of chikungunya virus from three regions of Cameroon. *Virologica sinica*, 2015;30(6):470-473.
- Koh Y-M, Spindler R, Sandgren M, Jiang J. A model comparison algorithm for increased forecast accuracy of dengue fever incidence in Singapore and the auxiliary role of total precipitation information. *Int J Environ Health Res*. 2018;28:535-552.
- Padonou GG, Ossè A, Salako AS, Aikpon A, Sovi A, Kpanou C, *et al.* « Entomological Assessment of the Risk of Dengue Outbreak in Abomey-Calavi Commune, Benin ». *Tropical Medicine and Health*. 2020;48(1):20.
- Eckerle I, Kapaun A, Junghanss T, Schnitzler P, Drosten C, Thomas Jänisch. « Dengue Virus Serotype 3 Infection in Traveler Returning from West Africa to Germany ». *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(1):175-77.
- Gautret P, Botelho-Nevers E, Charrel RN, Parola P. Dengue Virus Infections in Travellers Returning from Benin to France, July-August 2010. *Eurosurveillance*. 2010;15(36):19657.
- Guha-Sapir, Debarati, et Barbara Schimmer. 2005. Dengue fever: new paradigms for changing epidemiology ». *Emerging Themes in Epidemiology*; c2005.
- Gubler DJ. « Epidemic Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever as a Public Health, Social and Economic Problem in the 21st Century ». *Trends in Microbiology*. 2002;10(2):100-103.
- Mulla MS. The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*. 1995;11(2):269-73.
- Vythilingam I, Luz BM, Hanni R, Beng TS and Huat TC. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv 0.5 G) against dengue vectors. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2005;21(3):296-300.
- Padonou GG, Konkou AK, Salako AS, Zoungbédji DM, Ossè R, Sovi A, *et al.* Distribution and abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa; c2023a (preprint).
- Yadouléon A, Hounkanrin G, Tchiboza C, Bialonski A, Schmidt-Chanasit J, Jöst H. First Detection of the Invasive Mosquito Vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Benin, West Africa. *Journal of Medical Entomology*. 2022;59(3):1090-1094.
- Konkou AK, Padonou GG, Osse R, Salako AS, Zoungbédji DM, Sina H, *et al.* Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in southern Benin, West Africa. *Tropical Medicine and Health*. 2023;51(1):22.
- Padonou GG, Konkou AK, Zoungbédji DM, Salako AS, Sovi A, Oussou O, *et al.* Detection of DENV-1, DENV-3 and DENV-4 serotypes in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, and epidemic risk in the departments of Oueme and Plateau, South-Eastern Benin; c2023b.(preprint)
- Bhat MA, Krishnamoorthy K, Khan AB. Entomological surveillance of dengue vectors in Tamil Nadu, India. *J Entomol Zool Stud*. 2014;2(6):158-64,
- Weetman D, Kamgang B, Badolo A, Moyes CL, Shearer FM, Coulibaly M, *et al.* *Aedes* Mosquitoes and *Aedes-Borne Arboviruses* in Africa: Current and Future Threats. *Int J Environ Res Public Health*. 2018, 15.
- Lopez-Solis AD, Solis-Santoyo F, Saavedra-Rodriguez K, Sanchez-Guillen D, Château-Vera A, Gonzalez-Gomez *et al.* *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* et *Culex quinquefasciatus* adultes trouvés coexistent dans des habitations urbaines et semi-urbaines du sud du Chiapas, au Mexique. *Insectes*. 2023;14:565.
- Lau K, Chen C, Lee H, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun M. Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *J Med Entomol*. 2015;52:199-206.
- Harbison, Justin E, Runde, Amy B, Henry, Marlon, *et al.* An operational evaluation of 3 methoprene larvicide formulations for use against mosquitoes in catch basins. *Environmental Health Insights*, 2018, 12.

Annexe 2: Protocoles

Partie I : Bio-essai en bouteille du CDC (simple)

1. Introduction

Les bio-essais permettent la détection et la caractérisation de la résistance aux insecticides dans une population de vecteurs. Ce manuel décrit le bio-essai en bouteille du CDC, un outil pour détecter la résistance des vecteurs aux insecticides. L'information issue de ce bio-essai, combinée avec les résultats des bio-essais utilisant les synergistes et ceux des essais biochimiques et moléculaires, peut aider à la détermination des mécanismes associés à la résistance.

Le bio-essai du CDC repose sur les données du temps de mortalité qui sont les mesures du temps qu'il faut pour qu'un insecticide pénètre un arthropode, traverse ses tissus, arrive au site cible et agisse sur ce site. Tout ce qui empêche ou retarde l'action de l'insecticide contribue à la résistance. L'information issue du bio-essai du CDC peut constituer une évidence préliminaire de la perte d'efficacité d'un insecticide. Cette méthode doit être utilisée en routine même avant qu'un insecticide soit considéré et approvisionné pour la lutte anti vectorielle.

Le bio-essai en bouteille du CDC peut être conduite sur des arthropodes collectés sur le terrain ou sur ceux élevés dans l'insectarium à partir de larves collectées sur le terrain. Il n'est pas recommandé d'utiliser des moustiques ayant émergé des œufs pondus dans l'insectarium.

Un avantage majeur de ce bio-essai est que différentes concentrations d'un insecticide peuvent être évaluées. En plus, la technique est simple, rapide et économique comparée à d'autres alternatives. Le bio-essai en bouteille du CDC peut faire partie d'un programme élargi de monitoring de la résistance aux insecticides qui peut inclure le bio-essai sur papier imprégné de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ainsi que des méthodes biochimiques et moléculaires.

2. Matériels et réactifs

2.1. Matériels

- Bouteilles Wheaton 250 ml avec des couvercles à visser. Chaque test requiert cinq (5) bouteilles: quatre répliques et un contrôle ;
- Moustiques à tester ;
- Pipettes graduées (usage unique) en plastique qui peuvent mesurer 1 ml ; ou des

- micropipettes et embouts ;
- Aspirateurs á bouche pour collecter les moustiques ;
 - Pots en carton pour le transfert et la garde des moustiques ;
 - Le stock d'insecticide en bouteilles de solutions. Ces bouteilles sont colorées en ambre ou couvertes par du papier aluminium si elles sont claires (100-1000 ml selon le choix de l'utilisateur).
 - Chronomètre capable de compter les secondes;
 - Marqueurs permanents pour étiqueter les bouteilles, les couvercles et les pipettes;
 - Scotch en papier pour étiqueter les bouteilles, les couvercles et les pipettes;
 - Des gants á usage unique;
 - Feuilles de papier, bics et crayons pour l'enregistrement des données.

2.2. Réactifs

- Insecticide(s) á tester (Produits purs ou formulations);
- Acétone ou éthanol absolu.

3. Considérations initiales

3.1. Dose diagnostique (discriminatoire) et temps diagnostique

La première étape de la standardisation de l'essai en bouteille du CDC consiste á déterminer la dose diagnostique ou discriminatoire et le temps diagnostique. La dose diagnostique est une dose d'insecticide qui tue 100% des moustiques sensibles dans un temps donné. Le temps escompté pour l'insecticide d'atteindre cet objectif est appelé temps diagnostique. Ceux-ci sont les points de référence auxquels tous les autres résultats sont comparés. On assume la présence d'une résistance lorsqu'une portion significative de la population á tester survit á la dose diagnostique au temps diagnostique.

La dose diagnostique et le temps diagnostique doivent étre définis pour chaque insecticide, chaque région et chaque espèce de vecteurs sous monitoring. La dose diagnostique et le temps diagnostique sont validés en utilisant une population sensible de vecteurs collectés du terrain. Une fois que la dose diagnostique et le temps diagnostique sont définis pour une espèce donnée dans une région donnée, ces paramètres doivent étre désormais utilisés pour tester cette population particulière de vecteurs dans cette région. L'utilisation de ces

paramètres est requise pour détecter les changements en réponse de la population dans le temps (exemple : Nombre de moustiques ayant survécu après le temps originel d'exposition auquel 100% des moustiques exposés sont tués).

Les doses diagnostiques et les temps diagnostiques ont été déterminés pour plusieurs régions géographiques. Le tableau 1 montre les doses diagnostiques et les temps diagnostiques applicables aux populations de moustiques du genre *Anopheles* et *Aedes*. Les doses et les temps diagnostiques, ci-dessous, pour les *Anopheles* ont été validés sur des *Anopheles* collectés en Amérique du sud dans le cadre l'Initiative Amazone contre le Paludisme (AMI). Ces doses et temps, aussi bien que ceux listés pour le genre *Aedes*, sont bien dans l'intervalle des doses et temps diagnostiques utilisés partout dans le monde entier. Par conséquent les doses diagnostiques et les temps diagnostiques dans le tableau 1 servent de référence pour les principaux insecticides globalement utilisés. Il est à noter que les doses et les temps diagnostiques restent encore à déterminer pour d'autres arthropodes.

Tableau 1: Doses et temps diagnostiques pour les moustiques du genre *Anopheles* et *Aedes*

Insecticide	Concentration de l'insecticide par espèce (µg/bouteille)		Temps diagnostique (Minutes)
	<i>Anopheles</i>	<i>Aedes</i>	
Bendiocarbe	12.5	12.5	30
Cyfluthrine	12.5	10	30
Cypermethrin	12.5	10	30
DDT	100	75	45
Deltamethrine	12.5	10	30
Fenitrothion	50	50	30
Lambdcyhalothrine	12.5	10	30
Malathion	50	50	30
Permethrine	21.5	15	30
methyl-Pirimiphos	20	--	30

3.2. Dispositions préliminaires

3.2.1. Préparation des solutions stocks

L'intérieur des bouteilles de bio-essai doit être sensibilisé avec la dose diagnostique de l'insecticide à évaluer. Comme indiqué dans le tableau 1, la dose diagnostique est une quantité déterminée d'insecticide par bouteille. Donc, si une bouteille doit recevoir 12,5µg de deltaméthrine, il est conseillé d'avoir une solution stock de 12,5µg/ml, ce qui veut dire que 1 ml de solution contient la quantité désirée d'insecticide pour sensibiliser la bouteille. En d'autres termes, il est plus pratique de préparer des dilutions d'insecticide au préalable, appelées solutions stocks, pour la sensibilisation des bouteilles.

Pour préparer les solutions stocks d'insecticide, diluer la quantité appropriée d'insecticide (Produit pur ou formulation) dans de l'acétone ou dans de l'éthanol absolu. Des exemples de quantités d'insecticide pur pour préparer 1000, 500 et 100ml de solution stocks sont donnés dans le tableau 2. Il faut noter que l'insecticide pur peut être solide ou liquide. La bouteille contenant la solution stock est étiquetée avec le nom de l'insecticide, la concentration et la date de préparation. Des exemples de préparation de solutions stocks à partir de produits purs et de formulations sont donnés dans l'encadré 1. La solution préparée peut être gardée au réfrigérateur (4°C) dans de bouteilles qui protègent contre la lumière (Bouteilles ambres or claires mais enveloppées dans du papier aluminium) pour une utilisation future. Au CDC, des solutions de plusieurs insecticides, gardées au réfrigérateur pendant 2-3 ans, ont été utilisées sans dégradation. Les solutions stocks doivent être sorties du réfrigérateur au moins 1 heure avant le début des bio-essais pour leur permettre de revenir à la température ambiante avant l'utilisation. Agiter gentiment le stock pour l'homogénéiser.

Tableau 2: Quantités d'insecticides purs requises pour la préparation de différents volumes de solutions stocks.

Insecticide	Quantité (mg) d'insecticide pur nécessaire par volume de solution stock (<i>Anopheles</i>)			Quantité (mg) d'insecticide pur nécessaire par volume de solution stock (<i>Aedes</i>)		
	1000 ml	500 ml	100 ml	1000 ml	500 ml	100 ml
Bendiocarbe	12.5	6.25	1.25	12.5	6.25	1.25
Cyfluthrine	12.5	6.25	1.25	10	5	1
Cypermethrine	12.5	6.25	1.25	10	5	1
DDT	100	50	10	75	37.5	7.5
Deltamethrine	12.5	6.25	1.25	10	5	1
Fenitrothion	50	25	5	50	25	5
Lambdcyhalothrine	12.5	6.25	1.25	10	5	1
Malathion	50	25	5	50	25	5
Permethrine	21.5	10.75	2.15	15	7.5	1.5
methyl-Pirimiphos	20	10	2			

3.2.2. Sensibilisation des bouteilles

- S'assurer que les bouteilles et les couvercles sont complètement asséchés;
- Ouvrir les bouteilles;
- Si les pipettes sont à usage unique, marquer une pipette avec la mention « solvant uniquement » pour la bouteille témoin, marquer une autre pipette avec la mention « solution d'insecticide » pour les bouteilles tests;
- Mettre 1ml d'acétone/éthanol dans la bouteille témoin et fermer en serrant le couvercle;
- Mettre 1 ml de la solution stock d'insecticide à la première bouteille test et fermer en serrant le couvercle. Cette étape est faite si la solution stock a la même concentration par ml comme il est désiré pour la bouteille;

- f) Répéter l'**étape e** avec les trois autres bouteilles tests;
- g) Tourner/agiter les bouteilles avec les contenus pour sensibiliser les fonds;
- h) Inverser les bouteilles et tourner/agiter pour sensibiliser les couvercles;
- i) Placer les bouteilles sur les côtés pendant un moment pour recueillir les contenus.
Tourner doucement les bouteilles en les agitant doucement afin de sensibiliser toutes les parois;
- j) Répéter les étapes **g-i** pour toutes les bouteilles tests;
- k) Ouvrir les bouteilles et continuer de les tourner sur les côtés jusqu'à la disparition de tout signe de liquide de l'intérieur (bouteilles complétement asséchées);
- l) Laisser les bouteilles sur leurs côtés et les couvrir avec quelque chose qui les protège contre la lumière;
- m) Lorsque les bouteilles ne sont pas immédiatement utilisées, il est conseillé de les garder dans un endroit sombre (un tiroir) sans les couvercles afin d'éviter l'accumulation d'humidité. Si les bouteilles doivent être envoyées ailleurs, elles doivent être fermées.

4. Déroulement du bio-essai en bouteille du CDC

4.1. Considérations générales

- a) Utiliser un aspirateur à filtre pour éviter l'inhalation des moustiques ou des fragments d'insecte;
- b) Souffler doucement pour transférer les moustiques dans les bouteilles. Si vous soufflez trop dur, les moustiques seront blessés en cognant les parois des bouteilles et pourront mourir avant l'action de l'insecticide;
- c) Soyez prudent à ne pas toucher le fond des bouteilles avec l'aspirateur car ce dernier pourrait être contaminé par l'insecticide.
- d) Rappelez-vous qu'il n'est pas obligatoire d'avoir le même nombre de moustiques dans chaque bouteille ;

4.2. Bio-essai en bouteille du CDC

Le bio-essai peut être effectué avec les bouteilles tenues en position vertical ou posées sur leurs côtés. L'important est d'être consistant et de suivre, chaque fois, la même procédure.

Les étapes :

- a) Avec un aspirateur introduire 10-25 moustiques dans la bouteille témoin. Il n'est pas nécessaire de compter les moustiques. Le nombre exact importe peu;
- b) Introduire 10-25 moustiques dans chaque bouteille test; encore le nombre exact importe peu;
- c) Mettre le chronomètre en marche. Soyez sûr d'examiner les bouteilles au temps 0 et compter le nombre de moustiques morts et/ou vivants;
- d) Si vous trouvez des moustiques morts au temps 0, notez les sur le formulaire de rapport;
- e) Enregistrer le nombre de moustiques morts ou vivants (choisir ce qui est plus facile à compter) toutes les 15 minutes jusqu'à la mort de tous les moustiques ou jusqu'à deux (2) heures. Il n'est pas nécessaire de continuer le bio-essai après deux (2) heures ;
- f) Enregistrer les données sur le formulaire de rapport;
- g) Reporter les résultats sur un graphe avec les pourcentages de mortalité sur l'axe des ordonnées (Y) et les temps sur l'axe des abscisses (X) pour tous les réplicas en utilisant une échelle linéaire;
- h) Rappelez-vous que la mortalité au temps diagnostique est la valeur la plus cruciale car elle représente le seuil entre la sensibilité et la résistance. Reférez-vous au tableau 1 pour les temps diagnostiques des insecticides communément utilisés;
- i) Prenez en compte la mortalité dans la bouteille témoin après deux (2) heures (fin du bio-essai) quand vous rapportez les résultats du bio-essai. Utiliser la formule d'Abbot pour corriger les résultats si la mortalité après deux heures dans la bouteille témoin se trouve entre 3% et 10%. Le bio-essai n'est pas valide lorsque la mortalité dans la bouteille témoin est $> 10\%$.

Les moustiques sont considérés morts lorsqu'ils ne peuvent tenir. Un chronomètre peut être utilisé pour chaque bouteille mais il est suffisant de mettre un seul en marche après l'introduction des moustiques dans la dernière bouteille. Il est cependant important d'être consistant et de suivre le même chronomètre. Les moustiques survivant au temps diagnostique (tableau 1) représentent les moustiques résistants à l'insecticide testé. Ces moustiques peuvent être transférés dans un pot en carton avec manche pour plus d'analyses (ex : essais moléculaires ou biochimiques). Les moustiques volant encore à la fin du bio-essai

dans la bouteille témoin peuvent être tués pour permettre un décompte correct. Les moustiques peuvent être tués par congélation ou en les assommant.

5. Interprétation des résultats

Comme avec d'autres bio-essais de résistance, les données du bio-essai en bouteille du CDC, utilisant des moustiques tests, ont besoin d'être comparées aux données des moustiques sensibles ou pour une population qui sert de référence. Le seuil de résistance de chaque insecticide peut être déterminé par la calibration du bio-essai en bouteille du CDC. La calibration aboutit à la détermination de la dose diagnostique et du temps diagnostique pour une espèce particulière dans une région donnée. Ceux-ci correspondent à la dose et au temps auxquels tous les moustiques sensibles meurent (figure 1). Si des moustiques testés survivent au delà du seuil, ces survivants représentent une proportion de la population qui a quelque chose leur permettant de retarder l'accès de l'insecticide à son site cible pour agir.

En d'autres termes ils ont quelques degrés de résistance. Dans l'exemple de la figure 1, tous les moustiques qui sont morts, avant le temps diagnostique durant l'exposition aux bouteilles sensibilisées, étaient sensibles. On assume que les moustiques testés qui survivent au delà du temps diagnostique ont quelques degrés de résistance. Dans l'exemple seulement 23% de la population testée étaient sensibles. Les recommandations pour l'interprétation des résultats du bio-essai sont disponibles et se retrouvent dans l'encadré 1. L'information la plus importante est la mortalité au temps diagnostique mais le bio-essai continue au delà du temps diagnostique pour évaluer l'intensité de la résistance.

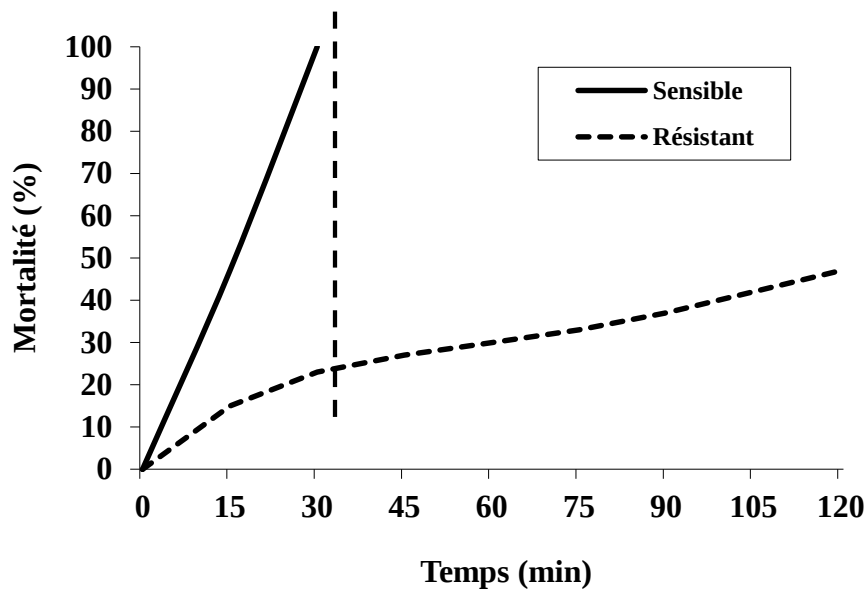


Figure 1: Détermination du seuil de résistance

Encadré 1: Interprétation des résultats

Recommandations de l’OMS pour l’évaluation de la résistance détectée:

- 98%–100% de mortalité au temps diagnostique recommandé indique la sensibilité;
- 80%–97% de mortalité au temps diagnostique recommandé suggère une possibilité de résistance à confirmer;
- <80% de mortalité au temps diagnostique recommandé suggère une résistance

NB: Quand on obtient une mortalité <95% au temps diagnostique au cours de bio-essais qui ont été conduits dans des conditions optimales avec une taille d’échantillons >100 moustiques la résistance peut être fortement soupçonnée.

Partie II : Bio-essai en bouteille du CDC avec les synergistes

1. Introduction

Le bio-essai en bouteille du CDC utilisant des bouteilles sensibilisées avec l'insecticide seul donne des informations sur la résistance à cet insecticide particulier chez les arthropodes adultes. Ces résultats peuvent donner une évidence rapide qu'un insecticide est en train de perdre son efficacité. Le bio-essai en bouteille du CDC doit être utilisé en routine même avant que les décisions d'achat ou d'application d'un insecticide soient prises.

Une fois que la résistance est détectée ou au moins soupçonnée on doit décider de ce qu'il faut faire et de quels autres composés peuvent être encore efficaces et ne sont pas compromis par une résistance croisée. Ceci requiert une connaissance du/des mécanisme(s) de résistance en place, une information usuellement obtenue en utilisant soit des essais biochimiques (microplaques) soit des méthodes moléculaires. Une alternative rapide et moins chère pour l'évaluation des mécanismes de résistance est d'utiliser le bio-essai en bouteille du CDC avec des synergistes. Les synergistes sont des enzymes inhibiteurs des enzymes de détoxification de l'insecticide. Des synergistes sont disponibles pour des enzymes de détoxification métabolique : estérases, oxydases et glutathion s-transférases.

Les synergistes agissent en abolissant la résistance apparente observée dans le bio-essai en bouteille du CDC si l'enzyme de détoxification joue un rôle dans ce mécanisme particulier de résistance (figures 2a et 2b). Les résultats pour les populations sensibles et résistants sont montrés (figure 2a). Quand un synergiste est utilisé sur une population résistante il peut se passer une de trois choses :

- a. la résistance à l'insecticide est abolie (temps-mortalité, ligne A); ce qui suggère que ce mécanisme lié à ce synergiste joue un rôle dans la résistance observée.
- b. la résistance à l'insecticide est partiellement abolie (temps-mortalité ligne B); ceci suggère que le mécanisme lié à ce synergiste est impliqué dans la résistance mais il n'est pas le seul mécanisme dans ce cas particulier;
- c. la résistance à l'insecticide n'est pas affectée (temps-mortalité ligne C); ceci indique que le mécanisme lié à ce synergiste n'est pas impliqué dans la résistance.

Il est aussi possible de déterminer si un mécanisme à site ciblé tel que la présence du gène *kdr* (mutation au niveau du canal sodium) ou une acétylcholinestérase insensible est impliqué. Ceci est fait en utilisant les synergistes en combinaison. Leur utilisation en

combinaison n'abolira pas la résistance au cours d'un bio-essai si un mécanisme à site ciblé est présent. Il est crucial d'évaluer le rôle relatif de détoxication et des mécanismes à site ciblé impliqués dans une incidence particulière de résistance. Un mécanisme à site ciblé confère une résistance croisée DDT-pyréthrinoïdes pendant qu'il peut ou ne pas être le cas pour un mécanisme de détoxication. Une connaissance du mécanisme de résistance impliqué est requise pour choisir un insecticide de remplacement.

Fig. 2a.

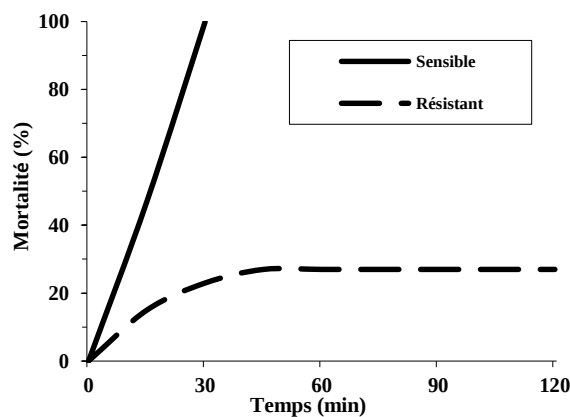
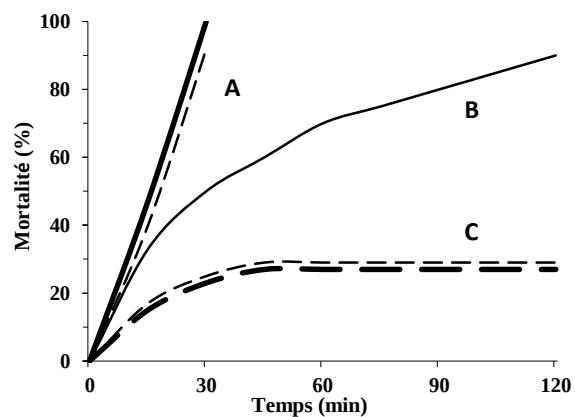


Fig. 2b.



Figures 2a et 2b. Effets des synergistes sur des populations résistantes de vecteurs. Figures 10a montre les résultats d'une population de vecteurs résistants compare à une population sensible. Figure 10b montre les issues possibles de l'exposition aux synergistes (Ligne A-Resistance à l'insecticide est abolie ; Ligne B-Resistance à l'insecticide est partiellement abolie ; et Ligne C-Resistance à l'insecticide n'est pas affectée).

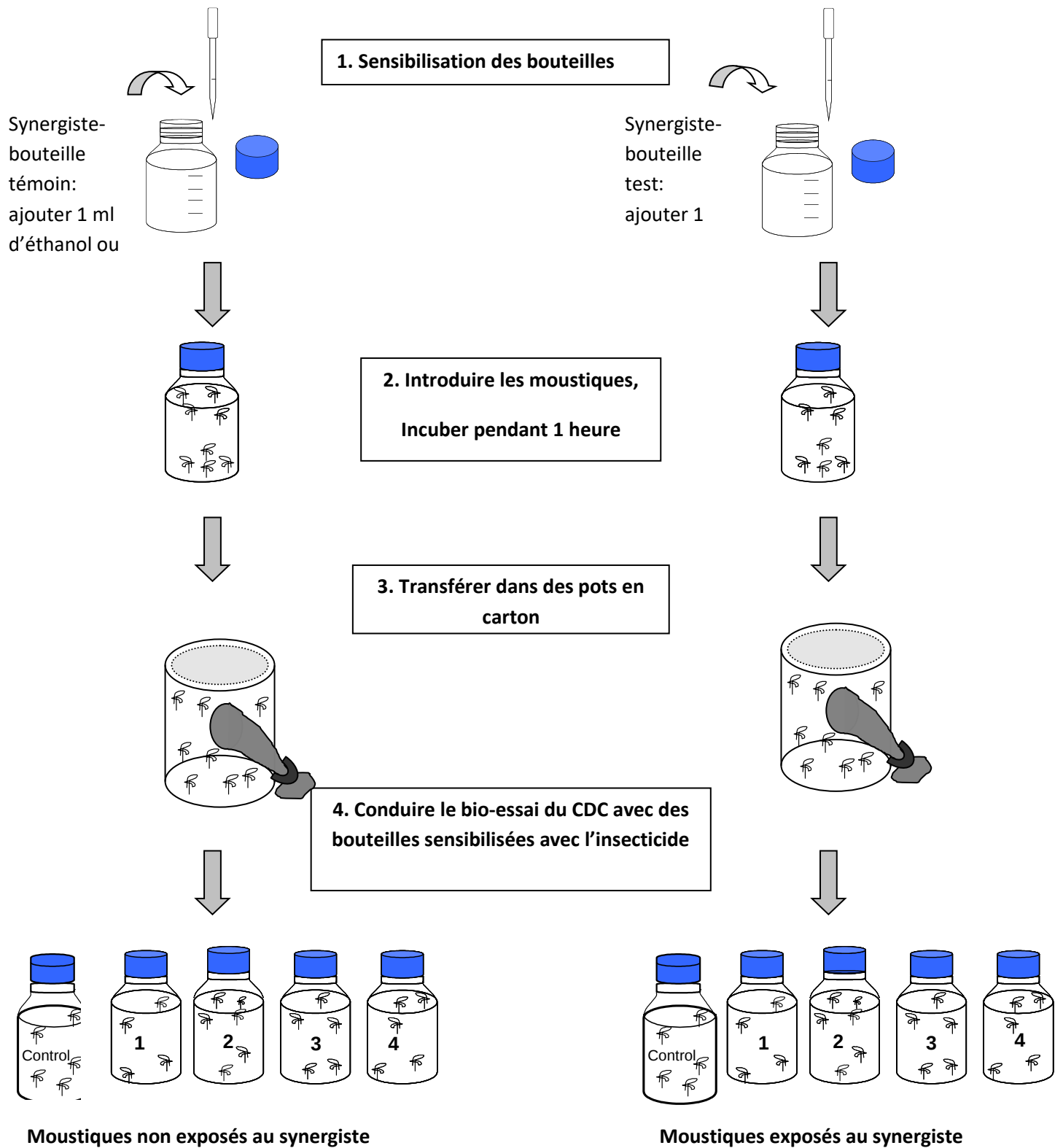
2. Utilisation des synergistes

Les synergistes communs peuvent être utilisés en conjonction avec le bio-essai en bouteille du CDC:

- Butoxide de piperonyl (PBO Piperonyl butoxide), qui inhibe l'activité oxydase;
- S.S.S-tributylphosphorotrithioate (DEF), qui inhibe l'activité estérase ;
- Acide ethacrynique (EA= Ethacrynic acid), maléate de diethyl (DM = diethyl maléate), et le chlorfenethole (CF = chlorfenethol), qui inhibent l'activité glutathion-transférase.

Il est aussi possible d'utiliser une combinaison de ces synergistes ci-dessus. Tester les moustiques avec les synergistes est une procédure à deux étapes. Les moustiques sont d'abord exposés au synergiste pendant une heure et ensuite testés pour la résistance en utilisant le bio-essai en bouteille du CDC. La figure 3 montre un schéma de bio-essai avec un synergiste.

Figure 3 : Bio-essai en bouteille du CDC avec un synergiste.



3. Préparation des bouteilles pour le bio-essai avec les synergistes

Pour utiliser le bio-essai avec les synergistes:

- a) Préparer la solution de stock de synergiste en diluant la quantité appropriée de synergiste dans de l'acétone ou de l'éthanol pur afin de pouvoir sensibiliser les bouteilles avec les concentrations données dans le tableau 3. Pour ces solutions stocks, on utilise la même procédure pour la préparation des solutions stocks d'insecticide (Section 3.2.1). En bref, il faut diluer la quantité appropriée de synergiste dans de l'acétone ou de l'éthanol. Pour avoir une concentration de 400 µg/ bouteille de butoxide de piperonyl, dissoudre 400 mg dans une quantité suffisante d'acétone ou d'éthanol pour un (1) litre de solution. Chaque ml de cette solution contient 400 µg de butoxide de piperonyl.
- b) Etiqueter une bouteille et son couvercle comme synergiste témoin (sans le synergiste);
- c) Etiqueter une seconde bouteille et son couvercle comme synergiste-test;
- d) Ajouter 1ml d'acétone ou d'éthanol dans la bouteille témoin et fermer en serrant;
- e) Ajouter 1 ml de la solution stock de synergiste à la bouteille test et fermer en serrant;
- f) Sensibiliser les bouteilles, ouvrez-les et laisser les bouteilles sécher ;
- g) Préparer deux groupes de bouteilles sensibilisées à l'insecticide pour conduire le bio-essai en bouteille du CDC.

Tableau 3: Concentrations du synergiste utilisées dans le bio-essai en bouteille du CDC

Synergiste	Concentration (µg/bouteille)
Chlorfenethole	80
Maleate de diethyl	80
Acide ethacrynique	80
Butoxide de piperonyl	400
S.S.S-tributlyphosphorotrithioate	125

4. Déroulement du bio-essai en bouteille du CDC avec les synergistes

Pour conduire le bio-essai avec les synergistes:

- a) Introduire un nombre égale de moustiques dans les bouteilles témoin et test (à peu près 125 moustiques dans chaque bouteille;
- b) Garder les moustiques dans les bouteilles pendant une (1) heure de temps pour permettre au synergiste d'agir;
- c) Après une (1) heure d'exposition, transférer les moustiques dans deux pots d'observation, un pour les moustiques synergiste-témoins et un pour le synergiste-tests ou exposés. Ceci facilite le transfère des moustiques dans les bouteilles sensibilisées avec de l'insecticide;
- d) Conduire le bio-essai comme indiqué précédemment en utilisant un groupe de bouteilles sensibilisées avec de l'insecticide (un témoin et quatre tests) pour les moustiques synergiste-témoins et un autre groupe (un témoin et quatre tests) pour les moustiques exposés au synergiste (synergiste-exposés);
- e) Comparer les résultats pour les deux populations de moustiques testés.

5. Interprétation des résultats du bio-essai avec les synergistes

La section « interprétation des résultats » précédente et les figures 2a et 2b donnent des informations sur comment interpréter les résultats du bio-essai avec les synergistes. Une résistance qui ne peut être attribuée à l'un des mécanismes de détoxification après avoir testé tous les synergistes est probablement due à un mécanisme de site ciblé tel que le kdr (mutation au niveau du canal sodium) ou à une insensibilité de l'acétylcholinestérase.

Procédure opérationnelle standard (POS) pour la dissection et l'estimation de l'inhibition de l'oviposition dans la souche de colonie d'anophèles résistants après exposition à des moustiquaires traitées au piriproxyfène/pyréthroïde

1 Objectif

Évaluer l'efficacité du pyriproxifène incorporé dans les moustiquaires à double traitement insecticide sur la fertilité des souches d'anophèles résistantes.

2 Anophèles testés

Des moustiques femelles adultes de l'espèce *An.gambiae* s.s. Muleba kis (kdr east & MFO) seront obtenus à partir d'une culture de laboratoire maintenue au KCMUCo. Des moustiques femelles de deux à cinq jours, nourris de sang, seront utilisés pour les essais biologiques.

3 Traitement

- LN Royal Guard
- Filet non traité
- LN standard : Interceptor G2

4 Mesure des résultats

- Pourcentage de femelles disséquées dont les ovaires sont sous-développés 72 heures après l'alimentation (c'est-à-dire que les follicules ne se sont pas complètement développés du stade de repos prévitellogénique I au stade de maturité V).
- Proportion de femelles disséquées présentant des œufs déformés (œufs non complètement développés, aux stades II-IV).
- Nombre moyen d'œufs dans les ovaires après 72 heures d'alimentation.

5 Matériel pour la dissection

Préparez d'abord tout le matériel nécessaire à la dissection

- Microscope à dissection
- Diapositives
- Stylo marqueur

- Kit de dissection
- Eau distillée
- Microscopie à composés
- Lampe
- Formulaire d'enregistrement
- Stylo et crayon
- Boîte à diapositives
- Chloroforme
- Coton hydrophile
- Pipette en plastique
- Bécher/ gobelet en papier

6 Méthodes

L'essai biologique sur cône sera réalisé conformément à la procédure standard de l'OMS. Cinq Anopheles RSP fraîchement nourris de sang seront introduits dans chaque cône. Vingt à vingt-cinq répétitions de cinq moustiques seront testées. Après une exposition de 3 minutes, les moustiques seront transférés dans des gobelets en papier étiquetés et recouverts d'une moustiquaire non traitée. À la fin du test, les moustiques recevront une solution sucrée à 10 %. La mortalité après 60 minutes et la mortalité après 24, 48 et 72 heures seront enregistrées.

Tous les moustiques anophèles femelles gravides vivants 72 heures après l'exposition seront anesthésiés à une température de congélation de -20°C pendant cinq à dix minutes avant d'être disséqués. Avant la dissection, les espèces d'anophèles femelles seront morphologiquement identifiées par taxon, c'est-à-dire en séparant le groupe *An. gambiae* du groupe *An. funestus* conformément aux procédures d'identification de Gillies & Coetzee (voir SOP pour l'identification des moustiques anophèles par Gillies et Coetzee).

Les enquêteurs chargés de la dissection ne doivent pas connaître le traitement. Les moustiques anophèles femelles gravides seront disséqués en retirant délicatement les deux derniers segments de l'abdomen sous un microscope stéréoscopique à un grossissement de 0,7x, comme décrit précédemment dans le mode opératoire normalisé MiS004 et dans les procédures de Detinova et al. Les ovaires folliculaires et les stades de développement des œufs seront examinés et observés au microscope composé à une puissance de grossissement de 4x ou 10x. Les procédures détaillées pour la dissection des ovaires des moustiques femelles sont les suivantes ;

6.1 Procédure

1. Préparer et marquer la lame de dissection.
2. Enregistrez l'état et l'âge des moustiques au moment de la dissection dans un formulaire de dissection. Tous les moustiques collectés 72 heures après le prélèvement doivent être gravides au moment de la dissection. Toutefois, tout moustique mort avant 72 heures après la collecte doit également être disséqué.
3. Monter un moustique femelle gravide fraîchement tué sur le côté gauche ou le côté arrière d'une lame, l'abdomen orienté vers la droite.
4. Utiliser une aiguille de dissection sur le thorax pour maintenir le moustique immobile tout en séparant l'abdomen de la tête et du thorax.
5. Ajouter une goutte d'eau distillée sur les deux derniers segments, les 6e et 7e sternites de l'abdomen du moustique (figure 1).
6. Placer la lame sous un microscope stéréoscopique à dissection (à un faible pouvoir de grossissement de 0,7x), en utilisant un fond sombre.
7. Retirer délicatement les deux derniers segments de l'abdomen du moustique à l'aide d'une aiguille de dissection à droite.
8. Utiliser l'aiguille pour séparer les ovaires du reste du matériel interne. Pour une meilleure visualisation des follicules ovariens, il est important, lors de la séparation des ovaires, de couper l'oviducte commun au lieu de séparer l'oviducte latéral.

9. Éliminer la graisse et les autres débris en rinçant les ovaires avec de l'eau distillée.

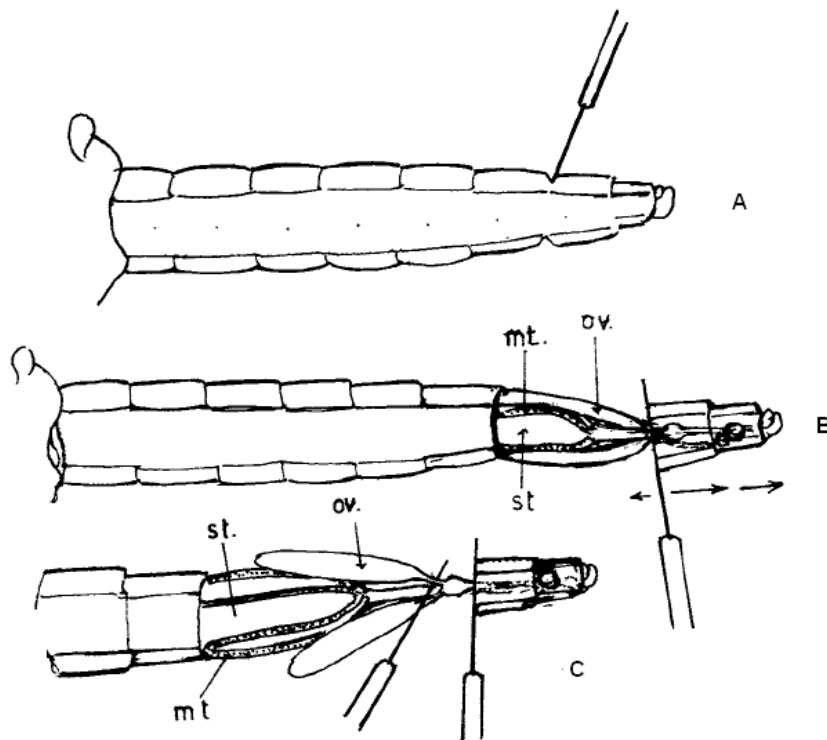


Figure 1. Extraction des ovaires. ov = ovaire, st = estomac, mt = tubules malpighiens.

10. Laisser sécher à l'air la lame contenant les ovaires et les œufs disséqués.

6.2. Notation de la maturation et du développement des œufs

L'échelle standard de Christopher sera utilisée pour noter le stade de développement des œufs (figure 2).

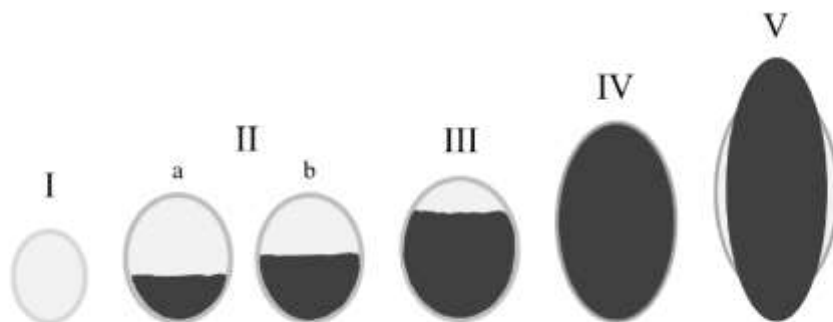
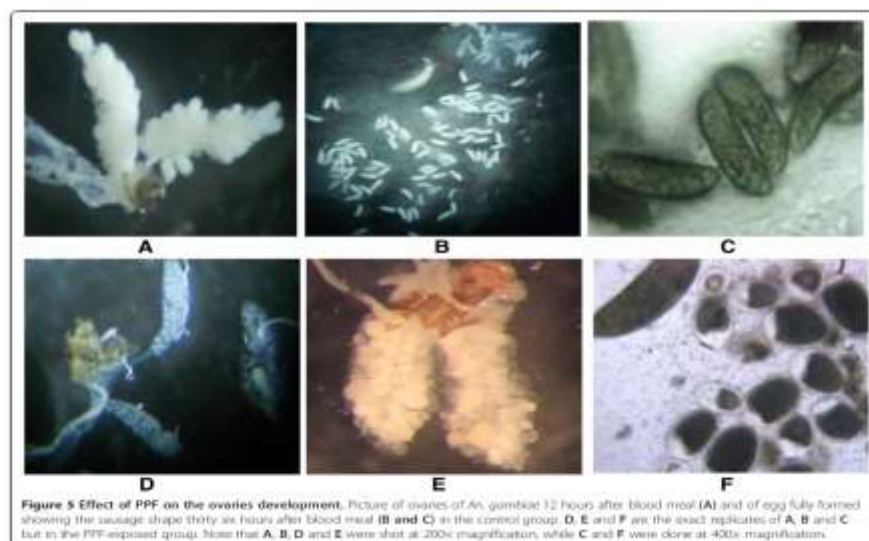


Figure 1. Christophers' Stages of Egg Development. Stage I: the primary follicle. Stage II: a) the follicle gains yolk protein, b) the follicle is approximately half comprised of yolk. Stage III: the follicle fills with yolk. Stage IV: the follicle elongates. Stage V: complete maturation of the egg, with floats.

Figure 2 : Phases du développement de l'œuf dans l'ovaire du moustique selon Christopher.

1. Vous pouvez observer les ovaires et les œufs au microscope à dissection, mais il est recommandé d'examiner et de voir les ovaires et les œufs de moustiques au microscope composé plus fin, avec un pouvoir d'agrandissement de 4x ou 10x. Il est parfois nécessaire d'ajouter une petite goutte d'eau pour une meilleure visualisation.
2. Enregistrez l'image montrant l'état de développement des ovaires et des œufs (figures 2 et 3) dans un formulaire de dissection de moustique. Prenez des photos à l'aide d'un microscope à caméra et enregistrez les images sur une tablette PC. N'oubliez pas de renommer chaque image en fonction de l'étiquette figurant sur la lame de dissection. Les deuxièmes lectures doivent être effectuées séparément par un autre chercheur.
3. Classez et interprétez l'état de développement des follicules ovariens/ovules selon le stade de développement de l'ovule de Christopher [2, 3]. Les moustiques anophèles femelles sont classés comme "fertiles" si les œufs se sont complètement développés (forme normale allongée, en forme de bateau/saucisse avec des flotteurs) et "infertiles" si les œufs n'ont pas subi un développement complet (forme moins allongée/sphérique) (figures 1 et 2).
4. Utiliser un compteur pour noter et enregistrer le nombre d'ovules sous-développés qui seront retenus dans les ovaires folliculaires. Le nombre d'ovules développés doit également être noté et enregistré. Le deuxième comptage doit être effectué séparément par un autre investigateur.



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

- Pilon
- 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
8. Centrifuger 10 minutes à 12 000rpm à TA
9. Vider l'Isopropanol, bien égoutter et ajouter 200 µl d'éthanol 70%
10. Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm TA
11. Vider l'éthanol
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)

Réactifs	Volume	Conc. finale
1 M Tris HCl pH 8.0	100 ml	100 mM
0.5 M EDTA	20 ml	10 mM
NaCl	81.8 g	1.4 M
CTAB	20 g	2%
ddH ₂ O	QSP 1 L	

Mélanger sous agitateur magnétique.

Conserver à température ambiante (TA)

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 Pyréthrinoïdes.

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
- Microonde
- Cuve électrophorétique
- Transilluminateur (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.

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
- Microonde
- 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.

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 inter génique (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 5µl 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 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
- Microonde
- 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 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.

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
- Microonde
- 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.