

UNIVERSITE MONTPELLIER 2
Sciences et techniques du Languedoc

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER 2

Discipline : Biologie Santé

Ecole doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Présentée et soutenue publiquement par

Nicolas Moiroux

Le 17 décembre 2012

**Modélisation du risque d'exposition aux moustiques vecteurs de
Plasmodium spp. dans un contexte de lutte anti-vectorielle**

JURY

M. Henri Vial, Directeur de Recherche, INSERM

Président

M. Gérard Duvallet, Professeur émérite, Université Montpellier 3

Rapporteur

M. Gerry F. Killeen, Reader, Liverpool School of Tropical Medicine

Rapporteur

Mme Annelise Tran, Chargée de recherche, CIRAD

Examinatrice

M. Vincent Corbel, Chargé de Recherche, IRD

Directeur de thèse

Mme Hélène Guis, Chargée de Recherche, CIRAD

CoDirectrice de thèse

Remerciements

En premier lieu, mes remerciements vont à mes directeurs de recherche, Vincent Corbel et Hélène Guis qui m'ont accordé leur confiance et m'ont guidé au bout de cette thèse. Vincent, merci de ton investissement et de m'avoir fait partager ta science et ton dynamisme. Merci d'avoir cru en mes intuitions et de m'avoir donné les moyens de les vérifier. Hélène, nos entretiens ont toujours été pour moi des moments décisifs, d'une pertinence indispensable. Merci.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Merci au Professeur Gerard Duvallet qui appartient à cette catégorie de personnes qui le temps d'un cours ou d'une conférence vous transmettent leur passion. C'est un grand honneur de vous compter parmi les évaluateurs de ce travail.

Merci à Mr Gerry Killeen d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de faire ce long voyage depuis Ifakara. Je suis très honoré de vous compter dans ce jury.

Mme Annelise Tran et à M. Henri Vial, merci de vos conseils durant ces travaux, votre présence à ma soutenance m'honore.

Ces travaux n'auraient pu être menés sans le soutien de nombreuses personnes que je remercie tout particulièrement.

M. Didier Fontenille, directeur de l'UR016 puis de MIVEGEC, pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire et pour son soutien.

M. Martin Akogbeto, directeur du Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou, pour m'avoir accueilli durant deux années très enrichissantes.

M. Fabrice Chandre, responsable de l'équipe VECOPS et M. Jean-Marc Hougard, alors responsable de l'UR016 au Bénin, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma candidature puis à mon travail, pour leur confiance et leur soutien.

M. Renaud Lancelot, responsable de l'équipe Epidémiologie du laboratoire CMAEE, pour son accueil au sein de son équipe au CIRAD et pour son soutien.

Je tiens à remercier également M. Bruno Bordage, représentant de l'IRD au Bénin, Mme Laurence Quilichini, régisseuse de la représentation au Bénin et Mme Marie-Claire Henry, responsable du projet REFS au Bénin.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier de l'IRD et de Mr François Lacoste.

Plusieurs personnes m'ont apporté conseils et avis scientifiques nécessaires durant cette thèse, merci à Thierry Baldet, Thibaut Martin, Vincent Robert, Claire Garros, Eric Elguero. Merci à Abdul Sahabi Bio Bangana pour son aide précieuse sur le terrain.

Merci à toute l'équipe du CREC au Bénin, aux personnes qui ont participé, directement ou indirectement à ces travaux au Bénin : Félix Zoumenou, Marcel Sandeu, Ange Yadouleton, Innocent Djègbé, Georgia Damien, Sidick Aboubacar, Ibrahim Sidick, Razak Osse, Oriane, Cyril Agoli-Agbo, Etienne Gueduy, Jean, Barnabas Zogo, Lin Atigli.

Merci à ceux, chercheurs et futurs chercheurs, avec qui j'ai partagé beaucoup scientifiquement et humainement au Bénin et à Montpellier, parfois autours d'un verre : David Courtin, Gilles Cottrell, Nicaise Ndam, Papa-Makhtar Dramé, Franck Remoué, Marc Egrot, Olaide Boussari, Armel Djènontin, Raphael N'Guessan, Emmanuel Elanga, Nadine Fievet, Nicolas Poquet, Alexandra Marie, Anne Boissière, Moussa Namountougou.

Un grand merci à Florence Fournet et à Philippe Cecchi avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche et mes premiers pas en Afrique. Merci à vous !

Un immense merci à Cédric Penetier pour son soutien, sa confiance, son amitié et nos apéros scientifiques. Merci à Madame, Aïcha. Initchié !

Merci aux amis, Cristelle, Guéna, Simon, Julie, Camille, Bito, Seb et Celia, Vincent, Yann, Sophie, Mousse, Xav et Ola, Marie-Ca et Pierre-Emmanuel, Quentin, Marie.

A mes parents et ma sœur, qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

A ma femme, Oumy, qui m'a supporté et soutenu durant ces années. Dama la nnop badoff.

A tous ceux que je n'ai pas cités et qui se reconnaîtront.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
TABLE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ARTICLES	10
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
<u>CHAPITRE 1 : PALUDISME ET LUTTE ANTI-VECTORIELLE EN AFRIQUE</u>	<u>19</u>
1.1 LES PARASITES : <i>PLASMODIUM</i> SPP.	19
1.1.1 Cycle de vie des <i>Plasmodium spp.</i>	23
1.2 LES VECTEURS : ANOPHELES SPP.	25
1.2.1 Cycle biologique des anophèles	25
1.2.2 Comportement trophique	27
1.2.3 Vol et dispersion	29
1.2.4 Le complexe Gambiae	30
1.2.5 Le groupe Funestus	31
1.2.6 Les autres vecteurs de <i>Plasmodium</i> en Afrique	32
1.3 MESURE DE L'EXPOSITION (CONTACT HOTE-VECTEUR)	34
1.3.1 Méthodes entomologiques	34
1.3.2 Méthodes immunologiques	36
1.4 MESURE DE LA TRANSMISSION	36
1.4.1 Compétence vectorielle et définition d'un vecteur infectant	36
1.4.2 Indicateurs entomologiques de la transmission	37
1.5 LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DU PALUDISME	39
1.5.1 Historique	39
1.5.2 Méthodes de lutte anti-vectorielle actuelles	42
<u>CHAPITRE 2 : LIMITES DE LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE <i>PLASMODIUM</i></u>	<u>49</u>
2.1 LES MECANISMES DE RESISTANCE AUX INSECTICIDES	49
2.2 LA RESISTANCE AUX PYRETHRINOÏDES EN AFRIQUES : DISTRIBUTION ET ENJEUX	52
ARTICLE 1 : PYRETHROID RESISTANCE IN AFRICAN ANOPHELINE MOSQUITOES: WHAT ARE THE IMPLICATIONS FOR MALARIA CONTROL ?	52
2.3 DISTRIBUTION DE LA RESISTANCE AU SUD DU BENIN	54
ARTICLE 2 : INSECTICIDE RESISTANCE STATUS IN ANOPHELES GAMBIAE IN SOUTHERN BENIN	54
<u>CHAPITRE 3 : LA GESTION DE LA RESISTANCE AUX INSECTICIDES</u>	<u>57</u>
3.1 EFFICACITE DES COMBINAISONS D'INSECTICIDES AU BENIN : UN ESSAI CONTROLE RANDOMISE	58
ARTICLE 3 : COMBINATION OF MALARIA VECTOR CONTROL INTERVENTIONS IN PYRETHROID RESISTANCE AREA IN BENIN: A CLUSTER RANDOMISED CONTROLLED TRIAL	58
3.2 LES OBSTACLES A L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS	60
3.3 LES OBSTACLES ECOLOGIQUES A LA LUTTE ANTI-VECTORIELLE	61
3.4 OBJECTIFS DE LA THESE	62
<u>CHAPITRE 4 : ANALYSE DE LA SITUATION PRECEDANT L'ESSAI CLINIQUE</u>	<u>63</u>

4.1 VECTEURS, TRANSMISSION ET RESISTANCE	64
ARTICLE 4 : CULICIDAE DIVERSITY, MALARIA TRANSMISSION AND INSECTICIDE RESISTANCE ALLELES IN OUIDAH-KPOMASSE-TORI DISTRICT FROM BENIN : A PRE-INTERVENTION STUDY	64
4.2 DISTRIBUTION SPATIALE ET COMPORTEMENT DE PIQURE DES VECTEURS	65
4.2.1 Résultats	66
4.2.2 Discussion	70
4.3 SAISONNALITE DE LA TRANSMISSION ET UTILISATION DES MOUSTIQUAIRES	71
ARTICLE 5 : DRY SEASON DETERMINANTS OF MALARIA DISEASE AND NET USE IN BENIN, WEST AFRICA	71
4.4 CONCLUSION DE L'ANALYSE PRE-INTERVENTION	73
<u>CHAPITRE 5 : MODELISATION SPATIO-TEMPORELLE DU CONTACT HOMME-VECTEUR</u>	<u>75</u>
5.1 MODELISATION CONCEPTUELLE DU CONTACT HOMME-VECTEUR	76
5.2 ACQUISITION ET TRAITEMENT DES DONNEES	77
5.2.1 Utilisation d'un Systèmes d'Information Géographique	78
5.2.2 Aire de mesure des variables spatiales : la zone tampon	78
5.2.3 Les données extraites d'images satellitaires	79
5.2.4 Autres données	90
5.3 MODELISATION STATISTIQUE D'UN EVENEMENT RARE : LES COMPTES DE VECTEURS	93
ARTICLE 6 : USE OF A MIXTURE STATISTICAL MODEL IN STUDYING MALARIA VECTORS DENSITY	94
5.4 MODELISATION SPECIFIQUE DU CONTACT HOMME-VECTEUR	96
5.4.1 Modélisation des données de présence/absence	98
ARTICLE 7 : MODELLING THE RISK OF BEING BITTEN BY MALARIA VECTORS IN A VECTOR CONTROL AREA IN SOUTH BENIN, WEST AFRICA	98
5.4.2 Modélisation des comptes positifs	100
5.5 CONCLUSION	109
<u>CHAPITRE 6 : ETUDE DE LA RESISTANCE COMPORTEMENTALE</u>	<u>113</u>
ARTICLE 8 : CHANGES IN ANOPHELES FUNESTUS BITING BEHAVIOR FOLLOWING UNIVERSAL COVERAGE OF LONG-LASTING INSECTICIDAL NETS IN BENIN	113
<u>CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE</u>	<u>117</u>
7.1 IDENTIFICATION ET COMPREHENSION DES LIMITES DE LA LAV	118
7.1.1 Limitations opérationnelles	118
7.1.2 Diversité des vecteurs	119
7.2 PROPOSITIONS POUR UNE LUTTE PLUS EFFICACE	123
7.2.1 L'amélioration des méthodes déployées	123
7.2.2 Des méthodes complémentaires pour une lutte intégrée	124
7.2.3 Modélisation et concept de "diagnostic entomologique"	127
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>131</u>
ANNEXE 1 : FACTEURS DU MODELE CONCEPTUEL ET VARIABLES POTENTIELLES DEDUITES	147
ANNEXE 2 : DESCRIPTION DES RELATIONS INTERNES DU MODELE CONCEPTUEL	149
ANNEXE 3 : UTILISATION DES SIG EN EPIDEMIOLOGIE	150
ANNEXE 4 : CLASSES D'OCCUPATION DE SOL POTENTIELLES ET DEFINITIONS	158

ANNEXE 5 : CODE POUR EXTRAIRE LES TEMPERATURES MOYENNES DANS LE VOISINAGE DES VILLAGES D'APRES DES IMAGES MODIS-LST	160
ANNEXE 6 : CODE POUR EXTRAIRE LES NDVI MOYENS DANS LE VOISINAGE DES VILLAGES D'APRES DES IMAGES MODIS-NDVI	165
ANNEXE 7 : CODE POUR EXTRAIRE DES CUMULS DE PRECIPITATIONS INTERPOLEES D'APRES DES STATIONS PLUVIOMETRIQUES OU DES POINTS TRMM (LANGAGE PYTHON)	170
ARTICLES (TEXTES INTEGRAUX)	173

Table des illustrations

FIGURE 1 : TRANSMISSION DU PALUDISME A <i>P. FALCIPARUM</i> EN AFRIQUE EN 2010.....	21
(SOURCE : THE MALARIA ATLAS PROJECT, 2010)	21
FIGURE 2 : TRANSMISSION DU PALUDISME A <i>P. VIVAX</i> EN AFRIQUE EN 2010.	22
(SOURCE : THE MALARIA ATLAS PROJECT, 2010)	22
FIGURE 3 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT ET DE REPRODUCTION DES <i>PLASMODIUM SPP.</i> (CDC 2002).....	23
FIGURE 4 : DUREE DU CYCLE SPOROGENIQUE DE <i>P. FALCIPARUM</i> ET <i>P. VIVAX</i> EN FONCTION DE LA TEMPERATURE (IN DANIS ET MOUCHET 1991).....	24
FIGURE 5 : CYCLE BIOLOGIQUE DES ANOPHELES (D'APRES (CARNEVALE ET AL. 2009)).....	27
FIGURE 6 : CYCLES D'AGRESSIVITE DE PLUSIEURS ESPECES D'ANOPHELES AFRICAINS (D'APRES HAMON (1963)).....	28
FIGURE 7 : POURCENTAGE DE MOUSTIQUES <i>AN. GAMBIAE S.L.</i> RECAPTURES EN FONCTION DE LA DISTANCE AU POINT DE LACHER, EN TANZANIE (D'APRES GILLIES (1961)).....	30
FIGURE 8 : DISTRIBUTION SPATIALE DES PRINCIPALES ESPECES VECTRICES DE PALUDISME EN AFRIQUE. D'APRES SINKA (2012).....	33
FIGURE 9 : UN COLLECTEUR LORS DE CAPTURES SUR SUJET HUMAIN (CSH) A KINDJITOKPA, BENIN (NICOLAS MOIROUX 2011)	35
FIGURE 10 : INTERVALLES DE CONFIANCE DE LA MESURE DU TAUX DE PARTURITE EN FONCTION DE L'EFFECTIF TESTE (IN DE MEILLON ET AL. (1967)).....	38
FIGURE 11 : INSTALLATION D'UNE MOUSTIQUAIRE IMPREGNEE. STATION DE SOUMOUSO. BURKINA FASO. (JEAN-JACQUES LEMASSON, 1992)	45
FIGURE 12 : ASPERSION INTRA-DOMICILIAIRE D'INSECTICIDE A MAYOTTE (VINCENT ROBERT, 2008).....	46
FIGURE 13 : PULVERISATION SPATIALE EN ANGOLA, (PIERRE CARNEVALE 2006).....	47
FIGURE 14 : REPRESENTATION DE MECANISMES IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE PHYSIOLOGIQUE AUX INSECTICIDES (IN CARNEVALE ET AL. (2009))	50
FIGURE 15 : ABONDANCES CUMULEES ET COMPOSITION SPECIFIQUE DES POPULATIONS DE VECTEURS PENDANT LA PHASE PRE-INTERVENTION (OCTOBRE 2007 - MAI 2008).	67
FIGURE 16 : ABONDANCES DE <i>AN. GAMBIAE S.S.</i> ET REPARTITION PAR FORMES MOLECULAIRES PENDANT LA PHASE PRE-INTERVENTION (OCTOBRE 2007 - MAI 2008).....	68
FIGURE 17 : TAUX D'ENDOPHAGIE ET D'EXOPHAGIE DES VECTEURS DE PALUDISME PENDANT LA PHASE DE PRE-INTERVENTION.....	69
FIGURE 18 : CYCLE HORAIRE DES PIQURE DES VECTEURS DE PALUDISME PENDANT LA PHASE DE PRE-INTERVENTION.....	69
FIGURE 19 : MODELE CONCEPTUEL POUR L'IDENTIFICATION DES VARIABLES EXPLICATIVES DU CONTACT HOMME-VECTEUR.....	77
FIGURE 20 : ERREUR DE PREDICTION DES MODELES DE COMPTES DE (A) <i>AN. FUNESTUS</i> ,.....	105
(B) <i>AN. GAMBIAE S.S.</i> FORME M ET (C) FORME S.....	105

FIGURE 21 : COMPTES DE (A) <i>AN. FUNESTUS</i> , (B) <i>AN. GAMBIAE</i> S.S. FORME M ET (C) FORME S PREDIS ET OBSERVES DANS LES VILLAGES DE L'ETUDE	106
--	-----

Table des tableaux

TABLEAU 1 : VARIABILITE DE LA CAPACITE VECTORIELLE POUR UN MEME TAUX DE PARTURITE	39
TABLEAU 2 : METHODES DE LUTTE ANTI-VECTORIELLE ET PARAMETRES DE LA BIOLOGIE DU VECTEUR VISE.....	43
TABLEAU 3 : DESCRIPTION DES INDICATEURS PAYSAGERS CALCULES AU VOISINAGE DE CHAQUE VILLAGE	83
TABLEAU 4 : MODELISATION DES COMPTES POSITIFS A <i>AN. FUNESTUS</i>	102
TABLEAU 5 : MODELISATION DES COMPTES POSITIFS A <i>AN. GAMBIAE</i> FORME M.....	103
TABLEAU 6 : MODELISATION DES COMPTES POSITIFS A <i>AN. GAMBIAE</i> FORME S	103

Liste des articles

Article 1 :

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 in Parasitology* 2011, 27:91-98.

Article 2 :

Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, **Moiroux N**, Banganna S, Corbel V, N'Guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto M: Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal* 2010, 9:83.

Article 3 :

Corbel V, Akogbeto M, Damien G, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, **Moiroux N**, Chabi J, Banganna B, Padonou G, Henry M-C: Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomized controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* 2012, 12:617-626.

Article 4 :

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

Article 5 :

Moiroux N, Bousari O, Djènontin A, Damien G, Cottrell G, Henry M-C, Guis H, Corbel V: Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. *PLoS One* 2012; 7(1): e30558.

Article 6 :

Bousari O., **Moiroux N.**, Iwaz J., Djenontin A, Bangana ASB, Corbel V, Fonton N, Ecochard R: Use of a mixture statistical modeling in studying malaria vectors density. *Plos One* 2012; 7(11): e50452.

Article 7 :

Moiroux N., Bangana A.S.B., Djènontin A., Chandre F., Corbel V., Guis H., Modeling the risk of being bitten by malaria vectors in a vector control area in south Benin, West Africa. *Parasites & Vectors (Submitted) 2013*

Article 8 :

Moiroux N., Gomez B.M., Pennetier C., Elanga E., Djenontin A., Djegbe I., Chandre F., Guis H., Corbel V., Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *The Journal of Infectious Diseases* 2012; 206 (10), 1622-9

Communications scientifiques

Communications orales

Moiroux N, Gomez B.M., Pennetier C., *et al.*: Changes in Anopheles funestus biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. In: *61th annual meeting of the ASTMH*. Atlanta, USA. 11-15 November 2012.

Moiroux N, Guis H and Corbel V: Modélisation spatio-temporelle du risque de transmission du paludisme dans un contexte de lutte anti-vectorielle au Sud du Bénin. In *Séminaire de l'UMR MiVEGEC*. Montpellier, France. 1 March 2012.

Moiroux N, Bousari O, Djènontin A, *et al.*: Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. *Séminaire scientifique du CREC*. Cotonou, Bénin. 18 May 2011.

Moiroux N, Guis H and Corbel V: Modéliser le risque de transmission du paludisme dans un contexte de lutte antivectorielle : Enjeux et méthode. In *Symposium International Paludisme et Trypanosomoses Humaine : Nouvelles stratégie de lutte et de contrôle*; Cotonou, Bénin 2010

Posters

Moiroux N, Bangana A.S.B., Djènontin A., *et al.*: Modeling the spatio-temporal distribution of M and S molecular forms of Anopheles gambiae and Anopheles funestus in south Benin. In: *18e conference of the European Society of Vector Ecology*. Montpellier, France. 8-11 October 2012.

Moiroux N, Gomez B.M., Pennetier C., *et al.*: Malaria vectors are not vampires: Changes in biting behaviour after universal coverage with long-lasting insecticidal nets in Benin. In: *18e conference of the European Society of Vector Ecology*. Montpellier, France. 8-11 October 2012.

Moiroux N, Gomez B.M., Pennetier C., *et al.*: Malaria vectors are not vampires: Changes in biting behaviour after universal coverage with long-lasting insecticidal nets in Benin. In: *XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria*. Rio de Janeiro, Brazil. 23-27 September 2012.

Moiroux N, Gomez B.M., Pennetier C., *et al.*: Malaria vectors are not vampires: Changes in biting behaviour after universal coverage with long-lasting insecticidal nets in Benin. In: *Assemblée générale annuelle de l'UMR MiVEGEC*. Montpellier, France. 27 June 2012.

Moiroux N, Bousari O, Djènontin A, *et al.*: Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. In: *60th annual meeting of the ASTMH*. Philadelphia, USA. 4-8 December 2011.

Moiroux N, Bousari O, Djènontin A, Damien, *et al.*: Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. In: *Assemblée générale annuelle de l'UMR MiVEGEC*. Montpellier, France. 28-29 June 2011.

Liste des abréviations

AChE : acétylcholinestérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : *Anopheles funestus*

AGM : *Anopheles gambiae* s.s. forme moléculaire M

AGS : *Anopheles gambiae* s.s. forme moléculaire S

AI : Aspersions Intra-domiciliaires

BMI : Bâches Murales Imprégnée d'insecticide

CSH : Capture sur Sujet Humain

CREC : Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou

CSP : Circumsporozoite Protein

CTPS : voir BMI

DAC : Détection Active des Cas

DDT : Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESRI : Environmental Systems Research Institute

GPS : Global Positioning System

GRI : Gestion de la Résistance aux Insecticides

GST : Glutathion-S-Transférases

IC95% : Intervalles de Confiance à 95%

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

IRS : voir AI

KDR : Knock-Down Resistance

LAV : Lutte Anti-Vectorielle

LST : Land Surface Temperatures

MAP : Maximum des probabilités *A Posteriori*

MI : Moustiquaires Imprégnées d'insecticide

MIILD : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'action

MIS : Moustiquaires Imprégnées en couverture Selective

MIU : Moustiquaires Imprégnées en couverture Universelle

MNE : Modèle Numérique d'Élévation

MODIS : Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer
NASA : National Aeronautics and Space Agency
NB : Negative Binomiale
NDVI : Normalized Difference Vegetation Index
NPMP : Non-Parametric Mixed Poisson
OKT : Ouidah-Kpomassè-Tori
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OR : Odds-Ratio
P : Poisson
PCR : Polymerase Chain Reaction
PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
RIDL : Release of Insects Carrying a Dominant Lethal
RTI : Rapport de Taux d'Incidence
SIG : Système d'Information Géographique
SPOT : Satellite pour l'Observation de la Terre
TIE : Taux d'Inoculation Entomologique
TLLIN : *voir* MIS
TRMM : Tropical Rainfall Measuring Mission
ULLIN : *voir* MIU
USAID : United States Agency for International Development
ZINB : Zero Inflated Negative Binomial
ZIP : Zero Inflated Poisson

Introduction

Plus d'un siècle après la découverte du mode de transmission du parasite responsable du paludisme chez l'homme, cette maladie est encore une des premières causes de mortalité en Afrique. Malgré les efforts consentis durant la décennie 2000, il est vraisemblable que l'objectif de réduction de 75 % de la mortalité due au paludisme d'ici 2015 ne sera pas atteint. L'absence d'un vaccin efficace, la difficulté d'accès aux soins, la résistance des parasites aux antipaludéens et des moustiques aux insecticides constituent les principales menaces pour la prévention et le contrôle du paludisme à l'échelle mondiale. En 2015, l'année du bilan, il sera important de mesurer les succès mais aussi de comprendre les échecs afin de réorienter les stratégies de lutte et de proposer de nouveaux outils plus performants pour endiguer ce fléau. Cette thèse s'inscrit dans cette optique d'une meilleure compréhension des systèmes vectoriels afin d'améliorer les stratégies de lutte anti-vectorielle (LAV).

Le chapitre 1 contient une introduction bibliographique dont le but est d'aborder l'ensemble des notions nécessaires à la compréhension du document de thèse et des articles qui le compose. Il décrit la biologie du *Plasmodium*, parasite responsable du paludisme chez l'homme et la biologie des anophèles qui sont les vecteurs de ce parasite. Une partie de ce chapitre est également consacrée à la LAV et à son siècle d'histoire. Nous y décrivons, en fonction des éléments de la biologie des vecteurs qu'elles visent, les méthodes de LAV en usage actuellement pour lutter contre le paludisme.

Le chapitre 2 traite de l'un des principaux obstacles à la LAV qu'est la résistance des anophèles aux insecticides. Nous en définissons les principaux mécanismes et faisons apparaître l'étendue du problème en Afrique et particulièrement au Bénin où se sont déroulés ces travaux de thèse. La fréquence et l'intensité de ces résistances ainsi que les implications opérationnelles y sont discutées.

Dans le chapitre 3, nous décrivons les différentes méthodes proposées pour gérer ces phénomènes de résistances aux insecticides. Nous y présentons également les résultats du premier essai clinique visant à comparer l'efficacité de nouvelles méthodes combinées de LAV au Bénin visant à réduire la morbidité palustre tout en gérant les résistances chez les vecteurs de paludisme. Cet essai n'ayant pas permis de mettre en évidence une efficacité

supplémentaire des combinaisons par rapport à la méthode de base déployée par le Programme national de Lutte contre le Paludisme (PNLP), nous dressons un état des lieux des principales causes permettant d'expliquer cet échec de traitement au niveau communautaire.

Dans le chapitre 4, nous présentons une étude rétrospective afin de mieux comprendre la situation entomologique et épidémiologique avant la mise en place de l'essai clinique dans la zone sanitaire de Ouidah-Kpomassé-Tori (phase pré-intervention). Nous y décrivons l'état de la transmission, les populations de vecteurs, leurs répartitions géographiques, leurs comportements et les résistances aux insecticides. Nous y analysons également la saisonnalité de la maladie en lien avec les différents vecteurs et l'utilisation des moustiquaires. Nous dégageons ainsi certaines limites à l'efficacité de la LAV, liées à la diversité des vecteurs, à leur comportement et au comportement en lien avec les outils de LAV.

Dans le chapitre 5, nous tentons d'identifier les principaux facteurs ayant contribué à l'échec des méthodes combinées de LAV en s'intéressant à la bio-écologie des anophèles et aux facteurs de risque du contact homme-vecteur dans un contexte de lutte anti-vectorielle (phase post intervention). Nous y décrivons dans un premier temps l'intérêt de l'usage de la modélisation et le résultat d'une analyse bibliographique nous permettant d'identifier les variables environnementales pertinentes pour l'étude du contact homme-anophèles. Les méthodes nécessaires à l'acquisition et au traitement des données environnementales y sont décrites. Ces méthodes s'appliquent notamment aux enquêtes de terrain, à l'analyse d'image satellites, à l'analyse de données géo-référencées dans un système d'information géographique (SIG). Plusieurs méthodes statistiques sont utilisées pour décrire les relations entre les vecteurs et leur environnement ce qui nous permet de mettre en évidence le rôle de la diversité des anophèles dans l'échec de la LAV.

Au chapitre 6, nous mettons en évidence un impact de la LAV sur le comportement des anophèles vecteurs se traduisant par un accroissement des piqûres d'anophèle se produisant à l'extérieur et à l'aube après la mise en place d'une couverture universelle en moustiquaires imprégnées d'insecticides.

Enfin, au chapitre 7, nous discutons l'ensemble de nos résultats et proposons des améliorations pour les méthodes de LAV actuelles. Sur la base des travaux réalisés dans cette thèse, nous définissons les caractéristiques des méthodes de lutte à déployer dans le futur.

Nous proposons également l'élaboration d'un outil de diagnostic, basé sur une cartographie à haute résolution des populations d'anophèles afin de mettre en place des stratégies de lutte efficaces et adaptées aux différents faciès entomologiques.

Chapitre 1 : Paludisme et Lutte anti-vectorielle en Afrique

Le paludisme humain est une maladie infectieuse à transmission vectorielle faisant intervenir trois protagonistes : (i) l'homme (en tant qu'hôte) est infecté par (ii) un protozoaire parasite du genre *Plasmodium* qui lui a été transmis par (iii) un moustique vecteur du genre *Anopheles*. La moitié de la population mondiale vit en zone à risque de paludisme, 216 millions d'entre eux ont contracté la maladie en 2010 et 655 000 en sont morts selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO 2011). Toujours d'après l'OMS, 81% des cas se sont produits en Afrique et 86% des décès sont survenus chez des enfants de moins de cinq ans. Ces chiffres pourraient être grandement sous-évalués si l'on se réfère aux travaux de Murray *et al.* (2012) dont les estimations indiquent des taux d'incidence et de mortalité environ deux fois supérieurs à ceux estimés par l'OMS. Quelle que soit la méthode d'estimation employée, il convient de retenir que le paludisme est un grave problème majeur de santé publique touchant principalement les pays les plus pauvres et qu'il est une entrave sérieuse à leur développement économique (Sachs and Malaney 2002).

Les paragraphes qui suivent décrivent la biologie, la diversité et la distribution spatiale des parasites et des vecteurs qui interviennent dans la survenue et la transmission du paludisme en Afrique.

1.1 Les parasites : *Plasmodium spp.*

Les pathogènes responsables du paludisme chez l'homme sont des protozoaires parasites appartenant à 5 espèces du genre *Plasmodium*. Parmi elles, *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890, *Plasmodium ovale* Stephens, 1922, *Plasmodium malariae* Feletti & Grassi, 1889 et *Plasmodium knowlesi* Sinton & Mulligan, 1933 appartiennent au sous-genre *Plasmodium* tandis que *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 appartient au sous-genre *Laverania*. *Plasmodium falciparum* est le premier responsable de la mortalité liée au paludisme, il est principalement présent en Afrique. En raison notamment d'une distribution géographique plus large, *P. vivax* infecte plus de personnes mais est cependant moins létal que *P. falciparum*. Les trois autres espèces (*P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*) sont moins répandues et ne sont pas responsables d'accès palustres graves (WHO 2011). Excepté *P. knowlesi*, toutes les espèces sont présentes sur le continent africain. Les Figure 1 et 2

présentent la distribution spatiale de la transmission du paludisme à respectivement, *P. falciparum* et *P. vivax* en Afrique en 2010. La zone hachurée de la Figure 2 décrit l'espace dans lequel les populations sont à plus de 90% dépourvues de l'antigène Duffy à la surface des hématies. Cet antigène est le récepteur permettant l'entrée de *P. vivax* (et *P. knowlesi*) dans ces hématies (Cf. § 1.1.1). Une large partie de la population africaine étant dépourvues de cet antigène (Duffy négatives), elle est donc résistante à l'infection par *P. vivax*.

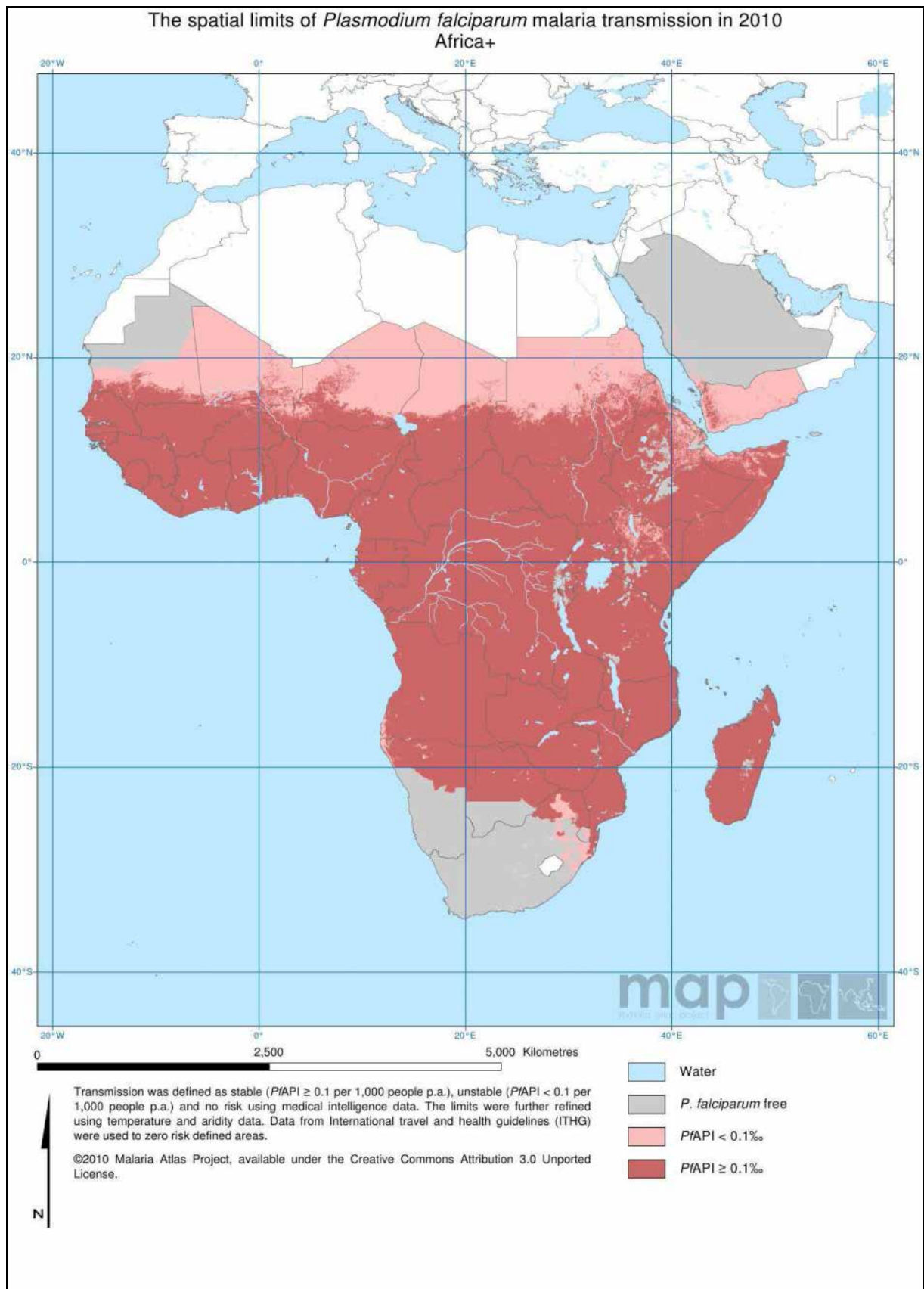


Figure 1 : Transmission du paludisme à *P. falciparum* en Afrique en 2010.

(Source : The Malaria Atlas Project, 2010)

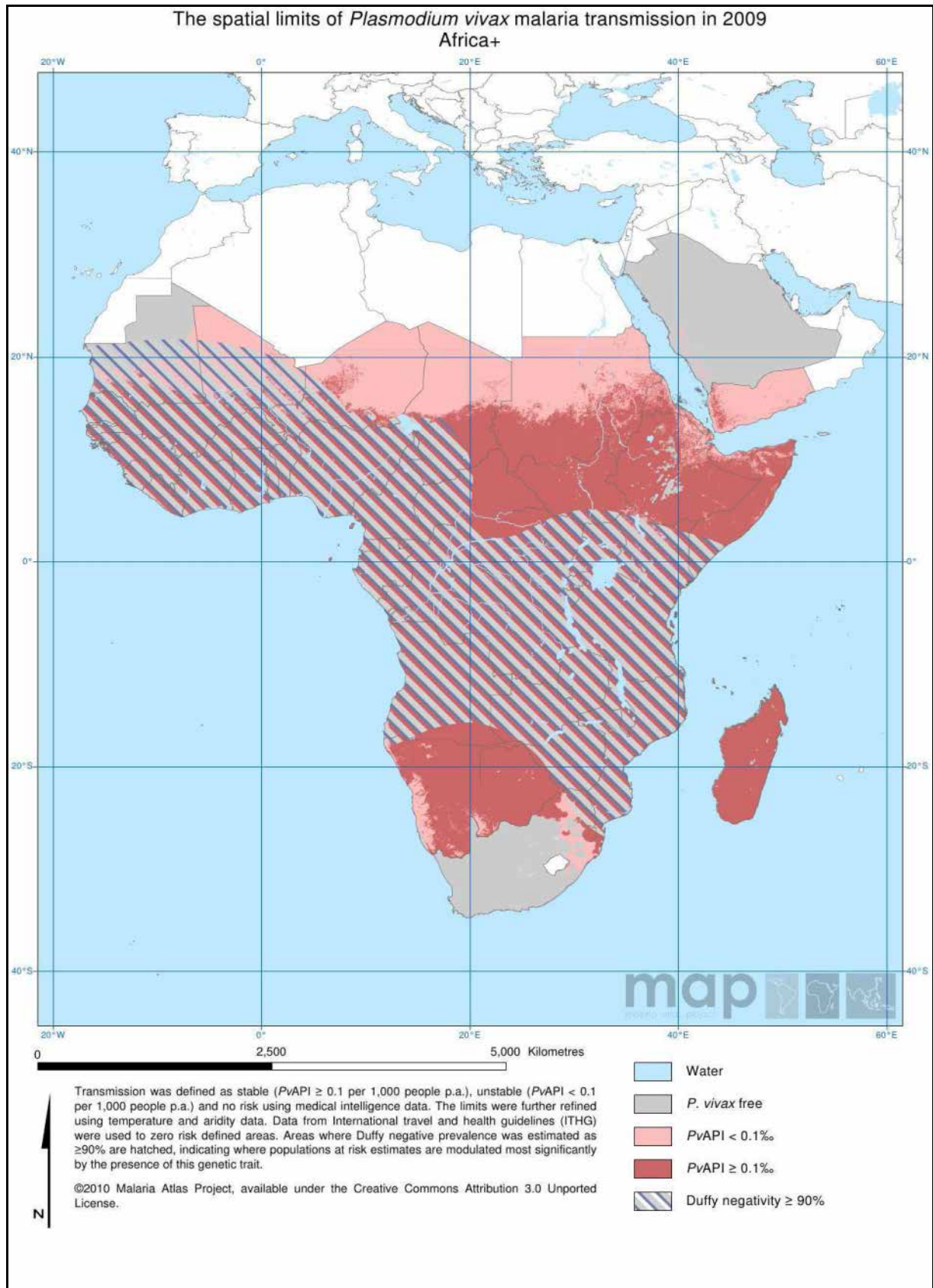


Figure 2: Transmission du paludisme à *P. vivax* en Afrique en 2010.

(Source : The Malaria Atlas Project, 2010)

1.1.1 Cycle de vie des *Plasmodium spp.*

Les *Plasmodium spp.* accomplissent leur reproduction sexuée chez le moustique anophèle. Le cycle commence lorsqu'un anophèle prend son repas sanguin sur un humain porteur de gamétocytes (Figure 3). Les gamétocytes ingérés avec le sang sont résistants aux enzymes digestives de l'anophèle. Les gamétocytes se transforment pour permettre la fécondation d'un macro-gamète femelle par un microgamète mâle. L'œuf obtenu donne un zygote mobile nommé ookinète. L'ookinète migre dans les parois de l'estomac de l'anophèle et s'y enkyste sous la forme d'un oocyste qui après maturation et rupture, libérera des sporozoïtes. Ces sporozoïtes migrent via l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés à un nouvel hôte humain à l'occasion d'une piqûre. La durée de ce cycle, également appelé cycle sporogonique (ou extrinsèque) du *Plasmodium* chez l'anophèle, est largement dépendante de la température (Figure 4) ; la durée du cycle diminuant avec l'accroissement des températures.

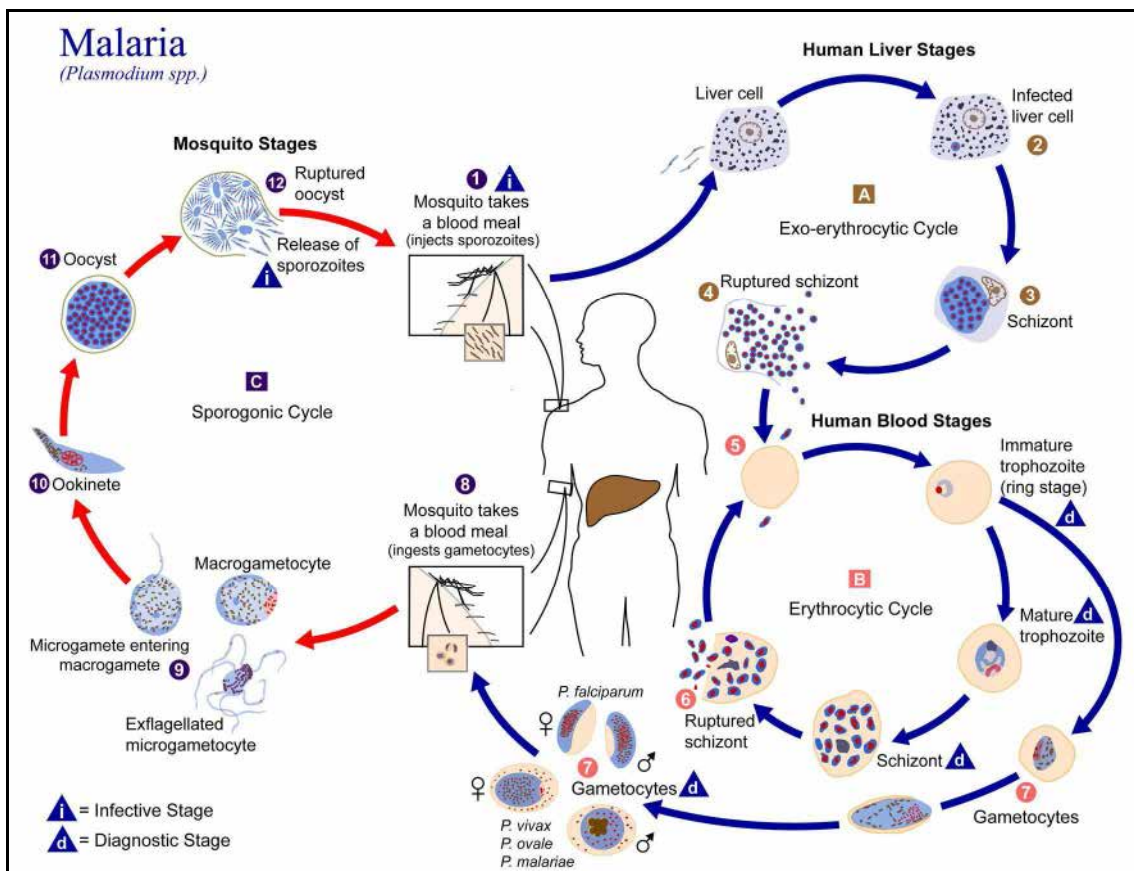


Figure 3 : Cycle de développement et de reproduction des *Plasmodium spp.* (CDC 2002)

Chez l'homme, les sporozoïtes inoculés lors de la piqûre infectante vont atteindre le foie et pénétrer les hépatocytes, s'y multiplier et produire des schizontes hépatiques (phase exo-érythrocytaire). Arrivé à maturité (8 à 10 jours), le schizonte éclate et libère des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chez *P. vivax* et *P. ovale*, un stade dormant de schizontes hépatiques (hypnozoïtes) peut persister dans le foie et libérer les mérozoïtes après plusieurs mois. Les mérozoïtes vont ensuite pénétrer les érythrocytes (hématies), y effectuer une multiplication sexuée qui produit de nouveaux mérozoïtes érythrocytaires qui sont à leur tour libérés dans la circulation sanguine et qui infecteront des érythrocytes sains (phase érythrocytaire). Des formes sexuées de parasites vont apparaître dans le sang durant la phase érythrocytaire : ce sont des gamétocytes sexués, libres et non pathogènes pour l'hôte qui pourront être prélevés par un anophèle à l'occasion d'un repas sanguin et ainsi assurer la survie de l'espèce. L'infectiosité des gamétocytes pour les anophèles réduirait après une dizaine de jours dans la circulation périphérique (Lensen *et al.* 1999). Ainsi, les mécanismes permettant la reprise de la transmission après plusieurs mois en absence apparente de vecteurs (saison sèche), dans les régions sahéliennes notamment, ne sont pas clairement identifiés. Les hypothèses les plus probables sont la production continue de gamétocytes et/ou une production massive induite par un signal inducteur non connu en début de saison de transmission (Carnevale *et al.* 2009).

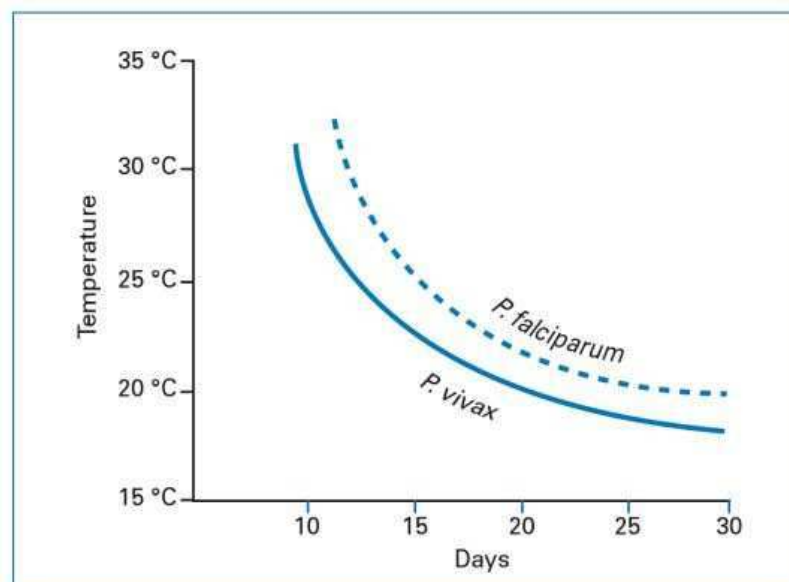


Figure 4 : Durée du cycle sporogonique de *P. falciparum* et *P. vivax* en fonction de la température (In Danis et Mouchet 1991)

1.2 Les vecteurs : *Anopheles spp.*

Les moustiques (*Diptera : Culicidae*) capables de transmettre les *Plasmodium* sont tous du genre *Anopheles* dont nous présentons aux paragraphes 1.2.1 à 1.2.3 les cycles de vie et les traits comportementaux associés.

D'après Hambach (2004), le genre *Anopheles* comprend 484 espèces sur la planète dont une soixantaine est vectrice de *Plasmodium*. Il y a en Afrique sub-saharienne environ 150 espèces d'anophèles dont une trentaine est vectrice de *Plasmodium*. La classification taxinomique des anophèles, basée d'abord sur des critères morphologiques puis complétée d'observations étho-écologiques, biogéographiques et de données génétiques s'organise sur des complexes et des groupes d'espèces. Les espèces appartenant à un même groupe sont très proches morphologiquement et présentent des différences à au moins un stade de leur développement tandis que les espèces appartenant à un même complexe sont morphologiquement identiques à tous les stades de leur développement. En Afrique sub-saharienne, les principales espèces vectrices se répartissent en 3 groupes ou complexes qui sont décrits dans les paragraphes 1.2.4 à 1.2.6.

1.2.1 Cycle biologique des anophèles

Les anophèles sont des insectes holométaboles¹ (ou endoptérygotes) dont le développement se déroule en quatre stades : zygotique (œuf), larvaire et nymphal qui sont aquatiques et le stade adulte (ou imaginal) qui est aérien et ailé (Figure 5). La femelle d'anophèle pond entre 40 et 100 œufs à la surface de l'eau. L'œuf éclos après 24 à 48 h (en fonction de la température) donnant naissance à une larve qui se maintient juste en dessous de la surface de l'eau. Comme elle a une respiration aérienne et qu'elle est dépourvue de siphon (contrairement aux autres *culicidae*), la larve d'anophèles se maintient dans une position horizontale caractéristique. La croissance larvaire comprend quatre stades qui aboutissent après une dernière mue à une nymphe mobile qui ne s'alimente pas. La métamorphose permet finalement l'émergence d'un adulte ailé. La phase aquatique des anophèles peut durer, en zone tropicale, de une à trois semaines en fonction de l'espèce et de la température.

¹ Se dit des insectes chez qui le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal. Les larves et les adultes de ces insectes ont, en général, une morphologie et des modes de vie très différents.

L'anophèle adulte qui vient d'émerger reste immobile pendant 24 à 48 h le temps que sa cuticule sèche, que ses ailes se déploient et que son appareil reproducteur soit fonctionnel. Les adultes mâles ne vivent que 7 à 10 jours tandis que les femelles peuvent vivre jusqu'à 4 semaines.

L'allocation des ressources chez les anophèles est dédiée à deux activités : la recherche d'alimentation sucrée (qui procure l'énergie nécessaire au vol) et la reproduction. Pour les mâles, la reproduction se limite à l'accouplement qui se produit quelques jours après l'éclosion et qui peut être précédé de la formation d'essaims dans le but probable d'attirer les femelles. Les femelles ne copulent en principe qu'une seule fois et stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque jusqu'à leur mort. Pour ces dernières, l'activité de reproduction est accompagnée de la recherche successive d'un repas sanguin, d'un site de repos et d'un site d'oviposition. Le repas de sang est nécessaire à la maturation des follicules ovariens qui pourront alors être fécondés, au moment de la ponte, par les spermatozoïdes stockés. Après la ponte, la femelle cherche à prendre un nouveau repas sanguin afin d'effectuer une nouvelle oviposition : ce cycle est appelé cycle gonotrophique (ou trophogonique) dont les trois phases peuvent être résumées ainsi (Beklemishev 1940 *in* (Detinova 1962)) :

- La femelle à jeun recherche un hôte sur lequel prendre son repas de sang et le pique.
- La femelle ingère le sang et digère en situation de repos, la maturation des follicules ovariens s'effectue.
- La femelle gravide recherche un site d'oviposition et y pond.

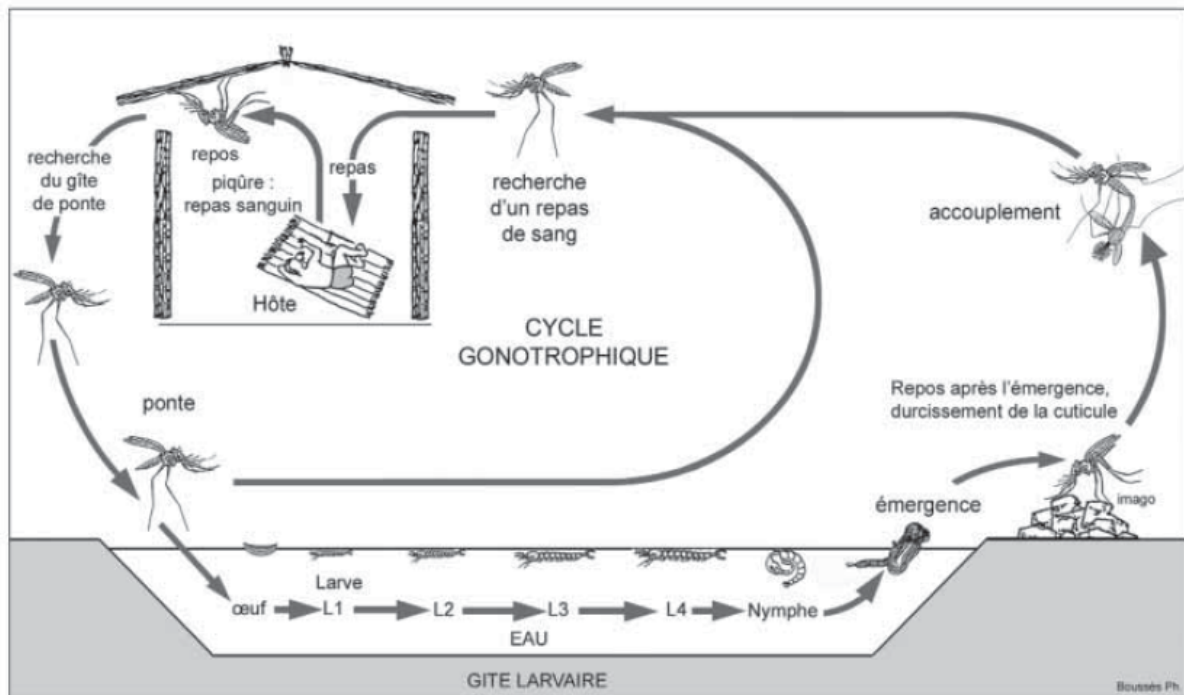


Figure 5 : Cycle biologique des anophèles (d'après (Carnevale *et al.* 2009))

La durée du cycle gonotrophique est une donnée essentielle en épidémiologie du paludisme puisqu'elle rythme la fréquence des contacts hôte-vecteur et donc le passage du parasite de l'un à l'autre. La durée de ce cycle est influencé par un certain nombre de facteurs environnementaux (disponibilité des hôtes, des lieux de repos, des sites d'oviposition, conditions météorologiques et microclimatiques, etc.) et intrinsèques aux anophèles (cycle d'activité, comportement...). Le premier cycle est systématiquement plus long que les suivants qui durent entre 48 et 72h. Les femelles qui n'ont jamais pondu sont dites "nullipares" tandis que celles ayant déjà effectué au moins une oviposition sont dites "pares".

1.2.2 Comportement trophique

L'étude du comportement trophique des anophèles est essentielle pour déterminer leurs rôles dans la transmission du *Plasmodium* et développer ou appliquer des méthodes de lutte adaptées.

La préférence trophique (anthropophilie *versus* zoophilie) d'une espèce d'anophèle capable de transmettre le *Plasmodium* définira son statut de vecteur, une espèce exclusivement zoophile ne présentant aucun risque pour l'homme en termes de transmission.

La préférence trophique n'est cependant pas l'unique facteur dirigeant le choix d'une femelle à la recherche d'un hôte, son comportement préférentiel pourra en effet être contraint par des facteurs exogènes tels que la disponibilité des hôtes, les conditions climatiques ou le biotope.

La majorité des vecteurs de paludisme piquent de nuit (Figure 6). La distribution de l'agressivité varie selon les espèces, l'âge physiologique, le lieu et la saison. Par ailleurs, certains vecteurs piquent préférentiellement à l'intérieur des maisons (endophagie) tandis que d'autres piquent préférentiellement à l'extérieur (exophagie).

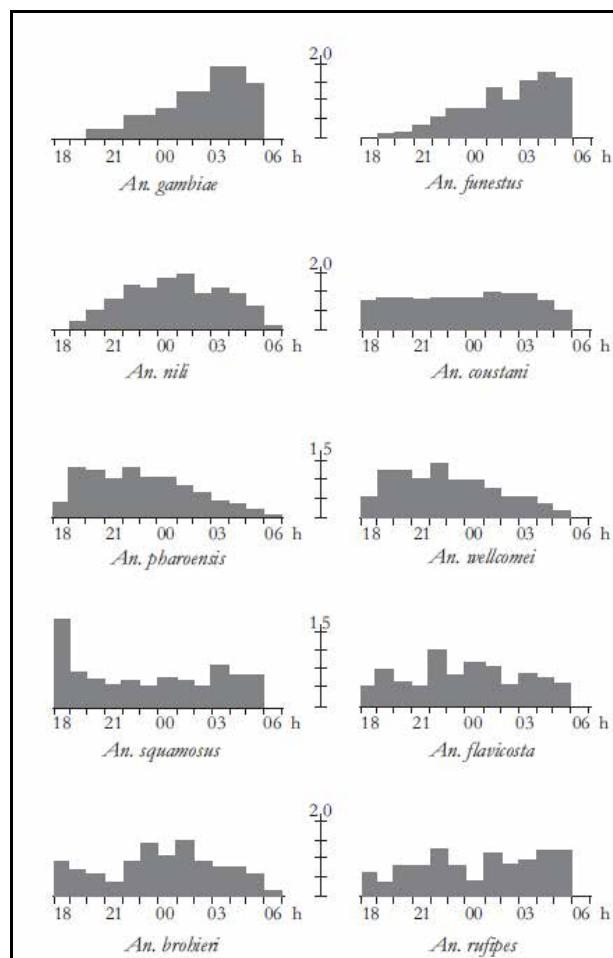


Figure 6 : Cycles d'agressivité de plusieurs espèces d'anophèles africains (d'après Hamon (1963))

Après le repas sanguin, certains vecteurs restent dans la maison durant toute la phase de repos du cycle gonotrophique ; on parle alors de vecteurs "endophiles". A l'inverse, d'autres vecteurs quittent la maison où ils ont pris le repas sanguin pour trouver un lieu de repos à l'extérieur, ceux-ci sont dits "exophiles".

Il y a plusieurs évidences d'un changement de comportement des vecteurs en cas d'infection par des *Plasmodium* (Cator *et al.* 2012). Par exemple, l'infection par *P. falciparum* ou *P. vivax* pourrait induire des changements dans le cycle nocturne d'agressivité d'*An. punctulatus* en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Bockarie and Dagoro 2006). En Afrique, Les individus infectés de *An. gambiae* semblent multiplier le nombre d'hôtes dans une même nuit leur permettant d'achever plus souvent leur repas sanguin (Koella *et al.* 1998, Lindsay *et al.* 1990).

1.2.3 Vol et dispersion

Si l'on excepte les dispersions passives (vent, transport anthropique) ou les migrations, qui permettent parfois des déplacements de plusieurs dizaines de kilomètres (Bailey and Baerg 1967, Garrett-Jones 1962, Silver 2008), il y a 5 raisons qui motivent la dispersion des moustiques : l'accouplement, les repas de nectar, les repas sanguins, la phase de repos après un repas sanguin et l'oviposition (Service 1997). Les distances parcourues lors de ces déplacements sont plutôt courtes. Ces déplacements locaux sont cependant influencés par différents facteurs, tels que le vent ou la densité d'habitation (Gillies 1961). Les études sur la dispersion des anophèles vecteurs du *Plasmodium* sont peu nombreuses en Afrique, elles s'accordent néanmoins pour dire que ces vecteurs sont capables de parcourir entre 4 et 6 kilomètres (Costantini *et al.* 1996, Gillies 1961, Thomson *et al.* 1995). Cependant, les études utilisant la méthode "capture-marquage-recapture" montrent que plus de 50% des insectes marqués sont re-capturés à moins d'un kilomètre du site de lâcher (Gillies 1961, Silver 2008, Takken *et al.* 1998) (Cf. Figure 7). Il a été montré en Tanzanie, une tendance d'un vecteur à retourner piquer là où il avait déjà prit un repas sanguin (McCall *et al.* 2001) ce qui confirme la thèse des déplacements courts. En Gambie, il a été montré une forte diminution du nombre de vecteurs au-delà de 2 km d'un gîte larvaire (Clarke *et al.* 2002). Il est donc recommandé de considérer cette limite des 2 km comme la distance de vol maximum des anophèles. Selon Service (1997), dans les programmes de contrôle du paludisme, les gîtes situés au-delà de cette barrière peuvent être considérés comme ayant un impact négligeable sur la transmission. Cependant, on remarque que toutes ces études sur la dispersion des anophèles réalisées en Afrique l'ont été dans des milieux relativement ouverts (savanes), or ces milieux pourraient favoriser la dispersion par rapport à des zones plus fermées (Silver 2008).

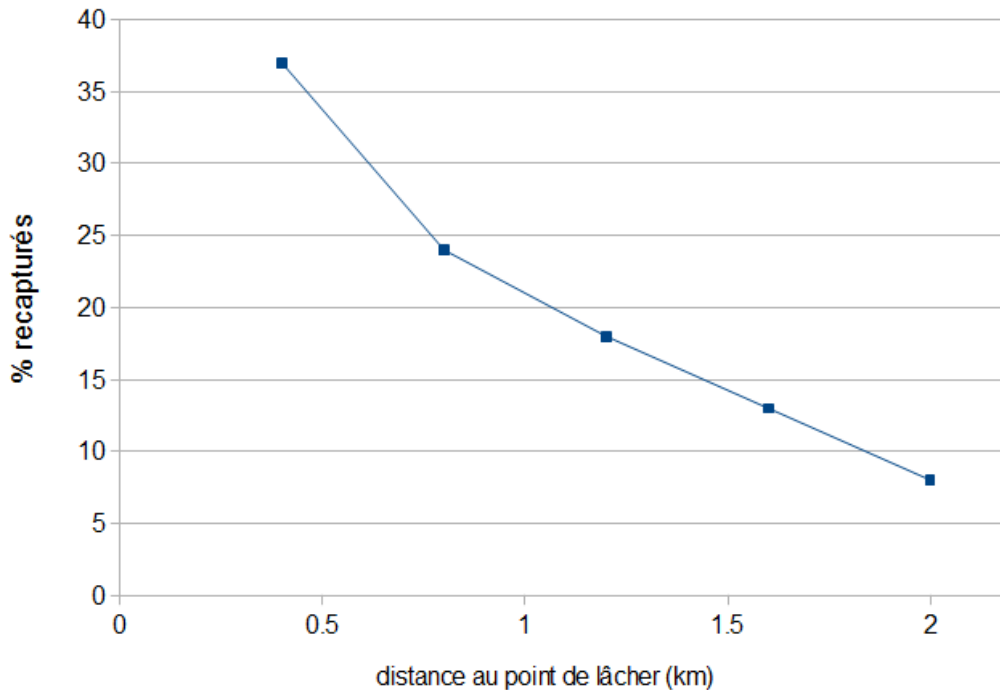


Figure 7 : Pourcentage de moustiques *An. gambiae s.l.* recapturés en fonction de la distance au point de lâcher, en Tanzanie (d'après Gillies (1961))

1.2.4 Le complexe Gambiae

Le complexe Gambiae compte huit espèces (*An. gambiae stricto sensu* Giles, 1902 ; *An. arabiensis* Patton, 1905 ; *An. melas* Theobald, 1903 ; *An. merus* Donitz, 1902 ; *An. bwambae* White, 1985 ; *An. quadriannulatus* A Theobald, 1911 ; *An. quadriannulatus* B Hunt, 1998 ; *An. comorensis* Bruhnes, 1997).

Anopheles gambiae s.s. et *An. arabiensis* sont des vecteurs majeurs de paludisme à larges aires de répartition (Figure 8). *Anopheles arabiensis* est présent dans toute la zone afro-tropicale excepté les zones de forêts. Il est parfaitement adapté au climat sec du Sahel et est réputé plus zoophile que *An. gambiae s.s.* considéré lui, comme très anthropophile. *Anopheles gambiae s.s.* est généralement présent dans toute la zone afro-tropicale excepté la corne de l'Afrique et les zones les plus sèches (< 500 mm de précipitations).

Au niveau infra-spécifiques, 5 formes chromosomiques de *An. gambiae s.s.* ont été décrites sur la base de critères cytogénétiques² (polymorphisme d'une inversion paracentrique³

² La cytogénétique est l'étude de la structure des chromosomes et des variations de cette structure.

³ Une inversion paracentrique est une anomalie de structure d'un chromosome.

sur le chromosome 2) : « Bamako », « Savane », « Forêt », « Mopti » et « Bissau » (Coluzzi *et al.* 1985, Coluzzi *et al.* 2002). Ces variations non-aléatoires des inversions sur le chromosome 2 correspondent à des zones géographiques et à des caractéristiques des gîtes larvaires, elles constituent des indicateurs d'adaptations à différents habitats.

En 2001, Della-Torre *et al.* (2001) ont décrit deux formes moléculaires (M et S) chez *An. gambiae s.s.* dont la correspondance avec les formes chromosomiques varie en fonction de l'espace géographique et écologique. En raison d'un isolement reproductif entre les deux formes (c.-à-d. avec de rares d'hybrides, peu viables) et de flux de gènes apparemment très restreints même en zone de sympatrie, il est admis que les divergences observées entre ces deux formes correspondent à un début de spéciation. Les préférences écologiques de ces deux formes moléculaires divergent fortement (Costantini *et al.* 2009, Gimonneau *et al.* 2011, Simard *et al.* 2009). La forme S est plus fréquemment observée dans les zones plus sèches, en milieux ouverts, qui favorisent les gîtes larvaires temporaires avec peu de prédateurs. La forme M, dont le développement larvaire est plus long (Diabate *et al.* 2008, Diabate *et al.* 2005) et qui est moins sensible à la prédation (Gimonneau *et al.* 2010, Gimonneau *et al.* 2012), préfère les milieux aquatiques permanents ou semi-permanents.

Au sein de ce complexe, deux autres espèces sont d'excellents vecteurs de *Plasmodium*, *An. melas* Theobald, 1903 et *An. merus* Donitz, 1902. Elles sont caractérisées par leurs gîtes larvaires en eaux saumâtres. Leurs distributions spatiales sont donc restreintes respectivement aux bandes côtières des Océans Atlantique et Indien de l'Afrique tropicales.

Anopheles bwambae est un bon vecteur mais d'importance très localisée puisqu'uniquement observé dans la forêt de Semkili en Ouganda (Carnevale *et al.* 2009, White 1985). Les autres espèces du complexe sont considérées comme de faible importance médicale puisque *An. quadriannulatus* A et B sont principalement zoophiles (Fettene *et al.* 2004, Prior and Torr 2002), qu'un seul individu de *An. comorensis* a été observé jusqu'à présent (Brunhes *et al.* 1997) et que leur rôle en tant que vecteur n'a pas été montré.

1.2.5 Le groupe *Funestus*

Le groupe *Funestus* contient 10 espèces vectrices ou potentiellement vectrices en Afrique, réparties dans 3 sous-groupes (*Funestus*, *Rivulorum* et *Minimus*). Au sein de ce groupe, *An. funestus* Giles, 1900 est considérée en Afrique comme la principale espèce vectrice du paludisme. Elle est présente dans presque toute la zone intertropicale (Figure 8) et est extrêmement anthropophile, à la différence des autres membres du groupe qui sont le plus

souvent zoophiles et donc de moindre importance médicale (Coetzee and Fontenille 2004). Un important polymorphisme génétique a été observé au Sénégal et au Burkina Faso où deux formes chromosomiques ont été identifiées : Folonzo et Kiribina (Costantini *et al.* 1999, Dia *et al.* 2000). Folonzo semble être favorisée dans les zones présentant des réservoirs avec une végétation aquatique naturelle tandis que Kiribina était plus souvent capturée dans les zones rizicoles. D'une manière générale, le développement larvaire de *An. funestus* est inféodé aux milieux aquatiques permanents et semi-permanents (Hamon 1955).

1.2.6 Les autres vecteurs de *Plasmodium* en Afrique

Au sein du complexe Nili, au moins 3 espèces sont des vecteurs confirmés (Mouchet *et al.* 2004) : *An. nili* s.s. Theobald, 1904, *An. carnevalei* (Brunhes *et al.* 1999) et *An. ovengensis* (Awono-Ambene *et al.* 2004). Ces espèces sont rencontrées le long des cours d'eau à débit rapide.

Parmi les autres vecteurs de *Plasmodium* confirmés, peuvent être cités :

- *Anopheles moucheti* Evans, 1925 qui est un vecteur des bordures des cours d'eau lents très végétalisés de l'Afrique centrale, particulièrement au Cameroun (Mouchet and Gariou 1966, Njan Nloga *et al.* 1993).

- *Anopheles pharoensis* Theobald, 1901 qui fût un vecteur important de paludisme en Egypte (Morsy *et al.* 1995). Il a été retrouvé infecté par recherche des protéines circumsporozoïtaires au Sénégal et au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.* 2006, Carrara *et al.* 1990, Dia *et al.* 2008). La forme soudano-sahélienne dont l'aire de répartition s'étend de la côté atlantique à la vallée du Nil et au Moyen-Orient, présente un comportement de piqûre assez opportuniste en termes de préférences trophiques. La forme présente en Afrique de l'Est et du Sud est quant à elle très zoophile (Mouchet *et al.* 2004).

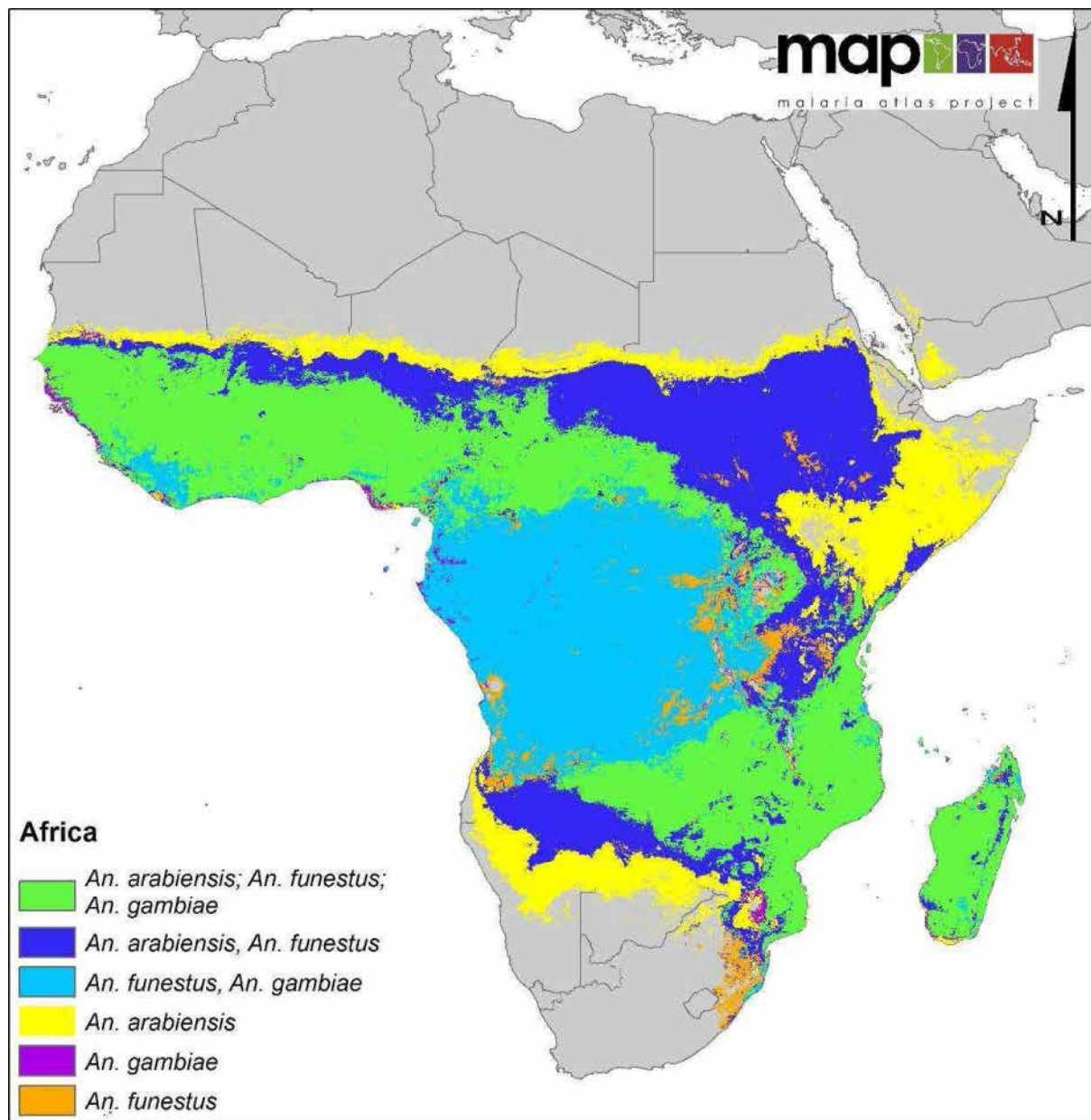


Figure 8 : Distribution spatiale des principales espèces vectrices de paludisme en Afrique.

D'après Sinka (2012)

Les échanges de *Plasmodium* entre ces vecteurs et les populations humaines qui contrôlent l'intensité de la transmission sont directement liés à l'intensité des contacts entre ceux-ci. Nous exposons dans les paragraphes suivants les méthodes utilisées pour mesurer ce contact.

1.3 Mesure de l'exposition (contact hôte-vecteur)

Il existe deux types de méthodes pour mesurer le contact hôte-vecteur, les méthodes entomologiques d'échantillonnage de la faune anophélienne et les méthodes immunologiques de mesure de l'exposition des hôtes aux piqûres d'anophèles.

1.3.1 Méthodes entomologiques

Les méthodes entomologiques d'échantillonnage des anophèles adultes qui se posent sur l'homme ou s'en approchent permettent d'évaluer la quantité de piqûres que reçoit une personne par unité de temps.

La méthode la plus directe de mesure du contact hôte-vecteur est la technique de capture sur sujet humain (CSH). Elle consiste en un individu ("captureur"), assis sur une chaise ou un tabouret, capturant, à l'aide de tubes (en verre ou en plastique), les moustiques qui viennent se poser sur une partie du corps laissée nue (souvent la partie inférieure des jambes, en dessous des genoux) (Figure 9) (Coffinet *et al.* 2009, Silver 2008). Idéalement, les moustiques sont capturés avant d'avoir eu le temps de piquer. Afin d'estimer l'agressivité des anophèles endophages⁴ et exophages, les captures doivent se dérouler simultanément à l'intérieur et à l'extérieur des maisons (Coffinet *et al.* 2009). Ces captures sont en principe réalisées en plusieurs sites dans un même village et des rotations doivent être organisées entre les captureurs afin de limiter les biais liés aux variations individuelles d'attraction pour les anophèles.

Les CSH présentent l'avantage de limiter la capture aux anophèles femelles anthropophiles et de permettre l'étude des cycles horaires d'agressivité. De plus, cette méthode est non destructrice pour les individus capturés qui peuvent être conservés pour des analyses ultérieures (identification morphologique, dissection, analyse de biochimie et de biologie moléculaire...). Parmi les limitations de cette technique, il y a le risque professionnel et sanitaire encouru par les captureurs qui s'exposent ainsi au risque de transmission de maladies vectorielles. Ces risques d'infection, notamment par le *Plasmodium*, peuvent être minimisés en employant des captureurs locaux (dont l'exposition prolongée leur confère une certaine immunité) et en leur proposant soit une chimioprophylaxie adaptée en zone de faible transmission soit un traitement thérapeutique à base d'artémisine (CTA) en cas d'accès palustre confirmé en zone de forte transmission. Les CSH ne sont cependant pas utilisables en

⁴ Endophage : qui prends son repas sanguin à l'intérieur, contraire d'exophage (à l'extérieur)

période d'épidémies d'arboviroses pour lesquelles il n'existe pas de vaccin ou de traitement efficace (Coffinet *et al.* 2009, Simard *et al.* 2005). Il est également important de noter que les CSH renseignent sur le risque d'exposition des adultes, risque qui n'est pas directement extrapolable aux principales populations à risque, les enfants de moins de 5 ans (Carnevale 1978, Leport 1980).



Figure 9 : Un collecteur lors de captures sur sujet humain (CSH) à Kindjitokpa, Bénin
(Nicolas Moiroux 2011)

Pour palier les limitations d'ordre éthique que peuvent poser les CSH, des méthodes de piégeage ont été utilisées et comparées aux CSH. On citera par exemple l'utilisation de pièges lumineux disposés à proximité d'un dormeur sous moustiquaire qui sert d'appât. Il s'est avéré que la relation entre les densités capturées sur sujets humains et par piégeage, lorsqu'elles existaient, variaient beaucoup en fonction du lieu ou de l'espèce vectrice étudiée (Silver 2008). Par ailleurs, les méthodes de piégeage sont d'une faible spécificité (capture de mâles et/ou de divers moustiques non anthropophiles) (Coffinet *et al.* 2009). Jusqu'à présent, il n'existe pas d'alternative universelle satisfaisante aux CSH parmi les techniques d'échantillonnage entomologique.

1.3.2 Méthodes immunologiques

Lors de la piqûre, l'anophèle injecte sa salive (aux propriétés anti-coagulatrices, anti-inflammatoires et vasodilatatrices notamment) avant d'aspirer le sang. Cette salive induit chez l'homme des réponses immunitaires qui se traduisent par la production d'anticorps pouvant être dosés (Remoue *et al.* 2006). Identifié comme étant commun au genre *Anopheles* (Poinsignon *et al.* 2010), le peptide gSG6-P1 (*An. gambiae* Salivary Gland Protein-6 peptide 1) induit la production d'immunoglobulines G (IgG) spécifiques à ce peptide. Le dosage de ces IgG anti-gSG6-P1 permettrait donc de mesurer l'intensité du contact hôte-vecteur. La méthode présente l'avantage d'être relativement sensible aux faciès de faible exposition (Poinsignon *et al.* 2009) et d'étudier l'exposition réelle des populations à risque (enfants) (Drame *et al.* 2010). Bien que des investigations soient en cours (Marie *et al.* 2012), il n'existe pas jusqu'à présent de marqueurs spécifiques ni de marqueur de la piqûre infectante.

1.4 Mesure de la transmission

1.4.1 Compétence vectorielle et définition d'un vecteur infectant

Toutes les espèces et/ou souches d'anophèles n'ont pas la même capacité à transmettre une espèce de *Plasmodium* à l'homme. Par exemple, une étude récente a montré que la forme moléculaire S de *Anopheles gambiae s.s.* était plus susceptible à l'infection par *P. falciparum* que la forme M ou *An. arabiensis* (Ndiath *et al.* 2011). Un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques, immunitaires...) régulent la susceptibilité du vecteur à l'infection, à la multiplication et à la transmission du parasite (Dye 1992, Tran *et al.* 2005). Cette aptitude intrinsèque du vecteur à s'infecter, à assurer le développement du plasmodium et à le transmettre est appelée compétence vectorielle (Fontenille *et al.* 2009).

Un vecteur devient infectant lorsque ses glandes salivaires sont atteintes par des sporozoïtes de *Plasmodium*. La réalisation de l'inoculation de sporozoïtes à un hôte est conditionné à la fois par la longévité du vecteur et par la durée du cycle extrinsèque du *Plasmodium* (cf. § 1.1.1). Pour qu'il y ait transmission, la longévité du vecteur après la prise d'un repas sanguin infectant doit être supérieure à la durée du cycle extrinsèque. Considérons une durée du cycle sporogonique de *P. falciparum* de 10 jours (à 27°C sur la base de la formule de Molineaux *et al.* (1988)) et une durée du cycle gonotrophique d'*An. gambiae* de 3

jours. Si le premier repas sanguin (à J3) est infectant, les trois suivants (à J6, J9 et J12) ne permettront pas l'inoculation de sporozoïtes à l'hôte puisque le cycle sporogonique ne sera pas achevé. Toutes les piqûres que fera ensuite cet anophèle seront potentiellement infectantes. Si cet anophèle meure à J22, il aura eu le temps de piquer encore 3 fois à J15, J18 et J21. On comprend ici l'importance que revêt la longévité des vecteurs dans la transmission.

1.4.2 Indicateurs entomologiques de la transmission

Le Taux d'Inoculation Entomologiques (TIE) est le nombre moyen de piqûres d'anophèles infectés reçu par un sujet humain en une nuit. Noté h par Ronald Ross (1911) qui en a décrit la formule, le TIE est le produit de l'agressivité (ma , cf. § 1.3.1) et de la proportion s d'anophèles infectés :

$$h = ma s$$

La proportion d'anophèles infectés s peut être estimée par dissection (recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires), par détection de l'antigène circumsporozoïtaire (méthode ELISA-CSP) ou par recherche d'ADN de *Plasmodium* (méthode PCR). Le TIE n'est pas toujours estimé pour une nuit, en effet, des TIE mensuels ou annuels sont souvent calculés.

La capacité vectorielle (C), qui a été décrite par Garrett-Jones (1964) correspond au nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'une population de vecteurs est susceptible de générer à partir d'un hôte infectant par unité de temps. Sa formule est la suivante :

$$C = ma^2 p^n / -\ln p$$

Où ma est l'agressivité (nombre de vecteurs par hôte par unité de temps), a est le nombre de repas sanguins pris quotidiennement sur l'homme par un anophèle, m la densité de vecteurs pour un hôte, p est la probabilité quotidienne de survie des vecteurs et n est la durée de la sporogonie. Comme on l'a vu précédemment, ma peut être estimé par capture (§ 1.3.1). La fréquence des repas sanguins sur homme a est le rapport du taux de préférence trophique sur la durée du cycle gonotrophique (d). Le taux de préférence trophique pouvant être estimé par l'analyse des repas sanguins de la population étudiée. La durée d varie en fonction de la température et de l'humidité. C'est en fonction de ces deux paramètres qu'une formule a été établie par Detinova (1962) pour estimer cette durée, sur la base d'observations de *An. maculipennis*, un vecteur des zones paléarctiques. La durée d peut également être déterminée de manière expérimentale.

Le taux de survie journalier p peut être estimé en élevant le taux de parturité (proportion de femelles pares) à la puissance $1/d$. Dans la formule de C , p est élevé à la puissance n (durée de la sporogonie) qui est fonction de la température (Figure 4). Comme l'ont fait remarqué Garret-Jones et Shidrawi (Garret-Jones and Shidrawi 1969), le fait d'élever p à la puissance n requiert une estimation précise de p (et donc du taux de parturité), sans quoi la valeur de C calculée sera d'une faible précision. Ceci constitue une des limites de l'estimation de C puisque De Meillon *et al.* (1967) ont montré l'imprécision de la mesure du taux de parturité, notamment lorsqu'il est calculé sur la base de petits effectifs (Figure 10).

CONFIDENCE INTERVALS AT 95 % PROBABILITY LEVEL FOR PROPORTION PAROUS CORRESPONDING TO VARYING NUMBER DISSECTED AND OBSERVED PROPORTION PAROUS									
No. of mosquitos dissected	Confidence intervals at 95 % probability level when proportion parous observed in sample is:								
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
200	0.06-0.15	0.15-0.26	0.24-0.37	0.33-0.47	0.43-0.57	0.53-0.67	0.63-0.76	0.74-0.85	0.85-0.94
300	0.07-0.14	0.16-0.25	0.25-0.36	0.34-0.46	0.44-0.56	0.54-0.66	0.65-0.75	0.75-0.84	0.86-0.93
400	0.07-0.13	0.16-0.24	0.26-0.35	0.35-0.45	0.45-0.55	0.55-0.65	0.65-0.74	0.76-0.84	0.87-0.93
600	0.08-0.13	0.17-0.23	0.26-0.34	0.36-0.44	0.46-0.54	0.56-0.64	0.66-0.74	0.77-0.83	0.87-0.92
800	0.08-0.12	0.17-0.23	0.27-0.33	0.37-0.44	0.47-0.54	0.57-0.63	0.67-0.73	0.77-0.83	0.88-0.92
1 000	0.08-0.12	0.18-0.23	0.27-0.33	0.37-0.43	0.47-0.53	0.57-0.63	0.67-0.73	0.77-0.82	0.88-0.92
2 000	0.09-0.11	0.18-0.22	0.28-0.32	0.38-0.42	0.48-0.52	0.58-0.62	0.68-0.72	0.78-0.82	0.89-0.91
3 000	0.09-0.11	0.19-0.22	0.28-0.32	0.38-0.42	0.48-0.52	0.58-0.62	0.68-0.72	0.79-0.81	0.89-0.91
4 000	0.09-0.11	0.19-0.21	0.29-0.31	0.39-0.42	0.48-0.52	0.59-0.62	0.69-0.71	0.79-0.81	0.89-0.91
5 000	0.09-0.11	0.19-0.21	0.29-0.31	0.39-0.41	0.49-0.51	0.59-0.61	0.69-0.71	0.79-0.81	0.89-0.91

Example :
 Suppose that out of 1000 biting mosquitos dissected 600 were found parous (observed proportion parous: 0.60). From Table 7 it can be concluded, with 95 % statistical confidence, that the true proportion parous lies between 0.57 and 0.63.
 Simple interpolation should be applied when observed data fall between the tabulated values.

Figure 10 : Intervalles de confiance de la mesure du taux de parturité en fonction de l'effectif testé (in De Meillon *et al.* (1967))

Prenons le cas où 200 femelles sont capturées, parmi lesquelles 140 sont pares. Le taux de parturité est donc de 0,7 avec un intervalle de confiance à 95% qui s'étend de 0,63 à 0,76. Le calcul de C pour ces taux de parturité (0,7 ; 0,63 et 0,76) avec $d = 1,92$ (d'après Detinova (1962) à 27°C et avec une humidité relative >90%) , $n = 10$ (pour *P. falciparum* à 27°C selon Molineaux *et al.* (1988)), $a = 0.52$ ($= 1/d$) et $ma = 10$, est présenté dans le Tableau 1. Ainsi, dans ce cas, l'intervalle de confiance de C est très large : [1,95 ; 8,73]. On comprend donc ici les limites de l'usage de la capacité vectorielle, notamment lorsque celle-ci est calculée sur la base de taux de parturité observés sur de petits effectifs. C'est pourquoi il peut être préférable, pour l'étude du risque de transmission, de privilégier l'usage d'indicateurs

moins pertinents en termes de transmission mais plus précis dans leur estimation tels que l'agressivité et dans une moindre mesure le TIE.

Tableau 1 : Variabilité de la capacité vectorielle pour un même taux de parturité

Taux de parturité		Capacité vectorielle ^{\$}
Borne inférieur de l'IC95 [§]	0.63	1.95
Valeur mesurée	0,7	4.38
Borne supérieur de l'IC95 [§]	0,76	8.73

[§]IC95 : intervalle de confiance 95% pour un taux mesuré sur 200 individus (Cf. Figure 10)

^{\$} calculée avec GC=1.92; n=10, a=0.52 et ma=10

Ces indicateurs ont été développés et parfois complexifiés (Macdonald 1957, Molineaux and Gramiccia 1980, Smith *et al.* 2007) dans le but d'établir des diagnostics épidémiologiques et de mesurer les effets de méthodes de lutte contre le paludisme. Ces méthodes de luttent reposent sur deux piliers, (i) les traitements antipaludéens qui visent à réduire la mortalité et la morbidité palustre (Cf. Mouchet *et al.* (2004) pour une description détaillée) et (ii) la lutte contre les vecteurs dont les objectifs, l'histoire et les méthodes sont décrites dans les paragraphes suivant.

1.5 La lutte contre les vecteurs du paludisme

La lutte anti-vectorielle (LAV) vise à réduire la capacité vectorielle ou la compétence vectorielle d'une population de vecteurs dans le but de diminuer ou d'interrompre la transmission d'une maladie. Les paragraphes suivant décrivent l'histoire de la LAV depuis la découverte du vecteur du paludisme jusqu'à nos jours, les différentes méthodes employées ou conseillées dans la lutte contre les vecteurs de *Plasmodium* et leurs modes d'action.

1.5.1 Historique

En 1897, Sir Ronald Ross observa un *Plasmodium* dans l'estomac d'un anophèle, suggérant que le parasite responsable du paludisme était transmis d'un individu à un autre via un moustique. Ross valida ainsi la théorie émise par Alphonse Laveran en 1880 lorsque ce dernier découvrit le *Plasmodium* dans le sang humain. Cette découverte marquera, avec celle précédente du mode de transmission similaire du virus de la fièvre jaune, le commencement du combat contre ces moustiques vecteurs de maladies : la lutte anti-vectorielle. Notons que Ross et Laveran obtiendront tous deux le prix Nobel de médecine en 1902 et 1907 respectivement.

Entre 1882 et 1903, les compagnies françaises en charge du perçage du canal de Panama virent leurs ouvriers et ingénieurs décimés par la fièvre jaune et le paludisme. Les pertes humaines dues à ces maladies et les scandales financiers les conduisirent à l'abandon du chantier et à la vente des droits d'exploitation. Les Etats-Unis d'Amérique reprennent le perçage et implémentent ce qui sera le premier plan de lutte intégrée contre le paludisme. Ce plan de lutte, qui s'inspira du plan de lutte contre la fièvre jaune mis en place à La Havane quelques années plus tôt par l'armée américaine, fut basé sur sept points dont six concernent la lutte contre les vecteurs, le septième était la distribution d'une prophylaxie à base de quinine aux ouvriers (Gorgas 1910). Les mesures de LAV étaient :

- Le drainage des sols dans un rayon de 200 yards (\approx 183 mètres) autour des habitations.
- Le débroussaillage dans un rayon de 200 yards.
- L'huilage des gîtes potentiels lorsque le drainage n'était pas réalisable.
- L'épandage de larvicides (à base d'acide carboxylique, de soude caustique et de résine) lorsque l'huilage se révélait insuffisant.
- La protection des ouvertures (grillage) des bâtiments gouvernementaux.
- Le prélèvement et l'élimination des moustiques endophiles.

A l'inauguration du canal de Panama, la fièvre jaune était éliminée et l'incidence du paludisme avait été considérablement réduite.

Avant la création de l'OMS en 1948, les organisations créées par l'industriel et philanthrope américain John D. Rockefeller (l'International Health Board puis la Rockefeller Foundation) étaient les plus actives en matière de lutte contre le paludisme à une échelle globale. Durant la période 1915-1948, ces organisations firent prendre un tournant aux stratégies de lutte contre le paludisme : alors encore essentiellement basée sur les traitements médicamenteux à base de quinine auxquels des résistances sont mises en évidence (Fletcher 1918), la lutte se focalisa sur le vecteur par l'utilisation d'un larvicide, le Vert de Paris (acéto-arsenite de cuivre), hautement toxique et dont l'efficacité se révéla mitigée (Stapleton 2004). A la fin des années 30, les premières aspersions intra-domiciliaires (AI) à base de pyrèthre (insecticide naturel dérivé de plantes du genre *Chrysanthemum*) furent testées avec succès en Afrique du Sud (De Meillon 1936) et en Inde (Stapleton 2004). La nécessité d'un renouvellement hebdomadaire des AI limitait cependant considérablement leur usage.

Pendant la seconde guerre mondiale commença l'ère du DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane) dont les propriétés insecticides furent découvertes en 1939 par Paul H. Muller (1955). Les essais de terrain réalisés en 1944 aux Etats-Unis (E-U) et en Italie furent concluants et confirmèrent la longue rémanence du DDT (Gahan and Lindquist 1945). Au

début des années 50, le DDT avait aidé à éradiquer le paludisme dans plusieurs pays européens (Italie, Grèce, Corse...) et américains (Venezuela, E-U, Guyana...). Notons que les malariologistes et les historiens s'accordent à dire que l'augmentation du niveau de vie, de la qualité des habitations et de l'exode rural a également contribué à l'éradication du paludisme en Europe et en Amérique du Nord et Centrale.

L'apparition de résistances au DDT chez des anophèles vecteurs fut observée en Grèce dès 1951 (Livadas 1951, Livadas and Georgopoulos 1953). Ceci conduisit l'OMS à adopter rapidement le Programme mondiale d'éradication du paludisme (8^{ème} assemblée mondiale pour la Santé, Mexico, 1955) dans l'espoir d'accélérer les opérations de lutte avant le développement massif des résistances. En 1957, il fut décidé que le plan d'éradication global serait basé sur les AI de DDT (WHO 1956). En raison des faibles connaissances épidémiologiques et entomologiques et du manque de ressources humaines, l'Afrique tropicale fut exclue de la stratégie d'éradication et des zones pour y étudier les possibilités d'éradication furent définies. Ailleurs, l'éradication devait se dérouler en 4 phases :

- Une phase préparatoire (12 à 18 mois) de cartographie des zones d'endémie et de vérification de l'existence des infrastructures nécessaires.
- Une phase d'attaque (3 à 4 ans) consistant en une couverture totale en AI de DDT.
- Une phase de consolidation consistant à identifier et cibler avec des traitements spécifiques des zones résiduelles d'infection.
- Une phase de maintenance visant à maintenir l'état épidémiologique et éviter les réémergences. Cette phase durerait jusqu'à l'éradication du parasite de la planète.

Malgré l'avènement et l'utilisation de nouvelles molécules insecticides (malathion, fenitrothion, propoxur, dieldrin), l'augmentation des résistances aux insecticides et aux traitements médicamenteux combinés au déficit en infrastructures de nombreux pays en voie de développement mirent fin aux espoirs d'une éradication globale dès 1968. Le Programme mondial d'éradication du paludisme fut abandonné en 1972. Il eu des résultats contrastés puisque la mortalité due au paludisme et les aires impaludées reculèrent significativement sur tous les continents sauf en Afrique. Le concept d'éradication fût remplacé par celui de contrôle (comme partie intégrante des soins de santé primaires) (Manguin *et al.* 2008), l'abandon progressif des AI de DDT, dont la toxicité (pour l'homme et l'environnement) avait été démontrée, associée à la diminution des financements entre les années 70 et 90 provoquèrent d'importantes augmentations du nombre de cas et des résurgences dans de nombreux pays (Nchinda 1998).

Parmi les grandes avancées en matière de moyens de lutte contre le paludisme, Darriet *et al.* (1984) ont été les premiers à mettre en évidence l'efficacité des moustiquaires imprégnées (MI) de perméthrine (un insecticide de la classe des pyréthrinoïdes) au Burkina Faso en 1983. L'utilisation de moustiquaires comme outils de protection individuelle contre les insectes volants et piqueurs est relatée depuis des temps anciens : dans l'Égypte antique, Cléopâtre dormait et voyageait, dit-on, sous moustiquaire (Horace, *Épodes*, 9, v. 15-16). Son usage est également connu en Chine au 3^e siècle après J-C et c'est sous l'une d'elles, qu'en Afrique, les rois Songhaï étaient intronisés (Darriet 2007). Bien que des essais d'imprégnation au DDT, peu concluants, aient été réalisés dès les années 30 (Darriet 2007), c'est la synthèse des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes (peu toxiques pour les mammifères) dans les années 70 qui permit la mise au point de MI efficaces. La fabrication en usine de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MIILD) en augmenta significativement la durée d'efficacité (3 ans minimum) et la résistance aux lavages (Darriet 2007, Duchon *et al.* 2003). En 1998, puis en 2004, Lengeler *et al.* (Lengeler 2004, Lengeler *et al.* 1998) ont établi une synthèse bibliographique sur l'efficacité des MI en Afrique et concluaient à leur intérêt majeur pour réduire la mortalité attribuable au paludisme notamment chez les enfants de moins de 5 ans. Il faut noter un retour à l'utilisation massive des AI, notamment à base d'insecticide bendiocarb (carbamate) en Afrique sous l'impulsion de l'aide américaine au développement (USAID) dans le cadre du programme "*President Malaria Initiative*" (Akogbeto *et al.* 2010, USAID 2012).

Les MI et les AI sont aujourd'hui les deux méthodes les plus largement applicables sur le terrain et sont les piliers de la LAV dans le cadre de l'Initiative "Faire reculer le paludisme" initiée en 1998 par le directeur exécutif de l'OMS et qui vise, avec un budget sans précédent, une réduction de 75 % de l'incidence mondiale d'ici 2015. Les méthodes de lutte anti-vectorielle actuelles et leurs modes d'action sont décrits dans le paragraphe suivant.

1.5.2 Méthodes de lutte anti-vectorielle actuelles

La stratégie actuelle de lutte contre le paludisme demande que les moyens de lutte anti-vectorielle appliqués soit les mieux adaptés à la situation locale, aux capacités existantes et au risque palustre (WHO 2006). La réduction des compétences et capacités vectorielles peut s'envisager en ciblant un ou plusieurs aspects de la biologie des vecteurs :

- la densité de vecteur,
- le contact hôte-vecteur,

- la longévité des vecteurs,
- la susceptibilité des vecteurs au parasite (compétence vectorielle).

Les méthodes les plus couramment utilisées sont présentées dans les paragraphes suivants, en fonction de l'élément de la biologie du vecteur qui est visée (Tableau 2).

Tableau 2 : Méthodes de lutte anti-vectorielle et paramètres de la biologie du vecteur visé

Méthode de lutte	Élément de la biologie du vecteur ciblée			
	Densité	Contact hôte-vecteur	Longévité	Compétence vectorielle
Lutte anti-larvaire	✓			
Moustiquaires imprégnées	✓	✓	✓	
Aspersions Intra-domiciliaires	✓		✓	
Bâches murales imprégnées	✓		✓	
Grillage de fenêtres		✓		
Répulsifs		✓		
Pulvérisations spatiales	✓		✓	
Lutte génétique	✓			✓

1.5.2.1 Réduction de la densité de vecteurs

La réduction de la densité des vecteurs s'obtient par la lutte contre les larves ou les adultes. La lutte anti-larvaire peut prendre plusieurs formes : (i) la lutte physique ou mécanique qui vise à détruire les gîtes larvaires réels ou potentiels des anophèles, (ii) la lutte biologique basée sur l'utilisation d'espèces prédatrices qui vise à réduire la productivité des gîtes larvaires et (iii) la lutte anti-larvaire basée sur des larvicides chimiques ou des biolarvicides.

Parmi les méthodes physiques, on peut citer l'ensemble des aménagements de l'environnement tels que le drainage ou le remplissage. Ces méthodes d'aménagement de l'environnement ont fait l'objet de guides édités par l'OMS dans le cadre du "*Panel of expert on Environmental Management for vector control*" (Birley 1991, Phillips *et al.* 1993, Tiffen 1991). Ces méthodes mécaniques ont été utilisées avec succès lors de la construction du canal de Panama au début du 20e siècle (*Cf.* § 1.5.1). Keiser *et al.* (2005) ont établi une revue des évaluations épidémiologiques de la gestion environnementale dans le monde et ont conclu à leur grande efficacité pour réduire la mortalité due au paludisme.

La seule méthode biologique de lutte anti-larvaire impliquant des prédateurs ayant réellement prouvé son efficacité est l'utilisation de poissons larvivores. Ces poissons (*Oreochromus spilurus* Günther, 1894 ; *Poecilia reticulata* Peters, 1859 ; *Gambusia affinis* Baird & Girard, 1853) qui se nourrissent des larves de culicidés, sont introduits dans les gîtes larvaires en concentrations variables. L'utilisation de ces poissons a localement permis la réduction des densités de nombreuses espèces d'anophèles (Das and Prasad 1991, Ghosh *et al.* 2005, Mohamed 2003, Prasad *et al.* 1993, Sabatinelli *et al.* 1991, Sitaraman *et al.* 1975). Cette méthode est cependant soumise à une bonne connaissance des gîtes (nombre, localisation) et à l'adaptation des poissons à ceux-ci. L'utilisation de ces poissons larvivores est très limitée dans les gîtes temporaires qui nécessitent des réensemencements réguliers (Carnevale *et al.* 2009).

Des larvicides chimiques sont depuis longtemps utilisés en LAV (*Cf.* historique § 1.5.1). Ils doivent être épanchés dans les gîtes larvaires. Les produits actuellement recommandés⁵ sont des insecticides organophosphorés (Chlorpyrifos, Fenthion, Temephos...), des régulateurs de croissance (Pyriproxifen, Diflubenzuron, Novaluron) ou d'autres insecticides tels que le Spinosad (toxines bactériennes) (WHO 2006). Étant donné la forte pression de sélection exercée par ces insecticides sur les stades larvaires des vecteurs, il n'est pas recommandé de les utiliser simultanément pour lutter contre les adultes.

Les biolarvicides sont des bactéries produisant une endotoxine mortelle par ingestion pour les larves de *culicidae*, *simuliidae* et *chironomidae*. Deux espèces de bactéries, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*, sont ainsi utilisées de la même manière que des larvicides chimiques.

Les larvicides, et particulièrement les biolarvicides, ont été largement utilisés pour lutter contre *An. stephensi* en Asie (Ohba *et al.* 1995, Pal and Tandon 2001, Saitoh *et al.* 1998) et ont permis par exemple, des réductions importantes des densités de vecteurs et/ou de l'incidence palustre au Kenya (Fillinger and Lindsay 2006, Fillinger *et al.* 2009), en zones urbaines au Bénin (Kinde-Gazard and Baglo 2012) et en Tanzanie (Fillinger *et al.* 2008, Geissbuhler *et al.* 2009). La lutte larvaire n'a cependant pas été efficace dans la vallée du fleuve Gambie soumise à de fréquentes inondations (Majambere *et al.* 2010). Notons que l'utilisation de larvicides, comme celle de poissons larvivores, nécessite une bonne connaissance et une bonne accessibilité des gîtes larvaires.

⁵ http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_aug_2012.pdf

Les autres principales méthodes de lutttes qui réduisent les densités de vecteurs ciblent les adultes. Elles sont basées sur l'utilisation d'insecticides et ont donc également des effets sur la longévité. Nous les présentons dans le paragraphe suivant.

1.5.2.2 Réduction de la densité et de la longévité

La longévité des vecteurs est un facteur déterminant de la transmission du paludisme (Cf.   1.4.1). Les trois principales méthodes qui peuvent conduire à une réduction de la longévité et de la densité dans une population de vecteur sont l'emploi généralisé de moustiquaires imprégnées d'insecticides, d'aspersions intra-domiciliaires d'insecticides ou de pulvérisation spatiale d'insecticides. Ces trois méthodes sont décrites ci-dessous.

Les MI ont plusieurs effets (Carnevale *et al.* 2009) : (i) un effet excito-répulsif à longue distance qui limite le nombre d'anophèles entrant dans la maison, (ii) un effet irritant de courte distance qui augmente le taux de sortie des moustiques, (iii) un effet "knock-down" (kd) qui assomme les moustiques venus en contact avec la MI et (iv) un possible effet létal sur les moustiques, dans les 24h suivant le contact avec la MI. Les seuls insecticides autorisés pour l'imprégnation des moustiquaires sont de la classe des pyr thrino ides (WHO 2006, Zaim *et al.* 2000). Les moustiquaires imprégnées limitent considérablement le contact hôte-vecteur et diminuent les densités de vecteurs. Leur efficacité en matière de lutte contre le paludisme a clairement été démontrée (Lengeler 2004).



Figure 11 : Installation d'une moustiquaire imprégnée. Station de Soumousso. Burkina Faso.
(Jean-Jacques Lemasson, 1992)

Les aspersion intra-domiciliaires (AI) consistent à pulvériser un insecticide sur les murs intérieurs d'une habitation (Figure 12). L'objectif étant de tuer les vecteurs qui

viendraient s'y poser donc plus particulièrement les vecteurs endophiles (Cf. § 1.2.2). Les AI sont peu efficaces contre les vecteurs exophages et/ou exophiles. Les classes d'insecticides utilisées pour les AI sont les organochlorés (DDT), les organophosphorés (malathion, fenitrothion...), les pyréthrinoïdes (alphacyperméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine) et les carbamates (bendiocarb, propoxur) (WHO 2006). Les AI ont permis l'éradication du paludisme dans plusieurs pays (Cf. 1.5.1). Cependant, en raison d'une rémanence du produit qui peut varier de 2 à 9 mois en fonction de l'insecticide, de la formulation et du substrat, les AI nécessitent d'être régulièrement renouvelées. Pour palier à ce problème, il a été proposé d'imprégner des bâches placées sur les murs des maisons permettant ainsi d'avoir un support favorisant la rémanence de l'insecticides et diminuant la logistique (ressources humaines et financières) (Djenontin *et al.* 2009, Djenontin *et al.* 2010). Développées à l'origine pour protéger des populations de déplacés dans les camps de réfugiés (Graham *et al.* 2002), ces bâches imprégnées ont été adaptées pour un usage domestique (Chandre *et al.* 2010, Diabate *et al.* 2006). Les classes d'insecticides potentiellement utilisables pour les bâches murales imprégnées (BMI) sont les mêmes que celles utilisées pour les AI.



Figure 12 : Aspersion intra-domiciliaire d'insecticide à Mayotte (Vincent Robert, 2008)

Les pulvérisations spatiales consistent à pulvériser à plus ou moins grande échelle des insecticides le plus souvent à l'extérieur des habitations (Figure 13). Elles produisent une réduction rapide des densités de vecteurs mais nécessitent, pour avoir une efficacité sur la transmission, d'être renouvelées avec une périodicité inférieure à la durée de la sporogonie du parasite. Notons que les moyens d'application de cette méthode la rendent peu spécifique (espèces non cibles touchées). Les insecticides utilisés en pulvérisation spatiales appartiennent aux classes des organophosphorés et des pyréthrinoïdes (WHO 2006).



Figure 13 : Pulvérisation spatiale en Angola, (Pierre Carnevale 2006)

1.5.2.3 Réduction du contact hôte-vecteur

Les moustiquaires (imprégnées ou non) protègent significativement de la piqûre d'anophèle (Clarke *et al.* 2001, Mwangi *et al.* 2003) à condition qu'elles soient dans un bon état général. Une autre méthode physique qui est utilisée pour réduire le contact hôte-vecteur est la mise en place de moustiquaires ou grillages sur les ouvertures (fenêtres, portes) des maisons afin de minimiser l'entrée des vecteurs. Cette mesure simple a montré son efficacité pour réduire l'agressivité et les risques de contracter le paludisme (Lindsay *et al.* 2003, Oosterholt *et al.* 2006).

Les répulsifs cutanés sont des produits synthétiques à appliquer sur la peau pour une protection individuelle contre la piqûre de moustique. L'efficacité de la protection individuelle induite par ces répulsifs n'est plus à démontrer (Rowland *et al.* 2004, Rowland *et al.* 2004) et leur utilisation a permis une réduction de l'incidence palustre dans un village en Afrique du Sud (Durrheim and Govere 2002). Une protection individuelle efficace contre la piqûre peut également être obtenue par imprégnation des vêtements avec de la perméthrine (Schreck *et al.* 1978) ou par l'utilisation de serpentins fumigènes insecticides (Lawrance and Croft 2004).

1.5.2.4 La lutte génétique

La lutte génétique vise à réduire la compétence vectorielle ou le potentiel reproductif d'une population de vecteur par altération ou remplacement du matériel héréditaire. Les méthodes génétiques de lutte contre les vecteurs sont basées sur deux stratégies (Alphey *et al.* 2002). La première consiste à concevoir des vecteurs avec un phénotype modifié et à les

introduire dans la population sauvage afin que le nouveau phénotype se propage. Le plus souvent, le phénotype introduit vise à réduire la compétence vectorielle des vecteurs.

L'autre approche consiste à réduire le nombre de vecteur en relâchant dans l'environnement des mâles stériles (Alphey *et al.* 2010, Krafsur 1998) ou porteurs d'un gène dominant létal ("*release of insects carrying a dominant lethal*", RIDL) qui conduit à une descendance non viable (Thomas *et al.* 2000).

Cependant, au-delà des risques que comporte l'introduction de moustiques génétiquement modifiés dans l'environnement (Knols *et al.* 2007), ces techniques génétiques (mâles stériles inclus) ne sont pour l'instant envisageables que dans des zones relativement isolées et avec une seule espèce de vecteur (Helinski *et al.* 2008, Munhenga *et al.* 2011, Raghavendra *et al.* 2011, Takken and Knols 2009).

En matière de lutte contre les vecteurs du paludisme, ces méthodes ne font pas actuellement l'objet de programmes opérationnels et sont encore à l'état de projet.

Chapitre 2 : Limites de la lutte contre les vecteurs de *Plasmodium*

Les méthodes de lutte anti-vectorielle les plus largement applicables (MI et AI) sont basées sur l'utilisation d'insecticides. Ces méthodes sont dépendantes de seulement quatre classes d'insecticides : les organochlorés (utilisés depuis les années 40), les organophosphorés (depuis les années 40), les carbamates (depuis les années 50) et les pyréthriinoïdes de synthèse (depuis les années 70). Toutes ces familles peuvent être utilisées en AI tandis que seuls les pyréthriinoïdes sont autorisés pour l'imprégnation des moustiquaires (WHO 2012, WHO 2006). Tous sont des neurotoxiques, ils agissent sur le système nerveux central des arthropodes. En raison de leur faible toxicité pour les mammifères et de leur biodégradabilité, les pyréthriinoïdes de synthèse sont, parmi les quatre classes d'insecticides présentées ci-dessus, les plus largement utilisés pour la LAV.

Les pyréthriinoïdes de synthèse et les organochlorés tuent les insectes en bloquant le fonctionnement des canaux sodium nécessaires à la transmission de l'influx nerveux. Les organophosphorés et les carbamates sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme chargée de dégrader l'acétylcholine, un neurotransmetteur du système nerveux central et périphérique. L'accumulation d'acétylcholine dans les synapses empêche la transmission de l'influx nerveux et provoque la mort de l'insecte. Il y a donc seulement deux modes d'action différents (canal sodium et AChE) pour quatre grandes familles d'insecticides disponibles en santé publique ce qui entraîne des répercussions évidentes en termes de sélection des résistances.

2.1 Les mécanismes de résistance aux insecticides

Pour être efficace, un insecticide doit entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans l'organisme (éventuellement produire des métabolites), être transporté jusqu'à sa cible biologique et interagir avec celle-ci. L'ensemble des mécanismes susceptibles de modifier l'une de ces étapes peut aboutir à une résistance. Ainsi, on reconnaît deux types de résistances, la résistance comportementale qui permet à l'insecte d'éviter le contact avec l'insecticide et la résistance physiologique dont les modes d'action sont les suivantes (Figure 14):

- la réduction de la pénétration de l'insecticide par une modification de la cuticule ou des parois intestinales des vecteurs.
- l'augmentation de l'excrétion et/ou de la détoxification de l'insecticide.

- la modification de la cible de l'insecticide.

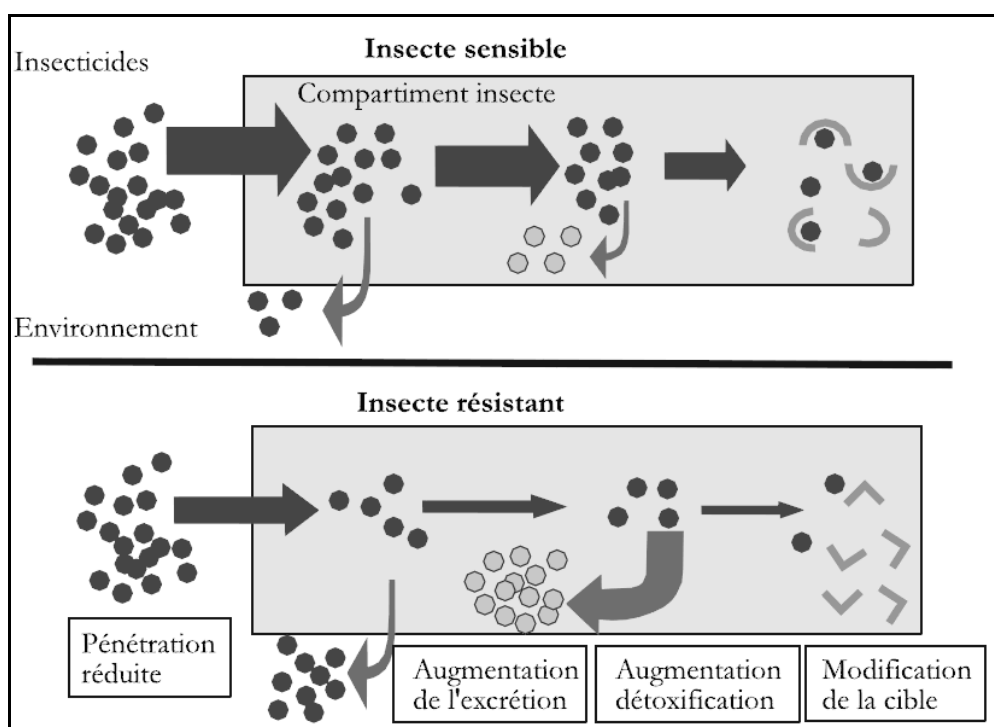


Figure 14 : Représentation de mécanismes impliqués dans la résistance physiologique aux insecticides (in Carnevale *et al.* (2009))

Chacun de ces mécanismes est contrôlé par au moins un gène dont la mutation peut induire des résistances. Chez les anophèles vecteurs de *Plasmodium*, les mécanismes de résistance les plus importants sont les résistances par modification de la cible et les résistances métaboliques.

Les modifications de la cible provoquent une réduction de la sensibilité aux insecticides en raison de mutations ponctuelles sur les gènes codant pour les protéines cibles (Davies *et al.* 2007, O'Reilly *et al.* 2006). La mutation la plus commune décrite chez les membres du complexe *Gambiae* est la mutation du canal sodium dite "kdr" ("*knock-down resistance*") qui induit une résistance aux pyréthriinoïdes et aux organochlorés. Cette mutation est due à une substitution d'un acide aminé, une leucine sur le codon 1014 par une phénylalanine (mutation L1014F ou "kdr-ouest") ou une sérine (mutation L1014S ou "kdr-est") (Martinez-Torres *et al.* 1998, Ranson *et al.* 2000). Une autre mutation dite « *ace-1* » (substitution d'une glycine en serine sur le codon 119) induit chez les anophèles une résistance aux carbamates, et dans une moindre mesure, aux organochlorés (Weill *et al.* 2004).

Les résistances métaboliques sont dues à la surexpression d'enzymes capables de détoxifier ou de séquestrer les insecticides. Ces enzymes sont essentiellement des estérases, des oxydases à cytochrome P-450 et des glutathion-S-transférases (GST) (Hemingway *et al.* 2004, Oppenoorth 1985). Chez les vecteurs de *Plasmodium*, les résistances métaboliques sont principalement dues à des surexpressions d'oxydases à cytochrome P-450. Plusieurs gènes "candidats" (cyp6p3, cyp6m2, cyp6z2, cyp6p9) ont été identifiés chez *An. gambiae* et *An. funestus* comme pouvant être à l'origine de ces résistances (Djouaka *et al.* 2008, Muller *et al.* 2007, Muller *et al.* 2008, Wondji *et al.* 2009). Ces réactions d'oxydation sont impliquées dans la résistance aux organochlorés, aux pyréthriinoïdes et aux organophosphorés (Lapied *et al.* 2009). Les estérases sont impliquées dans des résistances aux pyréthriinoïdes et aux organophosphorés (Hemingway *et al.* 2004). Les GST quant à elles sont impliquées dans des résistances aux organochlorés et aux organophosphorés (Ranson and Hemingway 2005).

Pour qu'une population de vecteur soit considérée comme résistante à un insecticide, il faut que le taux de mortalité des individus exposés à la dose diagnostique de cet insecticide soit < 80 %, selon les méthodes standardisées de l'OMS (1998). La présence de résistances est « suspectée » lorsque la mortalité est comprise entre 80 et 97 % et la population est considérée comme « sensible » si la mortalité à l'insecticide est supérieure à 97 %.

En raison de la distribution massive de MI en Afrique durant la décennie 2000 et de leur usage généralisé pour les AI, les pyréthriinoïdes sont les insecticides les plus largement utilisés pour la lutte contre les vecteurs de *Plasmodium*. Durant cette décennie, de nombreuses études ont rapporté une augmentation importante de la résistance à cette classe d'insecticides chez les vecteurs de *Plasmodium*. Il apparaissait donc nécessaire, dix années après le lancement du programme « faire reculer le paludisme » (*Roll Back Malaria*) et de la distribution massive de MI en Afrique, de mesurer l'ampleur et les implications de la résistance aux pyréthriinoïdes sur ce continent. Pour répondre à ce besoin, nous avons, sur la base d'une revue bibliographique systématique, recensé, géo-référencé et cartographié les niveaux et les mécanismes de résistance aux pyréthriinoïdes chez les vecteurs de *Plasmodium* en Afrique. Les résultats de ces travaux ont été publiés dans la revue *Trends in Parasitology* et sont brièvement présentés ci-dessous.

2.2 La résistance aux pyréthriinoïdes en Afrique : distribution et enjeux

Article 1 : Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control ?

Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V.,
Trends in Parasitology 2011, 27:91-98.

Résumé

Pour répondre au besoin de mesurer l'ampleur et les implications de la résistance aux pyréthriinoïdes en Afrique, nous avons réalisé une revue bibliographique systématique des articles publiés entre 2000 et 2009 qui rapportaient soit le statut de résistance à un pyréthriinoïde dans une population sauvage de vecteurs de *Plasmodium* soit la présence d'un mécanisme de résistance à cette famille d'insecticides (mutation de cible ou résistance métabolique). Nous avons organisé et géo-référencé ces informations afin de produire des cartes des statuts de résistance et de répartition des mécanismes chez les principales espèces de vecteurs en Afrique.

Soixante dix-huit (78) publications scientifiques reportant des statuts ou des mécanismes de résistance aux pyréthriinoïdes dans 331 sites de 32 pays africains ont été recensés.

Sur ce continent, de nombreuses populations de vecteurs résistantes (d'après mesures par les procédures standard OMS (1998)) ont été observées chez les principales espèces (*An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*) sur l'ensemble du continent excepté l'extrême Ouest, Madagascar et le Maghreb. La mutation kdr L1014F, originaire de l'Ouest, est largement distribuée entre les latitudes 20° N et 10°S tandis que la mutation L1014S est restreinte aux régions Est et centrales. Depuis l'écriture de cet article, la mutation L1014S a été observée en Afrique de l'Ouest, au Burkina Faso et au Bénin (Djegbe *et al.* 2011, Namontougou *et al.* 2011). De plus une nouvelle mutation kdr (N1575Y) a été décrite et observée chez *An. gambiae s.s.* au Burkina Faso, au Bénin et au Ghana (Jones *et al.* 2012). Les résistances

métaboliques sont largement distribuées en Afrique sub-saharienne et constituent le principal mécanisme de résistance en Afrique de l'Est et Australe.

Notons que la quantité d'information publiée sur les résistances varie considérablement d'un pays à l'autre et il n'existe aucune donnée dans une large zone d'Afrique centrale comprenant la Centrafrique, la République Démocratique du Congo et la Zambie. A l'opposé, d'autres pays sont très bien documentés (Ghana, Bénin, Burkina Faso, Cameroun, Mozambique, Kenya, Nigéria).

Peu d'études ont analysé l'impact épidémiologique des résistances, en raison notamment de l'existence de nombreux facteurs confondants. Les résultats de ces études sont contradictoires. Notons cependant qu'un échec opérationnel d'aspersions intra-domiciliaires lié à la résistance aux pyréthrinoïdes a été mis en évidence en Afrique du Sud (Brooke *et al.* 2001). Ces travaux ont mis en évidence, dans un contexte où les méthodes de LAV reposent principalement sur l'emploi de pyréthrinoïdes, la nécessité de développer des stratégies permettant de gérer la résistance à ces insecticides.

Depuis l'écriture de cet article, la résistance a été mise en cause dans un rebond du nombre de cas de paludisme à Dielmo au Sénégal (Trape *et al.* 2011) et une étude a montré une claire baisse d'efficacité des MI en zone de résistance au Bénin (Asidi *et al.* 2012). Dans ce pays, le Bénin, le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a déployé en plus des MI, des AI de carbamates. Il était donc important d'établir localement un état des lieux de la résistance aux insecticides utilisés par ces méthodes de LAV. L'étude suivante, publiée dans *Malaria Journal* visait donc à établir cet état des lieux chez le vecteur majeur *An. gambiae* au Sud du pays. Cette étude permet également de replacer le contexte local en termes de vecteurs et de résistances aux insecticides et de faciliter la compréhension des travaux qui seront présentés dans la suite de cette thèse.

2.3 Distribution de la résistance au Sud du Bénin

Article 2 : Insecticide resistance status in Anopheles gambiae in southern Benin

Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, **Moiroux N**, Banganna S, Corbel V, N'Guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto M:

Malaria Journal 2010, 9:83.

Résumé

Dans un contexte de déploiement généralisé des MI et d'AI de carbamate au Bénin où la résistance aux insecticides a clairement été impliquée dans la réduction d'efficacité de ces méthodes de lutte, cette étude entendait établir un état des lieux des statuts et des mécanismes de résistance chez *An. gambiae*, vecteur majeur de *Plasmodium*.

Dans 40 localités, des gîtes larvaires ont été échantillonnés et les larves collectées ont été mises en élevage à l'insectarium. Les adultes obtenus ont été exposés aux doses diagnostiques d'insecticides en suivant le protocole standard décrit par l'OMS (WHO 2006). Les taux de mortalité et les statuts de résistance de ces populations exposées au DDT, à la deltaméthrine, à la perméthrine et au bendiocarb ont été mesurés. L'espèce, la forme moléculaire et le génotype "*kdr*" de chaque vecteur ont été recherchés par PCR (Koekemoer *et al.* 2002, Martinez-Torres *et al.* 1998, Scott *et al.* 1993). En utilisant la même méthode (Weill *et al.* 2004), le génotype "*Ace-1*" (mutation sur le codon 119) qui procure une résistance aux carbamates a également été recherché.

Les statuts de résistance à la perméthrine et les fréquences alléliques de la mutation L1014F (*kdr*) ont été géo-référencés et reportés sur une carte de la zone.

Les moustiques testés appartenaient à deux espèces, *An. melas* (2%) et *An. gambiae s.s.* (98%) chez qui la forme moléculaire M était largement dominante (98%). Des résistances au DDT et à la perméthrine ont été observées ou suspectées dans la plupart des localités prospectées. En revanche, ces populations étaient susceptibles à la deltaméthrine et au bendiocarb. Les fréquences alléliques de la mutation "*kdr*" L1014F étaient toujours supérieures à 50 % excepté dans 3 localités (Ifangni, Agblangandan et Onigbolo) où elles

étaient proche de zéro. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de la mutation "*ace-1*" dans les populations testées.

Ces travaux ont montré la présence systématique de résistances aux insecticides chez les populations de vecteurs dans cette zone de l'Afrique. En effet, la mutation "*kdr*", qui est le principal mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes, a été retrouvée dans l'ensemble des populations étudiées et pourrait mettre en échec l'efficacité des moustiquaires imprégnées. Il faut toutefois souligner l'absence de corrélation entre la fréquence de la mutation *kdr* 1014F et la résistance à la deltaméthrine. L'absence de résistances connues aux carbamates (mutation "*Ace-1*") est en faveur de l'utilisation des carbamates pour les AI dans cette zone.

Chapitre 3 : La gestion de la résistance aux insecticides

L'évolution de la résistance aux insecticides est un processus complexe qui dépend de facteurs biologiques, génétiques et opérationnels (Georghiou 1980, Georghiou and Taylor 1977). Les facteurs biologiques concernent directement le cycle de vie de l'insecte cible et son écologie. Les facteurs génétiques englobent les propriétés des gènes de résistance (nombre de gènes impliqués, dominants ou récessifs, valeur sélective...). Enfin, les facteurs opérationnels se rapportent à tout ce qui concerne les traitements : nature des produits, rémanence, doses, fréquence et mode d'application, étendue et homogénéité des traitements.

En pratique, les stratégies développées pour contrôler la résistance sont élaborées avant tout au niveau opérationnel. Elles ont pour objectif de prévenir la résistance ou de ralentir son développement afin qu'elle ne soit à l'origine d'échecs opérationnels.

Dans le but de maintenir l'efficacité de la LAV malgré la menace de résistances, 4 stratégies de gestion de la résistance aux insecticides (GRI) ont été proposées (IRAC 2011, WHO 2012) :

- la rotation des insecticides : deux insecticides ou plus avec des modes d'action différents sont utilisés alternativement d'une année sur l'autre.
- les mosaïques : deux insecticides ou plus avec des modes d'action différents sont utilisés alternativement dans des espaces géographiques voisins.
- les mixtures : deux insecticides ou plus, avec des modes d'action différents et n'induisant pas de résistances croisées sont mélangés en une formulation à appliquer.
- la combinaison d'interventions : deux interventions ou plus utilisant des insecticides de différentes classes sont utilisées simultanément dans la même zone géographique. Les populations de vecteurs présentes dans la zone sont donc susceptibles d'être éliminées par l'une ou l'autre des interventions.

Dans plusieurs pays, au Bénin notamment, les programmes de lutte contre le paludisme ont récemment déployé des AI et des MI en combinaisons dans les mêmes zones. Quelques études (Kleinschmidt *et al.* 2009, Okumu and Moore 2011) et modèles mathématiques (Chitnis *et al.* 2010, White *et al.* 2011) ont suggéré que ces combinaisons pourraient induire un impact plus fort (effet additif) sur la réduction du paludisme. Cependant, ces études observationnelles n'ont pas permis d'exclure de nombreux facteurs confondants (absence d'intervention contrôle et de randomisation dans l'allocation des interventions) et ne

permettent donc pas de conclure sur le réel intérêt d'utiliser ces stratégies combinées en santé publique (Keating and Eisele 2011). C'est dans ce contexte que nous avons mené un essai contrôlé randomisé au Sud du Bénin dans le but de comparer l'efficacité de combinaisons de deux types d'interventions (AI + MI et BMI + MI) en termes de réduction de la morbidité palustre et de gestion de la résistance chez les vecteurs de *Plasmodium*. Les résultats de cette étude à laquelle j'ai participé sur les aspects entomologiques et sur la valorisation de résultats a été publiée dans la revue *The Lancet Infectious Diseases*.

3.1 Efficacité des combinaisons d'insecticides au Bénin : un essai contrôlé randomisé

Article 3 : Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial

Corbel V, Akogbeto M, Damien G, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, **Moiroux N**, Chabi J, Banganna B, Padonou G, Henry M-C:
The Lancet Infectious Diseases 2012, **12**:617-626.

Résumé

Un essai contrôlé randomisé a été mené dans 28 villages du sud Bénin, dans la zone sanitaire de Ouidah-Kpomassè-Tori (OKT) dans le but de comparer l'efficacité de combinaisons de deux types d'interventions (MI + AI et MI + BMI) en termes de réduction de la morbidité palustre et de gestion de la résistance chez les vecteurs de *Plasmodium*. L'essai a été enregistré sur la base Current Control Trial (ISRCTN07404145) et a reçu au préalable l'accord du comité d'éthique en recherche biomédicale du Bénin (IRB00006860) et du comité d'éthique de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement). Quatre interventions (bras) ont été évaluées :

- distributions de MI en couverture sélectives (MIS, intervention témoin). La couverture sélective vise les femmes enceintes et les enfants de moins de 6 ans. Il s'agit de la stratégie mise en place dans tout le pays par le Plan national de lutte contre le paludisme (PNLP).

- distribution de MI en couverture universelle (MIU).
- combinaison de MI en couverture universelle et de BMI de bendiocarb recouvrant le tiers supérieur des murs (Djenontin *et al.* 2010) en couverture universelle (MIU+BMI).
- combinaison de MI en couverture sélective et d'AI de bendiocarb en couverture universelle (MIS+AI).

Les interventions ont été attribuées à chaque village de manière aléatoire à la suite d'un échantillonnage stratifié (Rogier *et al.* 2009). Des enquêtes transversales ont été menées toutes les 6 semaines durant 18 mois dans le but de mesurer la prévalence de l'infection à *P. falciparum* et les densités parasitaires chez les enfants asymptomatiques de moins de 6 ans (Damien *et al.* 2011). Une détection active des cas a également été réalisée dans le but de mesurer l'incidence du paludisme chez les enfants de moins de 6 ans. Des captures sur sujet humain ont été réalisées toutes les 6 semaines dans le but d'identifier les populations de vecteurs et de mesurer l'agressivité et l'intensité de la transmission. Les vecteurs capturés ont été identifiés au niveau spécifique à l'aide de clés de détermination (Gillies and Coetzee 1987, Gillies and De Meillon 1968) et de techniques moléculaires (PCR) (Favia *et al.* 2001, Koekemoer *et al.* 2002, Scott *et al.* 1993). Les fréquences alléliques des mutations L1014F (kdr) et G119S (Ace-1) ont été mesurées à l'aide de PCR diagnostiques (Martinez-Torres *et al.* 1998, Weill *et al.* 2004). La parturité de vecteurs a été déterminée par dissection et la présence de protéines circumsporozoïtaires a été recherchée par la technique ELISA (Wirtz *et al.* 1987) pour calculer l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique (TIE). Les taux de couverture des interventions, les taux d'utilisation et l'état des moustiquaires ont été contrôlés à l'occasion d'enquêtes trimestrielles dans un échantillon des foyers représentant 40% de la population. L'efficacité résiduelle des AI (renouvelées tous les 8 mois) et des BMI (ré-imprégnées tous les 4 mois (Djenontin *et al.* 2010)) a été contrôlée à l'aide de bio-essais effectués sur les substrats traités selon les méthodes recommandées par l'OMS (WHO 2006).

Les résultats de cet essai ont montré que les combinaisons (MIU+BMI et MIS+AI) n'ont pas réduit significativement la densité d'incidence palustre chez les enfants de moins de 6 ans, ni la prévalence des infections ni la densité parasitaire moyenne chez les enfants asymptomatiques par rapport au bras de référence (MIS). Des résultats similaires ont été obtenus sur l'intensité de la transmission (TIE) et sur le nombre moyen de piqûres reçu par homme et par an (agressivité). Le nombre de moustiques capturés à l'extérieur des habitations (exophagie) était significativement plus important dans les villages ayant reçu les combinaisons comparés aux villages ayant reçu les moustiquaires. Si les taux de couverture

des interventions ont été satisfaisants (>70% pour les MI, BMI et AI), l'utilisation des moustiquaires a été en dessous ($\leq 60\%$) du seuil fixé initialement (70%). Notons que ce taux était le plus élevé (environ 60 %) dans les villages ayant reçu une couverture universelle. La fréquence de la mutation L1014F chez *An. gambiae s.s.* a augmenté significativement, 18 mois post-intervention, pour toutes les interventions (de 30 % environ à plus de 70 %) et la mutation G119S n'a été observée que chez de rares individus représentant moins de 1% des vecteurs capturés. L'efficacité résiduelle des AI était faible après 8 mois (34 %) mais excellente sur les BMI (100%) après 4 mois d'utilisation.

Cette étude décrit les résultats du premier essai clinique contrôlé et randomisé pour évaluer des combinaisons de techniques de LAV en Afrique. De manière inquiétante, ces méthodes n'ont pas obtenu une efficacité supérieure à la couverture sélective de MI et n'ont pas permis de diminuer l'accroissement de la résistance aux pyréthriinoïdes. Ces méthodes avaient pourtant montré une apparente efficacité lors d'évaluations en casés expérimentales ou dans le cadre d'études de terrain non contrôlées (Akogbeto *et al.* 2011, Djenontin *et al.* 2010, Kleinschmidt *et al.* 2009, Okumu and Moore 2011). Il est donc important de comprendre et d'étudier les facteurs responsables de l'échec observé à OKT sachant que ce type d'interventions combinées (MI+AI) font l'objet d'études pilotes au Bénin et dans de nombreux autres pays africains (USAID 2012).

3.2 Les obstacles à l'efficacité des traitements

L'absence de gain ou d'effet supplémentaire sur la transmission et la protection contre le paludisme pourrait s'expliquer par une absence « d'effet de masse » des interventions au niveau communautaire (Hawley *et al.* 2003). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats, ils sont d'ordre opérationnel (couverture et utilisation des traitements, efficacité résiduelles des insecticides...etc.) et biologique/génétique (caractéristiques des populations de vecteurs, résistance, comportement). Parmi les facteurs d'ordre opérationnel qui sont susceptibles d'avoir influencé l'efficacité des méthodes de LAV, on remarque que l'activité résiduelle des insecticides carbamate lors de leur utilisation en AI baissait considérablement avant leur renouvellement (8 mois). La structure poreuse des murs des maisons et la fréquence trop faible de renouvellement ont pu limiter considérablement l'effet de la combinaison MIS+AI. L'efficacité résiduelle du carbamate en imprégnation de BMI était, quant à elle,

excellente mais la surface de mur couverte pourrait avoir été insuffisante pour cibler massivement la population de vecteur endophile. De plus, les taux d'utilisation des MI, intervention commune à tous les bras, n'ont pas en moyenne dépassé 60 % ce qui pourrait être insuffisant pour obtenir un effet de masse.

Parmi les facteurs d'ordre biologique qui sont susceptibles d'avoir influencé l'efficacité des méthodes de LAV, il y a l'accroissement de la résistance des vecteurs aux insecticides pyréthrinoïdes qui, nous l'avons vu, a été mise en cause dans la baisse d'efficacité des MI (Asidi *et al.* 2012, N'Guessan *et al.* 2007, Trape *et al.* 2011). En effet, nous avons observé que la fréquence de la mutation kdr a augmenté dans l'ensemble des villages mettant en évidence une forte pression de sélection par les MI. Nous avons également observé des taux d'exophagie plus élevés dans les villages ayant reçu les combinaisons. Ce comportement d'évitement dans les populations de vecteurs a été décrit (Govella and Ferguson 2012, Pates and Curtis 2005, Russell *et al.* 2011), ils peuvent avoir limité l'efficacité de la LAV.

A l'issu de cet essai, il est apparu évident qu'une multitude de facteurs (opérationnels, biologiques, humains, etc.) ont pu interférer avec les interventions de lutte anti-vectorielle en modulant leur efficacité. Ces facteurs opérationnels, biologiques et/ou humains interagissent dans un système complexe sous forte influence de l'environnement. Afin de mieux comprendre l'échec des interventions de LAV dans la zone sanitaire de OKT, nous avons étudié les facteurs intrinsèques et extrinsèques ayant pu jouer un rôle dans le risque d'exposition du contact entre l'homme et le vecteur. Les travaux qui sont développés dans cette thèse et dont les objectifs sont décrits au paragraphe 3.4, visent à mieux comprendre ces facteurs et leurs interactions.

3.3 Les obstacles écologiques à la lutte anti-vectorielle

Ferguson *et al.* (2010) ont décrit les obstacles écologiques à la LAV qui peuvent tous être liés à la biodiversité des populations de vecteurs et à l'impact de l'environnement sur celles-ci. Les vecteurs de paludisme en Afrique cités au § 1.2 sont répartis dans des complexes d'espèces et parfois subdivisés à un niveau infra-spécifique. Ces espèces, formes chromosomiques ou formes moléculaires sont souvent caractérisées par des niches écologiques et comportementales différentes (Coluzzi *et al.* 1979, Gillies and Coetzee 1987, Gillies and De Meillon 1968, Hamon 1955, Hamon 1955). Ainsi, dans une zone où plusieurs

espèces sont présentes en sympatrie, chacune peut avoir une distribution spatio-temporelle spécifique et participer à la transmission du paludisme en des lieux, à des heures, des saisons et à des intensités différents. Face à la pression induite par la lutte, les différentes populations de vecteurs ne réagissent pas de manière identique et les mécanismes de résistance ne se distribuent pas aléatoirement parmi les espèces (Cf. Article 1). Il est donc important d'avoir une bonne connaissance de la diversité des vecteurs et de leur bio-écologie, en lien avec l'environnement, pour mieux comprendre la survenue du contact hôte-vecteur et les causes de l'échec des stratégies de lutte, à l'image des combinaisons d'insecticide testées au Sud Bénin dans le cadre de l'essai présenté dans l'Article 3.

Il apparaît donc important de mieux comprendre les facteurs extrinsèques (environnementaux) et intrinsèques (liés aux vecteurs eux-mêmes) susceptibles d'impacter l'utilisation et l'efficacité des stratégies de lutte contre les vecteurs.

3.4 Objectifs de la thèse

L'objectif général de nos travaux est d'avoir une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans les échecs de lutte anti-vectorielle au Bénin. Les objectifs secondaires sont les suivants :

i) Caractériser les populations de vecteurs (diversité, comportement, résistance) dans la zone d'étude avant la mise en place des interventions (chapitre 4).

ii) Etudier les déterminants environnementaux susceptibles d'influencer les taux d'utilisation des moustiquaires imprégnées et la transmission du *Plasmodium* (chapitre 4).

iii) Modéliser le risque d'exposition de l'homme aux vecteurs dans un contexte de LAV afin d'accroître les connaissances de la bio-écologie des vecteurs et d'analyser l'impact des méthodes de LAV (chapitre 5).

iv) Etudier l'impact des interventions de LAV sur le comportement des vecteurs de *Plasmodium* au sud Bénin (chapitre 6).

Chapitre 4 : Analyse de la situation précédant l'essai clinique

Dans le but d'avoir une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans les échecs de la LAV dans la zone OKT, nous avons réalisé une analyse de la situation entomologique et épidémiologique initiale afin de caractériser les populations de vecteurs et d'étudier les déterminants environnementaux de l'utilisation des MI, stratégie qui était en place dans tous les villages avant la mise en place de l'essai clinique (Article 3).

Avant l'essai contrôlé randomisé, une phase de pré-intervention a été réalisée dans le but d'établir les données de base nécessaires à l'échantillonnage stratifié pour l'allocation des interventions aux différents villages (*cf.* Article 3). Durant cette période, la méthode de lutte anti-vectorielle mise en place dans tous les villages était celle préconisée par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), à savoir une couverture sélective en MI (enfants de moins de 6 ans et femmes enceintes). Cette intervention constituait le bras de référence lors de l'essai clinique.

Un premier article (Article 4), publié dans la revue *Parasites and Vectors*, décrit la situation entomologique durant cette période (espèces vectrices, transmission, gènes de résistance aux insecticides). Il est complété par une analyse de la distribution spatiale et du comportement des vecteurs qui n'ont pas été décrites dans l'article.

Un second article (Article 5), publié dans la revue *PloS One*, vise à identifier le rôle des différents vecteurs et des niveaux de couverture et d'utilisation des MI dans la survenue d'accès palustres durant la saison sèche. Une analyse du taux d'utilisation des MI en fonction de la couverture, des températures nocturnes et de la nuisance liée aux piqûres de moustiques y est également proposée.

4.1 Vecteurs, transmission et résistance

Article 4 : *Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in Ouidah-Kpomassè-Tori district from Benin : a pre-intervention study*

Djenontin A, Bio-Bangana S, **Moiroux N**, Henry M.C, Bousari O., Chabi J, Osse R, Koudenoukpo S, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F:

Parasites & Vectors 2010, 3:83.

Résumé

Dans le but d'établir les données entomologiques de base avant la mise en place des interventions dans les 28 villages de l'essai clinique, des captures sur sujets humains ont été réalisées entre octobre 2007 et mai 2008. Cinq missions de deux nuits de capture consécutives, espacées de 6 semaines, ont été réalisées. Les captures étaient réalisées entre 22 h et 6 h à l'intérieur et à l'extérieur de 4 habitations dans chaque village (16 captures "homme-nuit" par mission et par village). Les moustiques capturés ont été identifiés morphologiquement (Edwards 1941, Gillies and Coetzee 1987, Gillies and De Meillon 1968). Les espèces et formes moléculaires appartenant au complexe *Gambiae* ou au groupe *Funestus* ont été identifiés par PCR (Koekemoer *et al.* 2002, Scott *et al.* 1993). L'infection des vecteurs a été mesurée par ELISA-CSP (Wirtz *et al.* 1987) afin de mesurer l'intensité de la transmission (TIE). Des modèles mixtes ont été utilisés pour classer les villages dans des groupes homogènes de densités de vecteurs capturés et d'intensité de transmission. Les mutations "*kdr*" et "*Ace-I*" ont été recherchées par PCR chez les membres du complexe *Gambiae* (Martinez-Torres *et al.* 1998, Weill *et al.* 2004) et au sein des deux formes moléculaires de *An. gambiae s.s.*

Au total, 44 693 moustiques appartenant à 28 espèces ont été capturés dont environ 2% étaient des vecteurs majeurs de paludisme (322 *An. gambiae s.s.* et 579 *An. funestus*). Parmi les vecteurs de l'espèce *An. gambiae*, 68 % étaient de forme moléculaire M et 32 % de forme S. La forme S était la plus infectée par *P. falciparum* (11.52 ± 0.2%) suivie de la forme

M ($5.94 \pm 0.4\%$) et de *An. funestus* ($2.64 \pm 1.3\%$). Le TIE moyen était de 2.05 ± 1.28 piqûres infectantes par homme pour 100 nuits correspondant à une situation de paludisme méso-endémique. Cent quatre-vingt quinze (195) individus appartenant à l'espèce *An. pharoensis* ont également été capturés mais, en tant que vecteur secondaire, cette espèce n'a pas fait l'objet d'investigations plus poussées. La fréquence allélique moyenne de la mutation "kdr" chez *An. gambiae* était de 29 %. Elle a augmenté chez la forme M (de environ 10 à 28 %) pendant la période d'étude alors qu'elle est resté stable chez la forme S (autour de 33 %). Seulement deux individus de la forme S de *An. gambiae* étaient porteurs hétérozygotes de la mutation "Ace-1" suggérant une pression de sélection relativement faible sur ce locus. Les modèles ont permis de classer les villages en trois groupes homogènes (cluster) de densités de *An. gambiae*, 2 groupes de densités de *An. funestus* et 2 groupes pour le TIE.

Ces travaux ont permis de fournir un état des lieux précis de la faune culicidienne au Sud du Bénin dont les derniers inventaires dataient des années 50 (Hamon 1954, Huttel 1950). Trois vecteurs majeurs de *Plasmodium* ont été identifiés (*An. funestus*, *An. gambiae* s.s. forme M et forme S), qui sont des vecteurs à larges aires de répartition en Afrique. Le rôle de *An. pharoensis* en tant que vecteur de *Plasmodium* n'a pas fait l'objet d'investigations et il conviendrait d'en approfondir les connaissances puisqu'il a été mis en cause dans la transmission de *P. falciparum* dans plusieurs pays (Antonio-Nkondjio *et al.* 2006, Carrara *et al.* 1990, Dia *et al.* 2008, Morsy *et al.* 1995).

Les niveaux de résistance chez *An. gambiae* étaient considérés comme modérés (fréquence de la mutation kdr $\approx 30\%$). Pourtant, on ne peut pas écarter tout risque d'impact sur l'efficacité de la LAV car de telles prévalences de la mutation kdr ont été mises en cause dans un rebond de morbidité palustre au Sénégal (Trape *et al.* 2011).

La densité des vecteurs et l'intensité de la transmission (TIE) présentaient une forte hétérogénéité spatiale. Afin de mieux comprendre cette hétérogénéité, la distribution spatiale des vecteurs a été cartographiée. Le comportement des vecteurs a également été analysé.

4.2 Distribution spatiale et comportement de piqûre des vecteurs

Nous avons d'abord cartographié les densités et la composition spécifique des populations de vecteurs capturés sur homme durant la phase pré-intervention. Nous avons ensuite étudié le comportement de piqûre des moustiques vecteurs en termes

d'endophagie/exophagie et d'horaires de piqûre (pic d'agressivité). Le test F de Fischer a été utilisé pour comparer les taux d'endophagie des différentes espèces et les compositions spécifiques puis les rapports de cote (OR : *Odds-Ratio*) avec leurs intervalles de confiance à 95% (IC95%) ont été calculés.

4.2.1 Résultats

La Figure 15 montre la distribution spatiale des abondances cumulées lors des 5 missions pré-intervention et la proportion relative en *An. gambiae s.s.* et *An. funestus*. Les densités étaient plus importantes dans la zones sud-est où *An. funestus* prédominait dans la majorité des villages (Amoulehoulé, Lokohoulé, Vidjinanimon, Manguevier et Tokoli). Dans le reste de la zone d'étude, les abondances de vecteur étaient plus faible et *An. gambiae s.s.* était le vecteur majoritaire. Dans cette même zone Sud-Est dominée par *An. funestus*, la forme M d'*An. gambiae s.s.* était plus représentée que la forme S (Figure 16). Dans le reste de la zone, la forme S prédominait. Nous observons également des variations importantes de composition spécifique entre villages voisins. Par exemple, la proportion de *An. funestus* à Kindjitokpa (100 %) était significativement différente (OR = 17,00, IC95% 0,956 – 302,2, p = 0,0057) de celle observée dans le village voisin de Amoulehoulé (58 %). De même, la proportion de la forme moléculaires M au sein de l'espèce *An. gambiae s.s.* à Tokoli (45 %) étaient significativement différente (OR = 0,056, IC95% 0,011 – 0,292, p = 0,0001) de celle mesurée à Wanho (94%), distant de seulement 2 km.

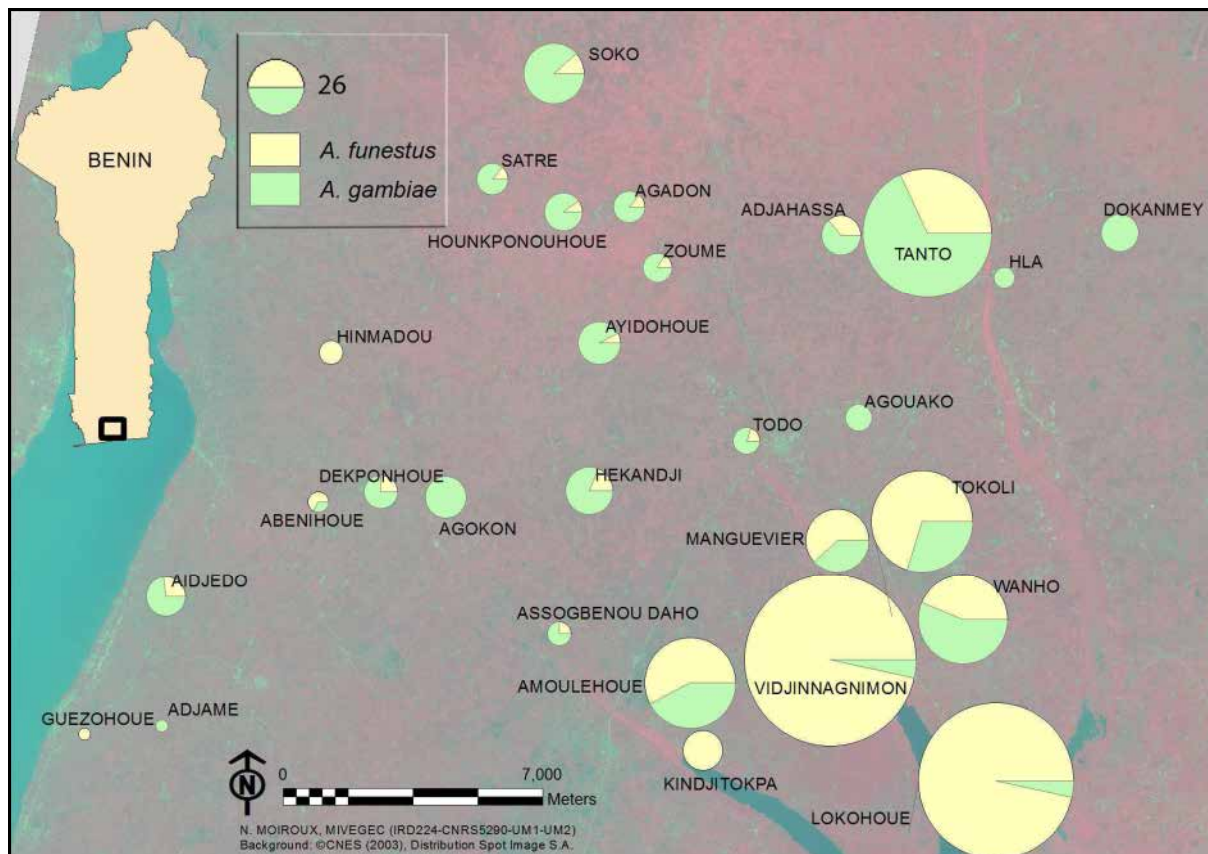


Figure 15 : Abondances cumulées et composition spécifique des populations de vecteurs pendant la phase pré-intervention (octobre 2007 - mai 2008).

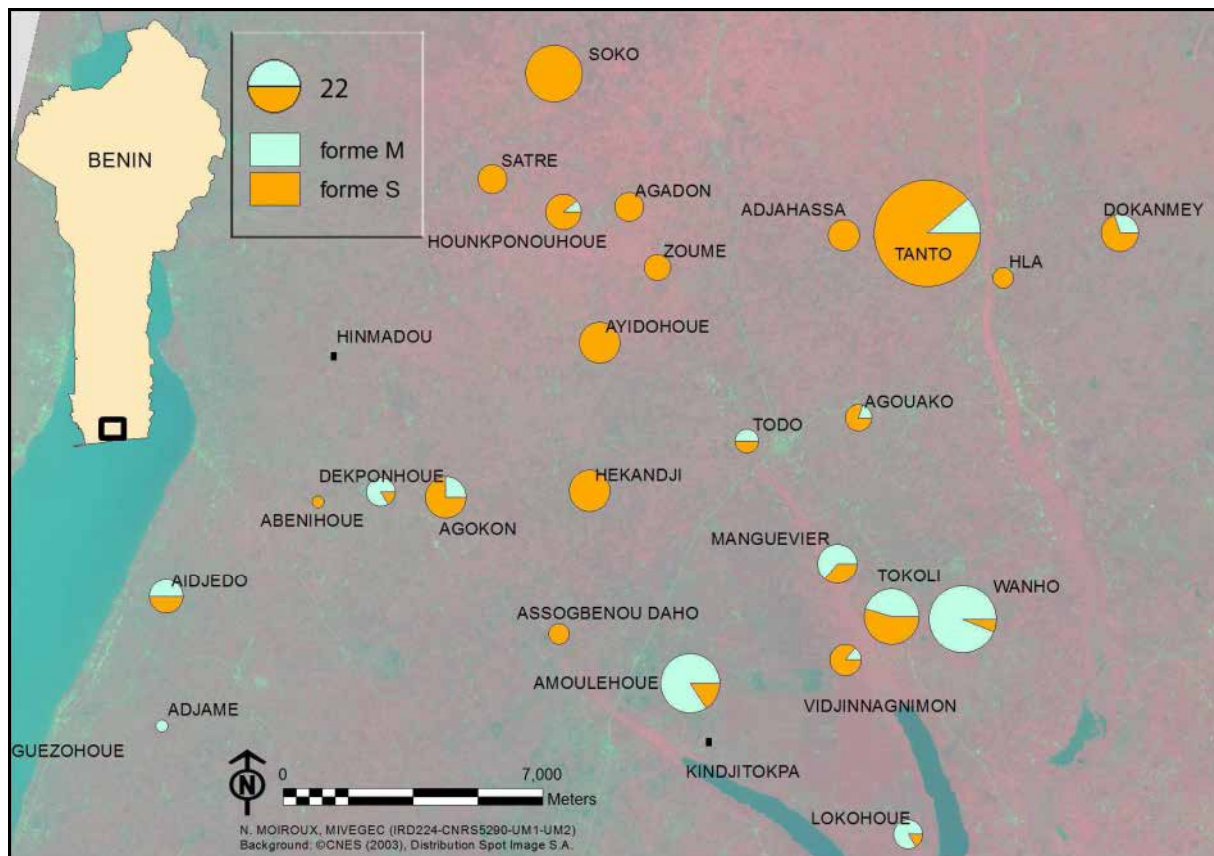


Figure 16 : Abondances de *An. gambiae s.s.* et répartition par formes moléculaires pendant la phase pré-intervention (octobre 2007 - mai 2008).

Le taux d'endophagie chez *An. funestus* (54,7 %) (Figure 17) n'était pas significativement différent de celui mesuré chez la forme M de *An. gambiae s.s.* (48,5 %; OR= 0,779, IC95% 0,512 - 1,186, $p = 0,28$). En revanche, il était significativement différent de celui mesuré chez la forme S (45,3 % ; OR = 0,685 ; IC95% 0,5 - 0,939 ; $p = 0,02$). Aucune différence n'a été notée entre les deux formes moléculaires M et S ($p = 0,6313$). Les pics d'activité chez les trois espèces et/ou formes moléculaires se situaient durant la première partie des nuits de capture, essentiellement avant 2 h du matin (Figure 18).

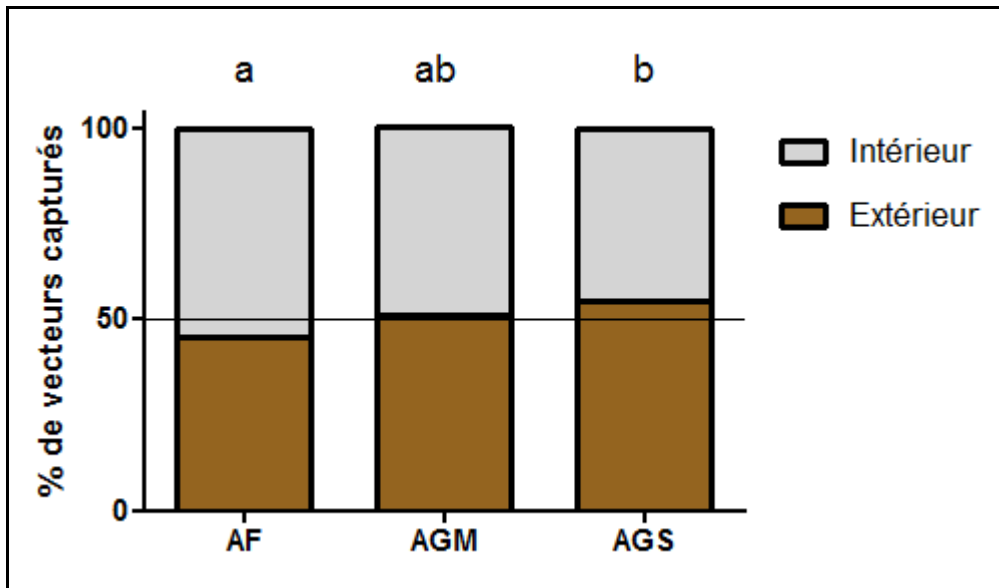


Figure 17 : Taux d'endophagie et d'exophagie des vecteurs de paludisme pendant la phase de pré-intervention.

AF : *An. funestus*, AGM : *An. gambiae* s.s. forme M, AGS : *An. gambiae* s.s. forme S. Des lettres différentes au sommet des barres indiquent que les taux d'endophagie sont significativement différents d'après le test F de Fisher.

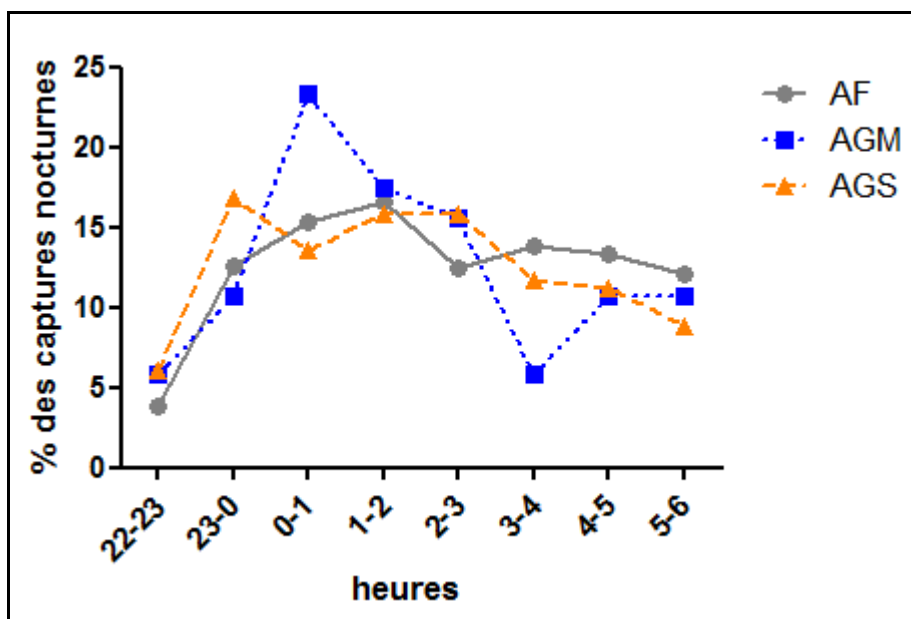


Figure 18 : Cycle horaire des piqûres des vecteurs de paludisme pendant la phase de pré-intervention.

AF : *An. funestus*, AGM : *An. gambiae* s.s. forme M, AGS : *An. gambiae* s.s. forme S.

4.2.2 Discussion

La cartographie des abondances de vecteurs met en évidence une certaine zonation de la distribution spatiale des vecteurs dans la zone OKT où les plus fortes densités de *An. funestus* et de *An. gambiae* forme M étaient rencontrées dans la zone sud-est, à proximité des bras du lac Toho (< 2 km) qui pourrait fournir des gîtes larvaires permanents favorables à ces deux espèces (Gimonneau *et al.* 2011, Hamon 1955). La forme S était rencontrée quant à elle avec une abondance plus faible mais de manière plus homogène sur le territoire, probablement en raison du caractère temporaire de ses gîtes préférentiels (Gimnig *et al.* 2001, Gimonneau *et al.* 2011). A une échelle locale, nous avons observé de fortes variations de la composition spécifique, une espèce pouvant ne plus être observée à deux kilomètres d'une localité où elle représentait pourtant 50 % des captures. Cette observation met probablement en évidence les différences de *preferenda* écologiques entre les différentes espèces d'anophèles capturées. Ces larges variations entre villages pourtant relativement proches nous permettent également de supposer que les migrations d'un village à l'autre sont faibles, possiblement en raison de distance de vol limitées (Gillies 1961, Le Goff *et al.* 1997, Takken *et al.* 1998, Thomson *et al.* 1995).

La proportion de vecteurs piquant préférentiellement à l'extérieur des habitations était relativement élevée dans la zone d'étude, particulièrement chez *An. gambiae* dont la moitié des repas sanguins étaient pris à l'extérieur. Ceci peut avoir des conséquences importantes sur l'efficacité des stratégies de LAV actuelles qui ciblent préférentiellement les vecteurs endophages et/ou endophiles.

Le pic d'agressivité des trois espèces de vecteurs était observé durant la première partie de la nuit (entre 23 h et 2 h), période pendant laquelle les habitants sont le plus souvent à l'intérieur des habitations, donc potentiellement protégés par les outils de lutte. Notons cependant que 10% de la densité agressive nocturne de chaque vecteur se situe durant la dernière heure de capture (entre 5 et 6 h), laissant supposer que l'activité des vecteurs continue après 6h. Cette observation a dicté la mise en place d'une étude spécifique de l'activité circadienne des vecteurs qui sera présentée au chapitre 6.

4.3 Saisonnalité de la transmission et utilisation des moustiquaires

Nous avons présenté au paragraphe précédent une étude établissant les données de base entomologiques dans la zone OKT avant la mise en place de l'essai clinique. Simultanément dans cette même zone d'étude, des enquêtes transversales et une détection active des cas ont été menées dans le but de mesurer l'incidence du paludisme chez les enfants de moins de 6 ans, la prévalence de l'infection à *P. falciparum* et les densités parasitaires chez les enfants asymptomatiques (Damien *et al.* 2011). Le taux de prévalence annuel était de 21.8% (IC95% 19,1 - 24,4) et l'incidence clinique était de 1,5 accès palustres par enfant et par an (IC95% 1,2-1,9) ce qui a montré le statut méso-endémique de la zone d'étude. Cependant, malgré une saisonnalité climatique affirmée, la prévalence et l'incidence clinique ne montraient pas de variations saisonnières, c'est à dire une baisse du nombre de cas de paludisme en saison sèche. Afin de comprendre les raisons sous-tendant cette observation, nous avons analysé le rôle vectoriel des anophèles pendant la saison sèche et recherché les facteurs modulant l'utilisation des outils de la LAV dans les 28 villages de l'étude.

Article 5 : Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin, West Africa

Moiroux N, Bousari O, Djèntonin A, Damien G, Cottrell G, Henry M-C, Guis H, Corbel V:

PLoS One 2012; **7**(1): e30558.

Résumé

L'incidence clinique moyenne due au paludisme a été mesurée chez les enfants âgés de 0 à 5 ans par détection active des cas (DAC) à l'occasion de trois enquêtes réalisées en saison sèche. Les DAC ont été précédées de captures sur sujets humains pour mesurer l'intensité de la nuisance due à la faune culicidienne. Les vecteurs capturés ont été identifiés à l'aide de clés de détermination (Gillies and Coetzee 1987) et d'analyses moléculaires (Koekemoer *et al.* 2002, Scott *et al.* 1993). Le niveau d'infection à *P. falciparum* a été mesuré par ELISA-CSP (Wirtz *et al.* 1987) dans le but d'estimer l'intensité de la transmission (TIE). Les taux de

couverture et d'utilisation des MI ont été contrôlés chez les enfants de l'étude à l'occasion des DAC. Un modèle mixte de poisson a été utilisé pour analyser l'incidence clinique en fonction des TIE relatifs à *An. gambiae* et *An. funestus* et du taux d'utilisation et de couverture des MI. La probabilité que le taux d'utilisation de MI soit supérieur à 60 % ⁶ a été analysée, à l'aide d'un modèle mixte binomial, en fonction des températures nocturnes (dérivées d'images satellitaires), de la nuisance liée aux piqûres de moustiques et de la couverture en MI.

La densité d'incidence clinique moyenne était de 8,8 cas pour 100 enfants-mois (IC95% 6.7–10.9). Aucun cas n'a été enregistré à Agouako, Guezohoué ou Dekponhoué tandis que 23 cas étaient observés à Tokoli illustrant une forte hétérogénéité de l'incidence palustre dans la zone OKT. Les modèles de Poisson nous montrent que l'incidence palustre était positivement corrélée avec les TIE de *An. funestus* (rapport de taux d'incidence (RTI) = 3,38 ; IC95% 1,91–6 ; $p = 3.10^{-5}$) mais pas avec ceux de *An. gambiae* s.s. ($p=0,913$). Un taux d'utilisation des moustiquaires > 60 % est associé à une réduction significative de l'incidence palustre (RTI = 0,62 ; IC95% 0,37–0,99 ; $p = 0,04$). Cette observation n'a pu être mise en évidence avec un taux de couverture > 80 %. La probabilité qu'un taux d'utilisation de moustiquaire > 60 % soit atteint était significativement prédite par des températures nocturnes basses et une nuisance liée à la faune culicidienne élevée mais pas par un taux de couverture > 80%.

A l'image des résultats obtenus dans l'analyse de la distribution spatiale des vecteurs (chapitre 4), nos travaux ont mis en évidence une très forte hétérogénéité spatiale de l'incidence palustre dans la zone OKT. Nous avons également montré une corrélation significative entre le nombre de cas de paludisme et la transmission des *Plasmodium* assurée par *An. funestus*, confirmant ainsi son rôle majeur dans la transmission du *Plasmodium* durant la saison sèche (Fontenille *et al.* 1997, Fontenille *et al.* 1997, Kelly-Hope *et al.* 2009).

Jusqu'en 2010, l'objectif de l'OMS en termes de couverture des populations à risque par des moustiquaires imprégnées était fixé à 80% (WHO 2010). Dans notre étude, ce taux de 80 % n'a pas été associé à une réduction significative de l'incidence palustre. Il semblerait aussi qu'il n'existe pas de relation directe entre le taux de couverture et le taux d'utilisation des MI car la probabilité d'atteindre 60% d'utilisation n'était pas prédite par un taux de couverture supérieur à 80%. Aux vues de ces résultats, il apparaît que la "notion" d'utilisation est un meilleur paramètre prédictif du risque palustre que ne l'est la couverture.

⁶ Seuil approuvé par la Déclaration d'Abuja (Roll Back Malaria) comme un objectif faisable pour permettre une réduction du paludisme.

Cette étude donne pour la première fois une indication précise et chiffrée de la relation entre les températures nocturnes, la nuisance culicidienne et le taux d'utilisation des moustiquaires. Elle confirme les hypothèses déduites d'enquêtes qualitatives (Binka and Adongo 1997, Frey *et al.* 2006) rapportant des variations saisonnières de l'utilisation des moustiquaires. Il est intéressant de noter que la nuisance due à l'ensemble de la faune culicidienne anthropophile n'était pas corrélée aux densités de vecteur de *Plasmodium*, suggérant qu'une baisse de l'utilisation des MI liée à une baisse de la nuisance pourrait entraîner une augmentation du risque de transmission. Dans cette situation, il apparaît nécessaire de sensibiliser les populations à l'utilisation de MI, même en saison sèche lorsque la perception du risque par la population (nuisance) diminue.

4.4 Conclusion de l'analyse pré-intervention

Dans le but d'avoir une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans les échecs des interventions de LAV dans la zone OKT, nous avons dressé une analyse de la situation entomologique et épidémiologique initiale.

Cette analyse de la situation précédant la mise en place des interventions dans la zone OKT nous a permis d'identifier plusieurs éléments susceptibles d'avoir influencé l'efficacité des interventions. Tout d'abord, les trois vecteurs majeurs présentaient une distribution spatiale et temporelle hétérogène ce qui s'est traduit par de fortes variations en termes de risque de transmission. Par exemple, nous avons montré que *An. funestus* assurait la transmission des *Plasmodium* en saison sèche au moment même où la hausse des températures nocturnes et la diminution de la nuisance culicidienne provoquait un abandon des moustiquaires par les villageois. Ce phénomène explique probablement l'absence de saisonnalité dans l'incidence du paludisme puisqu'un taux d'utilisation des moustiquaires supérieur à 60% semble nécessaire pour obtenir un effet sur la protection contre le paludisme. Il est intéressant de constater que le taux d'utilisation des moustiquaires ayant eu un impact sur l'incidence palustre (>60%) n'a pas été dépassé, en moyenne, pour aucune des interventions mises en place dans le cadre de l'essai clinique. Le taux d'utilisation des moustiquaires constitue par conséquent un facteur particulièrement important dans l'efficacité des méthodes de lutte durant l'essai clinique.

Notons que le rôle d'*An. pharoensis* en tant que vecteur de *Plasmodium* n'a pas été étudié et qu'il conviendrait d'en approfondir les connaissances. Son rôle en tant que vecteur a

en effet été montré en Egypte (Morsy *et al.* 1995) et fortement suspecté au Sénégal et au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.* 2006, Carrara *et al.* 1990, Dia *et al.* 2008).

Par ailleurs, nous avons observé que moins de 50 % des vecteurs étudiés présentaient un comportement exophage ce qui signifie qu'en théorie, et à condition que ces vecteurs exophages soient aussi exophiles, plus de la moitié de la population de vecteur n'était pas ciblée par les méthodes de LAV mise en place dans les villages. Nous suspectons également qu'une partie de la population de vecteur ait pu être active après 6h du matin, période non échantillonnée pendant laquelle les hôtes humains ne sont pas protégés.

Ces observations mettent en évidence certaines limites à l'efficacité de la LAV, liées à la diversité des vecteurs (rôle vectoriel de *An. funestus*), à leur comportement (lieux et horaires de piqûre) et au comportement humains (utilisation des MI) et qui ont pu interférer avec l'efficacité des interventions seules et/ou combinées.

Chapitre 5 : Modélisation spatio-temporelle du contact homme-vecteur

Nous avons montré dans le chapitre précédent une importante hétérogénéité spatio-temporelle de la distribution des espèces d'anophèles vectrices de *Plasmodium*. Il est probable qu'une telle hétérogénéité puisse interférer avec la mesure de l'impact entomologique des méthodes de LAV déployées dans la zone. Pour mieux comprendre comment la distribution spatio-temporelle des populations de vecteur a pu interférer avec les résultats de l'essai clinique, nous avons modélisé les densités de vecteurs afin de déduire les préférences écologiques des espèces et leurs dynamiques dans un contexte de lutte anti-vectorielle lors de la phase post-intervention.

Un modèle est une représentation simplifiée d'un système réel qui vise, dans le cas des maladies à transmission vectorielle à améliorer la compréhension des mécanismes de transmission, à les représenter ou à les prédire (Tran *et al.* 2005). On peut distinguer deux grandes catégories de modèles : (i) les modèles conceptuels qui décrivent qualitativement les interactions du système étudié et (ii) les modèles mathématiques qui quantifient les relations ou les interactions dans le système étudié. Ces deux catégories ne doivent pas être opposées puisque, idéalement, elles interviennent successivement dans le processus de modélisation. Au sein de modèles mathématiques, on peut distinguer les modèles empiriques (ou statistiques) et théoriques. Les modèles empiriques sont basés sur des données et visent à rechercher les relations statistiques existant entre les variables étudiées, ils sont utilisés pour accroître les connaissances de l'épidémiologie de la maladie. Les modèles théoriques visent eux, sur la base de connaissances préliminaires importantes et d'hypothèses fortes de relations de cause à effet, à simuler l'épidémiologie de la maladie dans un contexte donné et à étudier les variations de ses paramètres.

Les maladies vectorielles, et le paludisme en particulier, ont un lien fort avec l'environnement. Ce dernier a en effet une influence sur les populations d'hôtes, de vecteurs, de pathogènes et sur leurs interdépendances. Plus spécifiquement, les relations entre l'environnement et les vecteurs sont particulièrement complexes : les conditions environnementales vont influencer les populations de vecteurs en leur fournissant des biotopes et des habitats favorables ou non, et en interférant sur leur cycle de développement.

Dans cette partie, nous avons étudié les relations entre l'environnement et la distribution spatio-temporelle du contact homme-vecteur pendant l'essai clinique dans la zone

OKT. Dans ce but, nous avons élaboré un modèle conceptuel pour identifier les variables susceptibles de faire varier l'intensité du contact hôte-vecteur. Les données nécessaires à la production de ces variables ont été traitées puis une analyse de la distribution statistique de notre mesure du contact hôte-vecteur a été réalisée afin d'optimiser le choix du modèle d'analyse. Nous avons enfin élaboré plusieurs modèles statistiques pour expliquer la distribution et la densité des vecteurs et évaluer l'impact des méthodes de LAV sur ces dernières.

5.1 Modélisation conceptuelle du contact homme-vecteur

Sur la base d'une analyse bibliographique, nous avons identifié les principaux facteurs qui influencent les éléments de l'environnement des vecteurs (gîtes larvaires, paysage, microclimat, résistance, LAV, hôtes, prédation) et qui peuvent donc avoir un impact sur leur densité agressive (*ma*). Nous avons également recherché les facteurs qui influencent la qualité de la mesure de l'agressivité par captures sur sujet humain. L'ensemble des facteurs identifiés et soutenus par une hypothèse biologique sont présentés de façon synthétique sous la forme d'un schéma dans la Figure 19. Les facteurs du modèle, leurs relations, les hypothèses biologiques et les variables potentielles correspondantes sont décrites dans l'Annexe 1. La description des relations entre les différents facteurs du modèle est présentée dans l'Annexe 2. Pour les facteurs retenus dans l'analyse, leurs effets potentiels sur la densité agressive des anophèles et les variables choisies pour les estimer sont détaillés dans les paragraphes 5.2.3 et 5.2.4.

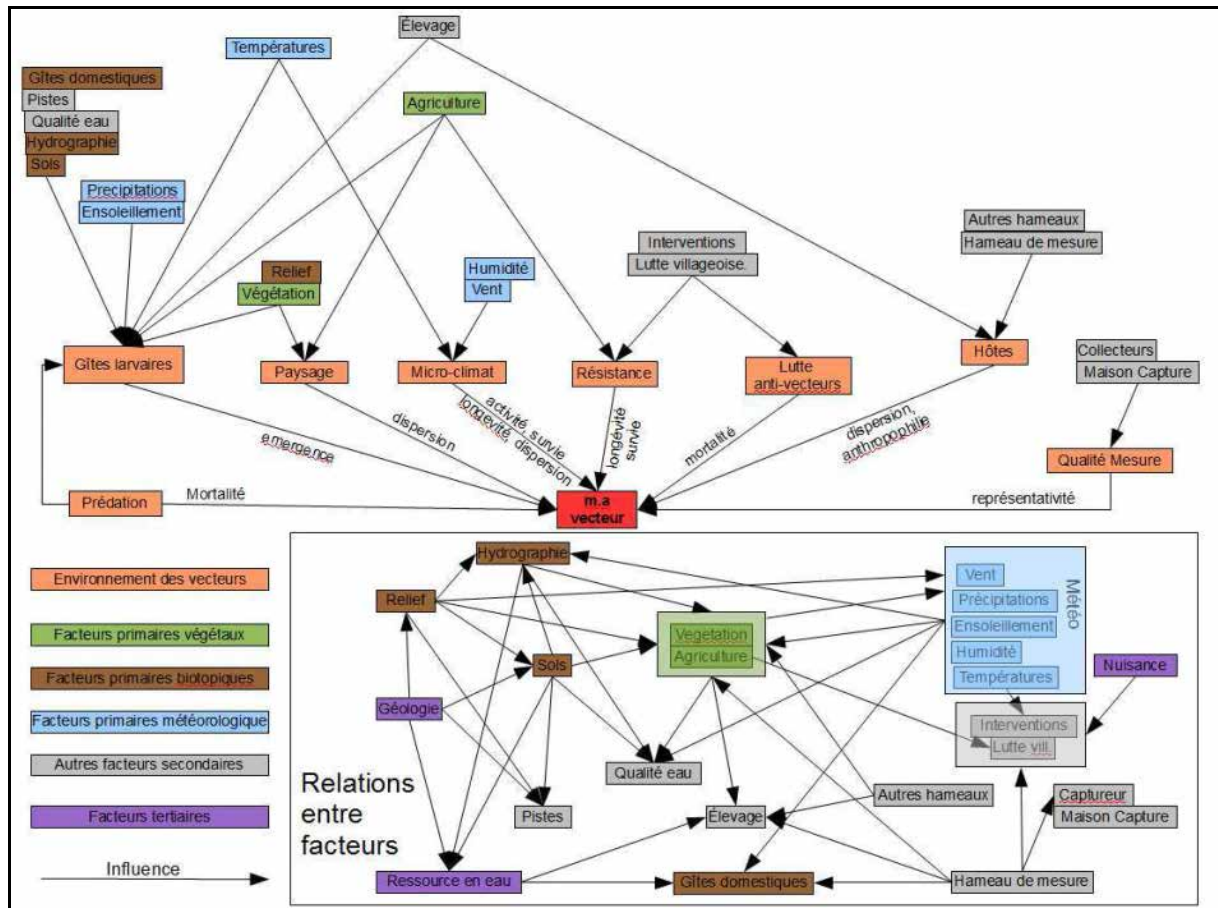


Figure 19 : Modèle conceptuel pour l'identification des variables explicatives du contact homme-vecteur.

5.2 Acquisition et traitement des données

Dans cette partie sont décrites les données utilisées et les traitements réalisés afin d'obtenir des variables utilisables pour l'étude de l'abondance des vecteurs. Parmi les facteurs pouvant avoir une influence sur la densité agressive de vecteur, certains n'ont pu être décrit par une variable en raison de l'indisponibilité de celle-ci (prédation, données descriptives des collecteurs, lutte anti-vectorielle domestique (serpentins, bombe aérosol...)), de sa qualité/résolution insuffisante (humidité, vent) ou de son manque de pertinence compte tenu des autres variables (l'ensoleillement qui est hautement corrélé avec les températures).

Les données acquises ont été stockées et, pour certaines d'entre elles, analysées à l'aide d'un Système d'Information Géographique (SIG). L'intérêt d'un tel outil et son fonctionnement est décrit au paragraphe suivant (5.2.1) dans un document qui est une annexe de l'ouvrage par Toma *et al.* (2010). Le traitement des données jusqu'à l'obtention des variables souhaitées est

décrit à la suite en faisant la distinction entre les données dérivées d'images satellites et les données issues d'autres sources (§ 5.2.2 à 5.2.4).

5.2.1 Utilisation d'un Systèmes d'Information Géographique

Un système d'information géographique (SIG) est un outil permettant l'acquisition, le stockage, la mise à jour, l'intégration, l'analyse spatiale, la visualisation et la restitution de données numériques géoréférencées, c'est-à-dire localisées dans l'espace par leurs coordonnées géographiques. Il permet de manipuler et de traiter des données spatialisées de nature et de sources différentes. Son usage était donc indispensable dans le cadre de nos travaux. Le document suivant en décrit les principes et les fonctionnalités dans le cas particulier de son usage en épidémiologie. Ce document est une annexe de l'ouvrage *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures* par Toma et al. (2010) et est présenté intégralement dans l'annexe 3 de cette thèse.

Utilisation des systèmes d'information géographique en épidémiologie.

Guis H, Gély M, **Moiroux N**, Tran A:

In Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures Edited by Toma B, Dufour B, Bénet JJ, Sanaa M, Shaw A, Moutou F: AEEMA

2010: 600

5.2.2 Aire de mesure des variables spatiales : la zone tampon

Les variables à caractère géographique ou géo-référencées ont été mesurées dans un voisinage (cercle) autour des villages dont il a fallu déterminer le rayon. Cette distance a été déterminée en fonction des capacités de dispersion des anophèles (voir § 1.2.3). Nous avons suivi les recommandations de Service (Service 1997) et avons étudié les variables avec une dimension spatiale dans un rayon de 2 km autour de chaque village. Il est possible que la dispersion des anophèles dans notre zone d'étude soit inférieure à ce qui a été observé sur d'autres terrains d'étude qui sont souvent des milieux plus ouverts et/ou moins densément peuplés (Clarke *et al.* 2002, Costantini *et al.* 1996, Gillies 1961, Le Goff *et al.* 1997, Manga *et*

al. 1993, Silver 2008, Takken *et al.* 1998). Néanmoins, la dispersion des anophèles n'ayant jamais été étudiée au sud du Bénin, nous ne disposons pas d'informations suffisantes pour retenir un rayon inférieur à 2 km.

5.2.3 Les données extraites d'images satellitaires

Les facteurs que l'on a qualifiés de "végétaux", "biotopiques" ou "météorologiques" dans le modèle conceptuel peuvent être caractérisés grâce à l'utilisation d'images satellites. Pour cela, les informations spectrales que ces images fournissent peuvent être utilisées (i) directement par utilisation des données de luminance (quantité d'énergie reçue par le capteur du satellite), (ii) par calcul de grandeurs physiques, d'indices ou d'indicateurs et (iii) par classification de l'image pour obtenir les modes d'occupation du sol (Curran *et al.* 2000). La luminance est peu utilisée en épidémiologie du fait de la difficulté qu'il y a à l'interpréter. Les données issues des deux autres méthodes sont en revanche couramment utilisées. Dans nos travaux, dans le but de caractériser l'environnement au voisinage des villages étudiés, plusieurs types de données issues de la télédétection spatiale ont été utilisés. Les traitements qu'il a été nécessaire de réaliser pour produire ou exploiter ces données sont décrits dans les paragraphes suivants.

5.2.3.1 Paysage et occupation du sol : Classification d'une image SPOT

Les différents type de végétation, qu'il soient agricoles ou naturels, peuvent favoriser ou limiter la création de gîtes larvaires pour les vecteurs de *Plasmodium*, faire varier leur productivité, et peuvent donc expliquer des différences de densités (Ageep *et al.* 2009, Anosike *et al.* 2007, Costantini *et al.* 2009, Dambach *et al.* 2009, Gillies and Coetzee 1987, Gimnig *et al.* 2001, Hay *et al.* 2000, Klinkenberg *et al.* 2008, Matthys *et al.* 2006, Munga *et al.* 2006, Mutuku *et al.* 2009, Simard *et al.* 2009, Thomson and Connor 2000). Il a également été montré que les différents types d'occupation du sol sont susceptibles de faire varier les capacités de dispersion des vecteurs (Le Goff *et al.* 1997, Silver 2008) et donc les densités capturées en un point donné. Du point de vu des pratiques agricoles, on sait également que certaines cultures utilisatrices d'insecticides peuvent favoriser l'émergence de résistances aux insecticides (Corbel *et al.* 2007, Diabate *et al.* 2002, Elissa *et al.* 1993, N'Guessan *et al.* 2003, Yadouleton *et al.* 2009) pouvant favoriser la survie des vecteurs et l'augmentation de leurs

densités. Parmi les composante du paysage, les zones humides constituent évidemment des zones importantes pour l'accueil de gîtes larvaires (Gorgas 1910, Hamon 1955, Hamon 1955).

La caractérisation de l'occupation des sols sur un territoire peut être obtenue par classification d'une image satellite (Anderson 1976). La classification d'une image satellite consiste à regrouper au sein d'une même classe les pixels de l'image qui présentent des caractéristiques semblables. Dans les techniques dites orientées-objet, l'image est préalablement segmentée en objets qui sont ensuite classifiés. Lors de la segmentation, les limites des objets sont définies en fonction de leur homogénéité. Une des méthodes pour définir des objets consiste à agréger des pixels de proche en proche jusqu'à atteindre un seuil d'hétérogénéité, interrompant le processus et délimitant l'objet. L'intérêt d'une démarche orientée-objet est de permettre la classification d'une image non plus sur les seuls valeurs spectrales du pixel, mais sur un ensemble de caractéristiques associées à l'objet telles que sa forme, une statistique sur les attributs des pixels qui le compose ou ses relations avec les objets voisins (Benz *et al.* 2004).

Parmi les méthodes de classification, les classifications supervisées sont les plus communément utilisées pour l'analyse qualitative d'images de télédétection basée sur la connaissance *a priori* des classes que l'on souhaite obtenir (Richards 2012). Elles nécessitent de définir préalablement ces différentes classes d'occupation du sol et de fournir des échantillons d'apprentissage (ou de référence). Ces échantillons permettent de caractériser chaque classe selon des critères spectraux, texturaux, contextuels (caractéristique du voisinage) ou externes (intégration de données d'altitude par exemple). Un algorithme de classification permet enfin de classer les autres objets (ou pixels) de l'image selon des méthodes non-paramétriques (distance à une classe) ou probabilistes (probabilité d'appartenance à une classe dont les individus suivent une loi de probabilité). La vérification de la qualité de la classification s'effectue en mesurant la proportion d'individus bien classés d'échantillons de classe connue appelés échantillons ou parcelles de vérification.

Ces classifications permettent de produire une carte d'occupation des sols et d'extraire des informations relatives non seulement à la composition du paysage dans l'aire étudiée (superficie des différents type d'occupation, diversité, richesse) mais aussi à sa structure (longueurs des frontières, homogénéité) qui peuvent influencer la distribution des vecteurs, leur diversité et leur abondance (Overgaard *et al.* 2003, Reiter and LaPointe 2007).

Méthode :

Les classes d'occupation du sol susceptibles d'être rencontrées dans notre zone d'étude ont été identifiées et définies sur la base de plusieurs sources :

- Bibliographie scientifique sur les formations végétales naturelles d'Afrique subsaharienne (Aubreville 1957, Boudet and Baeyens 1963, Guillaumet and Koechlin 1971).
- Cartes au 1/200 000 et au 1/25 000 de l'Institut Géographique National du Bénin.
- Observations personnelles sur le terrain.

Une campagne de terrain a été réalisée en janvier 2010 et complétée en mars 2011 afin de géoréférencer à l'aide d'un récepteur GPS (*Global Positioning System*), sur toute l'étendue de la zone d'étude, au moins 10 parcelles de chaque classe d'occupation pour servir de parcelles d'apprentissage et de vérification lors du processus de classification de l'image.

Une classification supervisée orientée-objet de deux images SPOT-5 (Satellite pour l'Observation de la Terre) acquises le 23/01/2010 a été réalisée à l'aide du logiciel eCognition (Definiens-imaging, Munich, Germany). La première est une image monospectrale acquise dans le spectre du visible et d'une résolution spatiale de 2,5 mètres. La seconde image est composée de 4 bandes spectrales acquises dans les longueurs d'onde du vert, du rouge, du proche infrarouge et du moyen infrarouge. Sa résolution est de 20 mètres pour le moyen infrarouge et de 10 mètres pour les autres bandes. Cette image ne couvre que 19 des 28 villages sélectionnés pour l'essai clinique. Aucune image couvrant l'ensemble de la zone d'étude n'a pu être obtenue malgré des demandes de programmation répétées sur la période 2009-2011.

Préalablement à la classification, les images ont du être découpées pour correspondre à l'étendue de la zone d'étude puis segmentées en objets homogènes. Les 5 bandes spectrales issues des deux images ont été utilisées pour la segmentation. Les paramètres de la segmentation ont été définis ainsi : facteur d'échelle à 25, facteur de forme à 0,1 et facteur de compacité à 0,5. Une description de ces facteurs et de leur réglage est proposée par Benz *et al.* (2004). Plusieurs combinaisons ont été testées afin de maximiser l'homogénéité et la taille des objets.

Les deux tiers des parcelles géo-référencées sur le terrain, choisis aléatoirement, ont servi de parcelles d'entraînement pour identifier les critères spectraux, texturaux et contextuels permettant la meilleure discrimination des différentes classes d'occupation du sol. La classification a été réalisée par la méthode des plus proches voisins qui consiste à rattacher chaque objet de l'image à la classe la plus proche dans l'espace multidimensionnel créé sur la

base des critères de discrimination choisis. Cette classification a été évaluée grâce à une matrice de confusion qui estime le pourcentage de parcelles de vérification (1/3 des parcelles inventoriées sur le terrain) bien classées. Si la classification n'était pas satisfaisante, les classes pouvaient être regroupées ou subdivisées et les critères de discrimination des classes modifiés. Les parcelles contigües appartenant à la même classe ont été fusionnés pour rendre mieux compte de la réalité paysagère et pour réduire le nombre d'objets et donc la vitesse de traitement des calculs ultérieurs.

Des indicateurs relatifs à chaque classe et relatifs à la mosaïque d'entités à l'intérieur de la zone tampon de 2 km ont été calculés (Tableau 3) à l'aide du logiciel Fragstat (McGarigal *et al.* 2012). Les classes ont également été regroupées par strates (arborescente, arbustive, herbacée ou absence de végétation) qui sont susceptibles d'agir différemment sur les possibilités de dispersion des vecteurs (Silver 2008) et pour lesquelles les mêmes indicateurs ont été calculés.

Tableau 3 : Description des indicateurs paysagers calculés au voisinage de chaque village

Type d'indicateur	Nom abrégé	Nom	Définition
Indicateurs décrivant les entités d'une même classe	ZLAND	Percentage of landscape Proportion du paysage	Proportion de la surface occupée par la classe considérée
	NumP	Number of patches Nombre d'entités	Nombre d'entités de la classe considérée
	ED	Edge density Densité de frontières	Longueur cumulée des périmètres des entités de la classe considérée
Indicateur décrivant la mosaïque d'entités	PRD	Patch richness density Densité de richesse d'entités	Nombre de classes différentes
	SDI	Shannon's diversity index Indice de diversité de Shannon	$SDI = -\sum_i^n (ZLAND_i - \ln ZLAND_i)$ <p>Avec i indiquant la classe d'occupation du sol. SDI est un indice de mesure de la diversité relative des classes, il est sensible aux classes rares.</p>
	SIDI	Simpson's diversity index Indice de diversité de Simpson	$SIDI = 1 - \sum_i^n (ZLAND_i)^2$ <p>SIDI est un indice de mesure de la diversité relative des classes.</p>
	MSIEI	Modified Simpson's evenness index Indice d'homogénéité de Simpson modifié.	$MSIEI = -\ln \sum (ZLAND_i)^2 / -\ln \sum (PRD_i)$ <p>MSIEI est indice de mesure de la distribution de la superficie parmi les classes.</p>

Résultats :

Sur la base de l'analyse bibliographique, de nos observations sur le terrain et des entretiens avec des personnes ressources, nous avons identifié 33 classes potentielles qui sont définies à l'Annexe 4 et qui peuvent être réparties en 6 catégories :

- plantations : zones sylvicoles et arboricoles
- cultures : zones horticoles et agricoles
- forêts : formations arbustives ou arborescentes non inféodées aux zones humides (non inondables)
- savanes : formation herbeuse comportant une strate herbacée supérieure d'au moins 80 cm de hauteur qui influence une strate inférieure
- zones humides : zone inondée de manière permanente ou temporaire
- milieux dégradés : milieux non aquatiques non végétalisés

Au terme des campagnes de terrain, 6 classes n'ont pas été trouvées soit en raison de leur probable absence dans la zone d'étude soit en raison de la saison qui impose par exemple des rotations dans les cultures. Des milieux naturels (savanes herbeuses et boisées) n'ont pas été observés, ils peuvent avoir disparu de la zone en raison de la pression anthropique et agricole dans cette région proche de la capitale économique (Cotonou). Parmi les classes géo-référencées, certaines étaient rares et n'ont été trouvées qu'en faibles effectifs (moins de 10 parcelles) : il s'agissait principalement de milieux naturels (savanes arborées et arbustives, forêts marécageuses, mangroves) et de plantations rares (de papayers et bananiers qui étaient rarement rencontrés sous forme de plantations homogènes mais plus souvent dans l'enceinte des villages, de manière éparse). Un type d'occupation du sol a été découvert à l'occasion de la campagne de terrain mais en très faible effectif (anacardières). Nous disposions donc pour procéder à la classification des échantillons géo-référencés de 208 parcelles réparties en 19 classes d'occupation du sol pour lesquelles au moins 10 parcelles ont été inventoriées sur le terrain.

La classification supervisée orientée-objet a permis la discrimination de 14 classes. Les différents types de savane ont été regroupés au sein d'une même classe. Les parcelles de maïs, de manioc (qui peuvent se succéder sur les mêmes parcelles) et d'autres cultures pluviales de plein champ ont été regroupées au sein d'une classe nommée "cultures pluviales". Les différents types de vergers (orangers, bananier, papayers), les mangroves et les zones maraichères ont été exclus de la classification en raison de leur rareté ou de la trop faible taille

des parcelles. Les plantations de manguiers et les forêts marécageuses ont été assimilées aux forêts denses (en raison de la difficulté à les discriminer). Pour les mêmes raisons, les friches ont été assimilées aux fourrés et l'ensemble des milieux dégradés (bâti, sols nus, sable, pistes et roche) ont été regroupés. Les forêts ripicoles, en voie avancée de dégradation (abattage) et présentant une structure mitée, ont été renommées forêts ripicoles dégradées. La matrice de confusion qui a servi à la vérification de la classification finale indique que 98,9 % des objets contenus dans les parcelles de vérification étaient bien classés.

5.2.3.2 Forme et attractivité des villages

La forme des villages et la densité de population qu'ils accueillent peuvent faire varier l'attractivité du village pour les vecteurs (en lien avec la quantité/concentration de CO₂ et/ou d'odeur attractives émises par l'homme) et la dispersion des vecteurs (Gillies 1961). Il était donc important d'étudier cette variable.

Pour cela, le périmètre des villages a été digitalisé par interprétation visuelle de l'image SPOT. Leur superficie a été calculée. Les populations ayant été recensées pour procéder au choix des villages à inclure dans l'essai (*Cf.* Article 3), les densités de population par village ont pu être calculées. Les indices de compacité Spin et Depth (Parent *et al.* 2009) ont été calculés à l'aide du logiciel Shape Metrics Tool ⁷. Le nombre de quartiers (surface de bâti continu) a également été calculé, deux quartiers d'un même village étant séparés par une bande végétalisée.

La distance entre les points de capture et le périmètre du village a été mesuré, avec l'aide du logiciel ArcGis 10 (ESRI, Redlands, CA) dans le but de prendre en compte un éventuel effet dû à l'accessibilité, pour les vecteurs, du point de capture depuis la lisière du village.

5.2.3.3 Températures

La température est un facteur majeur dirigeant la vitesse du développement des différents stades larvaires des anophèles (Bayoh and Lindsay 2003, Bayoh and Lindsay 2004, Lyimo *et al.* 1992). C'est aussi un facteur limitant la survie des adultes, dont les *extremum* varient d'une espèce à l'autre (Kirby and Lindsay 2004), et leur activité (Jepson *et al.* 1947,

⁷ http://clear.uconn.edu/tools/Shape_Metrics/

Martens *et al.* 1997, Silver 2008). La température est donc un élément important pour la discrimination des préférences écologiques des différents vecteurs (Costantini *et al.* 2009, Kelly-Hope *et al.* 2009, Kulkarni *et al.* 2010, Moffett *et al.* 2007, Simard *et al.* 2009).

Données sources

Nous avons utilisé les données LST (Land Surface Temperatures) issues du traitement d'images mesurées par le capteur MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) embarqué sur le satellite Terra (Wan 1999). Les données LST nocturnes et diurnes sont des images ayant une résolution spatiale de 1 km et dont la résolution temporelle minimum est de 7 jours.

Période d'intérêt des données

Les données LST utilisées dans nos travaux correspondaient aux températures minimales et maximales pendant la période de capture et celles ayant influencé le développement larvaire des vecteurs capturés. La résolution temporelle des données LST étant de 7 jours, nous avons utilisé les données de la semaine incluant la mission de capture et les données des deux semaines précédentes.

Traitement des données

L'ensemble des fichiers de données LST pour la période d'étude ont été téléchargés sur Reverb⁸, un site internet de distribution de données en science de la terre de la NASA (National Aeronautics and Space Agency). Les images LST originales ont été découpées suivant les limites de notre zone d'étude en utilisant le logiciel MODIS Reprojection Tool⁹ (Dwyer *et al.* 2001). Ces images sont accompagnées d'informations décrivant la qualité des données de chaque pixel de l'image. Lorsque la valeur d'un pixel était manquante (en raison par exemple d'une trop forte couverture nuageuse), celle-ci a été interpolée temporellement (d'après les valeurs aux dates voisines dans le même pixel) en utilisant le logiciel TiSeg (Colditz *et al.* 2008). Enfin, un programme a été écrit dans le langage Python (Sanner 1999) pour automatiser les tâches suivantes dans ArcGis 10 : l'identification, pour chaque mission de capture de chaque village, de l'image LST correspondante (semaine de capture et les deux

⁸ <http://reverb.echo.nasa.gov/reverb/>

⁹ https://lpdaac.usgs.gov/tools/modis_reprojection_tool

semaines précédentes) et mesure de la température moyenne au voisinage du village (Annexe 5).

5.2.3.4 Indice de végétation

Le NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) est un indice correspondant au ratio $(PIR - R)/(PIR+R)$ où PIR et R sont les valeurs de réflectance mesurées par télédétection respectivement dans les longueurs d'onde du rouge (R) et du proche infrarouge (PIR) (Tucker 1979). Cet indice est une mesure de l'activité physiologique de la végétation (activité chlorophyllienne). Il a été utilisé à plusieurs reprises pour expliquer la distribution des vecteurs de *Plasmodium* (Dambach *et al.* 2009, Hay *et al.* 2000, Thomson and Connor 2000).

Les données utilisées sont, comme les données LST, issues du traitement d'image produites par le capteur MODIS embarqué sur le satellite Terra. Les images de NDVI produites ont une résolution spatiale de 250 m et une résolution temporelle de 15 jours, elles sont également téléchargeables sur le site internet Reverb (*Cf. supra*). Nous leur avons, à notre niveau, fait subir les mêmes manipulations que les données LST. Etant donnée la différence de résolution temporelle, le NDVI moyen au voisinage de chaque villages et pour chaque mission de capture a été extrait des images de la quinzaine incluant les jours de capture (période de capture) et de la quinzaine précédente (influençant la période larvaire) (voir le programme en Annexe 6).

Un NDVI a également été calculé à partir de l'image SPOT-5 ayant servie à la classification. Cette image d'une haute résolution spatiale nous a permis de mesurer le NDVI moyen au voisinage des maisons de capture. Pour analyser le voisinage immédiat et spécifique à chaque maison de capture et puisque la distance minimale entre deux maisons de capture était de 50 m (*Cf.* Article 3), cette distance a été utilisée pour définir le rayon de ce voisinage.

5.2.3.5 Relief et hydrographie

Le relief, dont les principaux descripteurs sont l'altitude et la pente, a permis de prédire ou d'expliquer la distribution de vecteurs de *Plasmodium* dans plusieurs contextes géographiques (Costantini *et al.* 2009, Moffett *et al.* 2007, Patz *et al.* 1998, Simard *et al.* 2009). C'est également le relief qui définit le réseau hydrographique qui est susceptible de

produire des gîtes larvaires pour les anophèles. Plusieurs études ont montré l'importance de ce réseau pour expliquer la distribution des vecteurs (Ageep *et al.* 2009, Costantini *et al.* 2009, Hamon 1955, Hamon 1955, Mutuku *et al.* 2009, Simard *et al.* 2009).

Un modèle numérique d'élévation (MNE) est une image de télédétection spatiale qui renseigne l'altitude en tout point de l'espace (en prenant en compte la hauteur des objets qui s'y trouvent : végétation, bâtiments). Le MNE acquis pour notre zone d'étude est une image SPOT-DEM qui est dérivée de l'analyse de couples d'images stéréoscopiques produits par l'instrument HRS (High Resolution Sensor) embarqué sur le satellite SPOT-5. La résolution spatiale de ce MNE est de 30 mètres et sa précision altimétrique de 10 mètres.

Basé sur ce MNE, un fichier des pentes a été produit grâce au logiciel ArcGis (outils Slope de l'extension Spatial Analyst). A chaque pixel de ce fichier de pente est attribuée une valeur de pente en degrés qui correspond à la pente maximale depuis ce pixel vers les pixels voisins.

A partir du fichier de pente a été produit un fichier d'accumulation de flux (via les outils Flow direction et Flow accumulation de l'extension Spatial Analyst). En chaque pixel de l'image d'accumulation de flux est renseignée la surface du bassin versant théorique de ce pixel. Ce fichier donne une représentation de la capacité du réseau hydrographique théorique.

Les valeurs moyennes de ces trois variables (altitude, pente et accumulation de flux) ont été calculées au voisinage des villages.

5.2.3.6 Cumuls et fréquences des précipitations

Les précipitations, caractérisées par leurs quantités et leurs fréquences, permettent de remplir, maintenir ou lessiver les gîtes larvaires, elles sont donc essentielles (et ainsi très souvent étudiées) pour expliquer la distribution et l'abondance des vecteurs de *Plasmodium* (Christie 1959, Moffett *et al.* 2007, Molineaux and Gramiccia 1980, Paaijmans *et al.* 2007, White *et al.* 1972). Les précipitations peuvent également influencer l'activité des adultes et la qualité des captures (Silver 2008), elles doivent donc également être étudiées durant les jours de capture.

Données sources

Les cumuls et fréquences des précipitations ont été calculés pour l'ensemble des villages grâce au traitement de données "Tropical Rainfall Measuring Mission (TRMM) and other Satellites Precipitation product" (3B42 Version 6) (Huffman and Bolvin 2007). Les

produits TRMM sont réalisés par la NASA et la JAXA (Japan Aerospace eXploration Agency) dans le cadre du programme conjoint TRMM. Ils sont obtenus grâce à la combinaison d'images issues de plusieurs capteurs à bord de plusieurs satellites. Les données TRMM sont fournies sous forme de cumuls journaliers de précipitation (en mm) en plusieurs points distants de 0,25 degrés (soit environ 27 km dans le sud du Bénin) les uns des autres. Nous avons téléchargé¹⁰ les données pour l'ensemble de la période d'étude sur une superficie s'étendant entre les latitudes 6°N et 7°N et entre les longitudes 1,5°E et 2,75°E ce qui représente 30 points de données recouvrant la zone d'étude. Ces données ont été stockées dans un fichier utilisable dans un SIG et dans lequel étaient stockées les coordonnées géographiques des points ainsi que les données journalières de précipitation de la période 2008-2009.

Période d'intérêt des données

Nous avons choisi d'étudier les précipitations qui se sont déroulées durant les 15 jours précédant les missions de captures. On peut considérer que cette période influence grandement le développement des moustiques au stade larvaire et donc la densité des adultes produits. En effet, sur la base d'un taux de survie journalier $p = 0,9$ correspondant à ce qui a été observé durant l'essai (Article 3), nous pouvons considérer qu'au moins 81%¹¹ des moustiques capturés lors d'une mission de capture ont émergé durant les 15 jours précédents. Les précipitations au moment des captures pouvant avoir un impact sur le nombre de moustiques adultes capturés (Silver 2008) ont également été analysées.

¹⁰ http://disc2.nascom.nasa.gov/Giovanni/tovas/TRMM_V6.3B42_daily.2.shtml

¹¹ Rapport entre la somme des survivants ayant émergé durant les 15 jours précédents la capture et la somme des survivants ayant émergé durant les 35 jours précédents la capture, ce calcul est le rapport de sommes de suites géométriques qui s'obtient, après simplification, par la formule $(1-p^{15})/(1-p^{35})$. Avec l'hypothèse que le nombre de vecteurs émergeant chaque jour est constant et que la fraction survivant plus de 35 jours est nulle.

Traitement des données

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel ArcGis 10. Pour automatiser le traitement des produits TRMM et obtenir des données de cumuls de précipitation et du nombre de jours de pluie durant les 15 jours qui précèdent les captures, un programme a été écrit dans le langage Python. Ce programme est présenté en Annexe 7. Les étapes de fonctionnement du programme sont les suivantes et se reproduisent pour chaque mission de capture de chaque village :

- En chaque point du fichier TRMM sont additionnées les valeurs de précipitation durant les 15 jours précédant la date de capture.
- Les cumuls obtenus font l'objet d'une interpolation spatiale par la méthode de l'inverse de distance, nous permettant d'obtenir une image interpolée des cumuls de 15 jours de précipitations couvrant l'ensemble de la zone d'étude avec une résolution de 250 m.
- La valeur interpolée de ce cumul aux coordonnées (centre) du village considéré peut alors être extraite de l'image et stockée dans une table de résultats.

Pour déterminer le nombre de jours de pluie, le programme doit être modifié à sa première étape pour calculer le nombre de jours avec des précipitations positives (au lieu de faire la somme des valeurs journalières), la suite du programme restant inchangée. Les fréquences de précipitation des deux jours de captures dans chaque village ont également été extraites en suivant le même protocole.

5.2.4 Autres données

5.2.4.1 Elevages

Bien que *An. gambiae s.s.* et *An. funestus* soient considérés comme des vecteurs très anthropophiles (Hamon 1955, Pates *et al.* 2001), ils peuvent également prendre une proportion non négligeable de repas sanguins sur d'autres hôtes, parfois en réponse à la LAV (Antonio-Nkondjio *et al.* 2008, Dia *et al.* 2008, Fontenille *et al.* 1997, Killeen and Smith 2007, Sousa *et al.* 2001). Dans notre zone d'étude, les troupeaux de bovins pourraient représenter une source d'hôtes alternatifs importante en cas de diversion des moustiques par la LAV. De plus, ces animaux peuvent favoriser la production de gîtes larvaires en raison des empreintes qu'ils laissent dans le sol (Bogh *et al.* 2003, Goma 1960, Minakawa *et al.* 1999, Mutuku *et al.* 2006).

Le nombre d'élevages bovins (troupeaux associés à un enclos) et le nombre de têtes de bétail dans le voisinage des villages ont été inventoriés et géo-référencés à l'aide d'un GPS lors d'enquêtes de terrain réalisées en mars 2011.

5.2.4.2 Gîtes larvaires péri-domestiques

Les anophèles peuvent pondre dans des gîtes anthropiques au voisinage des maisons (Hamon 1955, Hamon 1955, Holstein 1954). Le potentiel productif de ces gîtes ne pouvant être évalué par une méthode indirecte, ils ont dû être inventoriés par des enquêtes de terrain.

Cet inventaire a été réalisé dans le périmètre du village à l'aide d'une méthode standard de prélèvement (Silver 2008). Le genre des larves de culicidés a été déterminé morphologiquement et les gîtes positifs pour les *Anopheles sp.* ont été enregistrés. Cet inventaire a été réalisé à l'occasion de chaque mission de CSH durant l'année 2009 (Bio-Bangana *et al.* 2009). Le nombre de gîtes positifs à *Anopheles sp.* a été enregistré pour chaque village et pour chaque mission, un indice de densité de ces gîtes s'inspirant de l'indice de Breteau (WHO 1950) a été calculé (nombre de gîte positifs pour 100 maisons). A l'occasion d'une mission (août 2009), le nombre des gîtes potentiels (présence et absence de larves d'*Anopheles sp.*) a été enregistré.

5.2.4.3 Maraîchage

N'ayant pu discriminer les parcelles de maraîchage à l'aide de l'image SPOT (*Cf.* § 5.2.3.1), nous avons réalisé sur le terrain, en mars 2011, un inventaire systématique des zones de maraîchage située dans un rayon de 2 km autour des villages de l'étude. Ces milieux agricoles peuvent en effet favoriser la présence de gîtes larvaires et accroître les densités de vecteurs (Klinkenberg *et al.* 2008, Matthys *et al.* 2006). Le périmètre des parcelles a été relevé par GPS ce qui nous a permis d'extraire ultérieurement les superficies incluses dans le voisinage des villages à l'aide du logiciel ArcGis.

5.2.4.4 Pédologie

Les sols hydromorphes sont régulièrement saturés en eau ce qui peut provoquer l'établissement de zones humides et donc, potentiellement, de gîtes favorables aux

moustiques. Une carte pédologique du sud Bénin à l'échelle 1/200000 (Volkoff and Willaime 1976) a été digitalisée dans ArcGis et les superficies de sols hydromorphes ont été mesurées dans le voisinage de chaque village.

5.2.4.5 Pistes

Plusieurs auteurs ont montré que les flaques qui se forment sur et au bord des routes en terre (pistes) en Afrique peuvent constituer d'excellents gîtes larvaires pour les vecteurs de *Plasmodium* (Edillo *et al.* 2002, Hamon 1955, Minakawa *et al.* 1999). Les pistes ont été digitalisées d'après les cartes topographiques au 1/50000 de L'institut Géographique National du Bénin couvrant la zone d'étude. Ces données ont été complétées par une digitalisation basée sur l'interprétation visuelle de l'image SPOT.

5.2.4.6 Magnitude visuelle de la Lune

L'effet des différentes phases lunaires, en lien notamment avec l'intensité lumineuse émise a fait l'objet de nombreuses études, parfois contradictoires. Certaines ont montré qu'en période de pleine lune, les densités de vecteurs capturés étaient plus faibles (Bidingmayer 1964, Charlwood *et al.* 1986) tandis que d'autres ont échoué à montrer cet effet (Mishra *et al.* 1996) ou ont démontré un effet inverse (Costantini *et al.* 1998, Rubio-Palis 1992). Il semble par ailleurs que certains vecteurs de *Plasmodium* aient des horaires d'activité qui puissent varier en fonction de la luminosité due à la lune (Kampango *et al.* 2011).

La magnitude visuelle apparente de la Lune aux coordonnées géographiques de Cotonou et aux dates de début de chaque mission de capture dans chaque village a été obtenue sur le site internet de L'Institut de Mécanique Célestes et de Calcul des Ephémérides (IMCCE)¹². La magnitude visuelle apparente de la Lune est une mesure de son irradiance (dans le spectre du visible) depuis un point de la Terre dont le calcul a été décrit par (Helfenstein and Veverka 1987).

¹² http://www.imcce.fr/fr/ephemerides/formulaire/form_ephepos.php

5.3 Modélisation statistique d'un événement rare : les comptes de vecteurs

Afin de choisir une méthode de modélisation adaptée aux données, il convient de décrire la distribution statistique de la variable à expliquer, ici le nombre de vecteurs capturés en chaque point de collecte durant chaque mission.

La capture sur sujet humain est une technique de comptage (d'un nombre de moustiques venant en contact de l'appât). La distribution statistique traditionnellement utilisée pour décrire des données de comptages est la distribution de Poisson qui est valable sous l'hypothèse d'une équi-dispersion des données (moyenne égale à la variance). Cependant, les données issues de comptages d'anophèles sont souvent surdispersées (variance supérieure à la moyenne). L'une des raisons de cette surdispersion est le caractère "*zero-inflated*" des comptages, c'est-à-dire qu'il y a plus de "zéros" (cas où aucun vecteur n'est capturé) qu'attendus sous l'hypothèse d'une distribution de Poisson. Par ailleurs, le plan d'échantillonnage des captures révèle une structure hiérarchique des données (différents niveaux de collecte): à l'échelle du village, de la maison de capture et de la position du captureur (intérieur ou extérieur). Cette structure nécessite l'introduction d'effets aléatoires dans le modèle afin de tenir compte des différentes sources de variabilité des observations.

Dans l'Article 6 qui suit, nous avons vérifié si les données de capture de l'essai étaient surdispersées et *zero-inflated* et nous avons cherché à savoir quelle distribution statistique les décrivait le mieux. De plus, un modèle mixte à classes latentes (MacLachlan and Peel 2000) a été proposé pour analyser ces données en fonction de variables environnementales et descriptives des villages. Les modèles mixtes à classes latentes combinent les modèles mixtes pour tenir compte des corrélations entre des mesures répétées et les modèles à classes latentes pour discriminer des groupes homogènes de villages.

Cette analyse ayant été réalisée avant que l'ensemble des variables identifiées lors de la modélisation conceptuelle ne soient traitées, seule une partie des variables explicatives potentielles y sont utilisées. Les données pluviométriques sont issues de 8 stations météorologiques encerclant la zone d'étude et ont été traitées suivant le même protocole que les données TRMM.

Article 6 : Use of a mixture statistical model in studying malaria vectors density

Bousari O., Moiroux N., Iwaz J., Djenontin A, Bangana ASB, Corbel V, Fonton N,

Ecochard R,

Plos One (Accepted) 2012.

Résumé

En raison de la surdispersion des données de capture de vecteurs qui peut résulter d'un excès de zéros, très souvent, les données de comptage ne respectent pas les hypothèses de la distribution de Poisson (P). Le modèle « Zero Inflated Poisson » (ZIP) est l'une des méthodes développées (Lambert 1992) pour gérer cette surdispersion due à la surreprésentation de zéro. Le ZIP est le mélange d'une distribution de Poisson et d'une « masse de Dirac¹³ » en zéro. Une catégorie de modèles dédiée à la prise en compte de la surdispersion dans les comptes est celle des distributions dites à deux niveaux (Hinde and Demétrio 1998) : le paramètre de la distribution des observations (premier niveau) est supposé avoir lui-même une certaine distribution (deuxième niveau). C'est le cas de la distribution binomiale négative (NB) qui suppose que les observations sont issues d'un mélange continu de Poisson dont les moyennes sont des réalisations d'une loi Gamma. A partir du modèle NB a été construit le modèle «Zero Inflated Negative Binomial » (ZINB) sur le même principe que celui du ZIP. Une variante de ces distributions à deux niveaux est obtenue en se prévalant de l'hypothèse de la distribution du deuxième niveau, il s'agit des modèles de mélange dont les paramètres peuvent être estimés par une approche non paramétrique du maximum de vraisemblance (Aitkin 1996). Les modèles de mélange non paramétriques considérant plus de deux distributions de Poisson peuvent ainsi être adaptés à la gestion de la surdispersion dans le cas des données de capture de vecteurs.

Nous proposons donc dans ces travaux l'utilisation d'un modèle de mélange non paramétrique de distributions de Poisson (ou modèle à classes latentes) (NPMP) pour décrire la distribution de nos données et les analyser en fonction de covariables environnementales ou

¹³ Masse de Dirac : se dit d'une distribution dans laquelle tous les individus statistiques ont la même valeur (en général 0), une distribution de Dirac prend donc la forme d'une demi droite confondue avec l'axe des ordonnées.

descriptives des villages. Il a été possible par ailleurs de tenir compte dans ce modèle, du niveau hiérarchique «village» de collecte des données. De plus, ce modèle permet de classer les villages dans des groupes homogènes (classes latentes) de densité vectorielle, après la prise en compte des covariables.

Dans ces travaux, nous avons d'abord étudié graphiquement la relation entre les moyennes et les variances des observations afin de mettre en évidence une éventuelle surdispersion. Nous avons ensuite analysé la capacité des distributions P, NB, ZIP, ZINB et NPMP à décrire la distribution réelle des données de captures d'anophèles (*An. gambiae s.s.* et *An. funestus* cumulés) collectés durant 8 missions réalisées en 2009, après la mise en place des interventions de lutte anti-vectorielle. Les qualités des prédictions des distributions ont été comparées par la méthode du maximum de vraisemblance. Par la suite un modèle NPMP multivarié avec 4 classes latentes a été élaboré en tenant compte d'un effet aléatoire au niveau « village ». Les villages ont été répartis en classes sur la base du maximum des probabilités a posteriori (MAP) d'appartenance aux différentes classes latentes fournies par le modèle (Nagin and Odgers 2010). Afin d'analyser l'effet des interventions sur les densités de vecteurs, la classification des villages obtenue par la méthode du MAP a été comparée au regroupement des villages utilisé pour l'implémentation des 4 méthodes de lutte à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

L'étude des relations linéaires entre les variances et les moyennes (des données de chaque village, mission ou couple village-mission) révèle des pentes toutes supérieures à 1 indiquant la surdispersion des données. 74,7% des comptes de vecteur étaient égaux à zéro alors que sous l'hypothèse de Poisson ce pourcentage était estimé à 43,38%. Ceci confirme le caractère *zero-inflated* des données. Les distributions ZIP, NB et NPMP étaient capables de prédire la proportion de zéro (respectivement 74,7%, 74,9%, and 74,7%) et les distributions NB, ZINB et MP étaient les meilleures pour prédire nos données. Dans le modèle NPMP multivarié à 4 classes latentes, la présence de marâchage, la densité de population, les précipitations moyennes, le nombre de jours de pluie moyen sur les 8 missions et la position en extérieur du capteur étaient positivement corrélés avec le nombre de vecteurs capturés sur homme. A l'opposé, la distance au lac Toho, la présence d'adduction d'eau, la présence d'élevage bovin, la forme groupée du village et le NDVI moyen du village étaient négativement corrélés aux densités de vecteurs. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation entre la classification des villages sur la base de la densité moyenne de vecteurs, après prise en compte des covariables environnementales et le regroupement des villages par stratégies de lutte anti-vectorielle. Il n'y aurait donc pas de différence significative d'impact

des différentes méthodes de lutte sur les densités de vecteurs confirmant les résultats de l'essai clinique (chapitre 3).

Ces résultats mettent en évidence les caractéristiques des données de comptage d'anophèles telles que la surdispersion et l'excès de zéro qui ne peuvent être correctement traité par un simple modèle de Poisson. Le modèle de mélange à classe latente s'est révélé être pertinent pour l'analyse de ces données et a mis en évidence plusieurs facteurs influençant les densités de vecteurs dans les villages.

Par ailleurs, la classification *a posteriori* obtenue à partir de ce modèle pourrait être utile en amont d'études pour améliorer les protocoles, par exemple en adaptant l'effort d'échantillonnage en fonction du village et de la période. Une telle classification pourrait également être employée pour l'allocation de traitements dans le cadre d'essais contrôlés randomisés lorsqu'un échantillonnage stratifié est nécessaire.

Cette première analyse nécessite cependant d'être améliorée en faisant la distinction entre les différentes espèces vectrices dont les préférences écologiques sont susceptibles de varier. En effet, on peut supposer que les variables qui étaient significativement corrélées avec les comptes de vecteur totaux puissent agir de manière différente sur chacune des espèces de vecteur. Enfin, dans l'Article 6, les différents points de capture dans les villages ont été considérés comme des répliques indépendantes. Il conviendrait d'introduire dans les modèles un effet aléatoire au niveau du point de capture afin de prendre en compte la variabilité qui leur est propre.

5.4 Modélisation spécifique du contact homme-vecteur

Afin d'affiner l'analyse réalisée au paragraphe précédent, il convient de faire la distinction entre les différentes espèces de vecteurs présent dans la zone d'étude (*An. funestus*, *An. gambiae* s.s. formes moléculaires M et S). Ces espèces présentent des capacités et compétences vectorielles différentes (Cohuet *et al.* 2010) et par conséquent des rôles différents dans l'épidémiologie du paludisme dans la zone d'étude. La modélisation de leur distribution spatio-temporelle et de leur abondance constituerait donc une source d'information utile pour une meilleure compréhension des résultats de l'essai clinique. De plus, plusieurs variables pouvant avoir un impact sur les densités de vecteurs n'ont pas été prises en compte dans l'Article 6 et pourraient considérablement améliorer notre analyse et notre connaissance de la bio-écologie de ces vecteurs. Une analyse spécifique permettrait

également d'étudier l'effet des différentes méthodes de LAV sur chacune des différentes espèces de vecteur.

Le caractère *zero-inflated* des données issues des captures sur sujets humains nous interroge sur l'origine de cette surreprésentation de zéros. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons émis l'hypothèse raisonnable selon laquelle les déterminants de la présence d'un vecteur ne sont pas identiques à ceux influençant sa densité, à l'image de ce qui a été montré sur les larves d'anophèles (Bugoro *et al.* 2011, Gadiaga *et al.* 2011). Nous pouvons alors considérer les comptes de vecteur obtenus par CSH comme gouvernés par deux processus pouvant être modélisés. Le premier processus détermine si le compte de vecteur est nul ou positif (selon une distribution binomiale). Si ce compte est positif, le second processus détermine sa valeur. La réponse ne pouvant alors pas être égale à zéro, la distribution de ce second processus peut être caractérisée de "*zero-truncated*". Ce concept de modélisation à deux processus est souvent nommé "modèle de haie" ("*hurdle model*") (Zuur *et al.* 2009).

Dans la suite de nos travaux, nous avons donc d'abord étudié les déterminants de la présence de *An. funestus*, de *An. gambiae s.s.* forme moléculaire M et de *An. gambiae s.s.* forme moléculaire S. Nous avons pour cela modélisé la probabilité de présence de ces trois vecteurs en fonction des variables préalablement identifiées (§ 5.1). Nous pouvons remarquer qu'une probabilité de présence calculée sur la base des données obtenues par CSH correspond à la probabilité de réalisation du contact homme-vecteur. Les modèles résultants, une fois validés, nous ont permis d'établir des cartes de distribution du risque de contact homme-vecteur en saison sèche et en saison humide pour chacun des trois vecteurs. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Article 7) présentée au paragraphe suivant.

5.4.1 Modélisation des données de présence/absence

Article 7 : Modelling the risk of being bitten by malaria vectors in a vector control area in south Benin, West Africa

Moiroux N., Bangana A.S.B., Djènontin A., Chandre F., Corbel V., Guis H.

Parasites & Vectors (Submitted) 2013

Résumé

Cette première partie de l'analyse par espèce s'est consacrée à l'étude des déterminants de la distribution spatio-temporelle de *An. funestus* (AF) et des formes moléculaires M et S de *An. gambiae* (AGM et AGS) dans la zone d'étude (OKT). Puisque l'image SPOT utilisée pour décrire l'utilisation des sols et le paysage ne couvrait pas l'ensemble des villages de l'essai (Cf. § 5.2.3.1), ces travaux ont pu être réalisés sur 19 villages (70 % de couverture).

Nous avons utilisé des modèles binomiaux à effets mixtes pour analyser des données de présence-absence issue des CSH réalisées dans le cadre de l'essai durant l'année 2009, en fonction de covariables descriptives de l'environnement, dérivées d'image satellites et d'enquêtes de terrain. L'effet des méthodes de lutte sur la probabilité de présence des trois vecteurs a également été évalué. Les modèles multivariés obtenus ont été validés puis utilisés pour produire des cartes du risque d'être piqué par un vecteur de *Plasmodium* dans la zone.

La validation des modèles par validation croisée indique que **nos modèles prédisaient respectivement de manière "excellente", "bonne" et "acceptable" les probabilités de présence d'AF, AGM et AGS.**

La relation forte entre la probabilité de présence d'AF avec la présence d'eau de surface et de sols hydromorphes confirme la préférence de cette espèce pour les gîtes larvaires permanents et semi-permanents. Sa probabilité de présence variait significativement avec les variables ayant une dimension temporelle (précipitations, températures, NDVI) même si ceci ne s'est pas traduit par d'importantes différences d'aires de distribution entre la saison sèche et la saison pluvieuse.

En revanche, AGM était moins dépendant des zones humides permanentes que ce que l'on aurait pu attendre d'après la littérature (Costantini *et al.* 2009, Gimonneau *et al.* 2011, Simard *et al.* 2009). Il apparaît que cette espèce soit, dans cette zone, dépendante de zones humides et de gîtes larvaires semi-permanents ou temporaires tel que semblent le montrer les relations positives entre sa probabilité de présence et les surfaces de sols hydromorphes ou non végétalisés et la relation négative avec la fréquence des précipitations (qui pourrait traduire une sensibilité au lessivage des gîtes). Combiné avec une forte sensibilité aux variations de températures et de cumuls de précipitations, ceci entraîne un accroissement important de son aire de distribution durant la saison des pluies.

AGS qui se situe, dans cette zone, à la limite de son aire de distribution géographique nationale (Djogbenou *et al.* 2010), était distribué dans les zones les plus « continentales »¹⁴ de la zone d'étude. La relation avec les surfaces de sols hydromorphes ou avec la longueur de pistes semble confirmer son affection pour des gîtes temporaires.

La diversité des données de températures utilisées dans cette étude a montré la complexité des relations entre ce type de données et la présence des vecteurs. Notons cependant, que des données de température enregistrées deux semaines avant les captures (c'est à dire pendant une période influençant la vie larvaire) se sont révélées prédictives de la présence des trois espèces d'anophèles.

La relation positive observée entre les probabilités de présence d'AGM et d'AGS capturés par CSH et le nombre ou la présence de gîtes domestiques positifs à *Anopheles sp.* semble suggérer qu'une partie de la transmission pourrait être assurée par des moustiques issus de gîtes utilisés pour le stockage d'eau dans les villages et les maisons.

Par ailleurs, nous avons également observé que la probabilité de présence d'AF et d'AGM était plus grande dans les villages composés de plusieurs quartiers. Notre interprétation de cette observation est qu'une plus grande dispersion des habitations pourrait augmenter l'aire d'attraction de ces villages.

En regardant le comportement de la variable « intervention », nous avons noté que la probabilité de présence d'AF était plus faible dans les villages ayant reçu la combinaison MIU+BMI ce qui pourrait indiquer une certaine efficacité de cette méthode de lutte contre cette espèce. A l'inverse, une augmentation de probabilité de présence d'AGM et AGS était observée dans les villages ayant reçu les MI en couverture universelle (seules ou en combinaison avec des BMI) par rapport à ceux ayant reçu une couverture sélective. Malgré

¹⁴ Continental : au sens de l'éloignement du milieu marin, des côtes.

une probabilité à la limite de la significativité (>0.01), nous avons formulé trois hypothèses pour expliquer cette situation :

- si cette augmentation est réelle, cela signifie que les vecteurs des villages ayant reçu cette intervention ont acquis un avantage leur ayant permis d'accroître la taille de leur population. Il est peu probable que cela provienne d'une résistance accrue aux insecticides pyréthrinoïdes dans les populations sauvages puisque les fréquences alléliques du gène *kdr* n'étaient pas différentes entre les groupes de villages constituant les différentes interventions (Article 3).
- l'augmentation pourrait être due au hasard de l'échantillonnage et ainsi refléter une situation environnementale favorable à la présence de ce vecteur dans la majorité des villages ayant reçu cette intervention. Ceci signifierait donc qu'une variable très corrélée avec les villages ayant reçu cette intervention et explicative d'une forte probabilité de présence des deux formes M et S n'ait pas été prise en compte dans les modèles statistiques. Cette interprétation nous semble également peu probable car les modèles prédictifs ont présenté de bons résultats de validation.
- cette augmentation pourrait donc être « virtuelle » et liée à une surexposition des captureurs. C'est l'interprétation que nous privilégions car les plus forts taux d'utilisation des MI observés dans ces villages ont pu contribuer à détourner une partie des vecteurs vers (i) des hôtes alternatifs tels que les animaux (bovins) comme le suggère le modèle AGM ou (ii) des humains non protégés par des MI (tels que les captureurs).

Pour conclure ce paragraphe, ces travaux nous ont permis de décrire les conditions environnementales nécessaires à la présence des trois vecteurs majeurs de *Plasmodium* au Bénin et d'évaluer indirectement l'impact des méthodes de LAV sur la probabilité de présence de chacune des espèces. La validation des modèles a permis de montrer la qualité de leurs capacités de prédiction et les cartes qui en ont résulté nous ont permis d'appréhender les variations saisonnières des distributions de ces vecteurs.

5.4.2 Modélisation des comptes positifs

La deuxième partie de l'analyse spécifique consiste à modéliser les comptes positifs de vecteurs afin d'identifier les facteurs influençant les densités des trois vecteurs de la zone exclusivement lorsqu'au moins un individu a été capturé.

5.4.2.1 Méthode

Nous avons utilisé un modèle mixte "zero-truncated" pour modéliser les comptes positifs des trois vecteurs durant les 8 missions de CSH de l'année 2009 dans les 19 villages couverts par l'image SPOT. Une distribution négative-binomiale a été utilisée pour prendre en compte la surdispersion des comptes positifs (tels que le suggère l'analyse de la distribution des données réalisées à l'Article 6). Des effets aléatoires hiérarchisés, au niveau du village et de la maison de capture ont été intégrés aux modèles pour prendre en compte les possibles corrélations. Nous avons utilisé la fonction "glmmadmb" (Skaug *et al.* 2012), issue de la librairie éponyme implémentée dans le logiciel *R* (R Development Core Team 2010). Les variables et la méthode de sélection des variables étaient les mêmes que celles utilisées dans l'Article 7. Les valeurs prédites (cumulées à l'échelle des villages, pour chaque mission) par les modèles multivariés définitifs ont été comparées aux valeurs réelles en calculant le taux d'erreur *Err* défini par la formule suivante (Cottrell *et al.* 2012) :

$$Err = |Obs - Pred| / Obs$$

où *Obs* est la valeur observée et *Pred* est la valeur prédite par le modèle.

La distribution des taux d'erreur a été analysée graphiquement en fonction des valeurs observées. Les comptes observés et prédits par les modèles dans chaque village, durant chaque mission de capture ont été comparés graphiquement.

5.4.2.2 Résultats

AF est le seul vecteur pour lequel des comptes positifs n'ont pas été observés dans l'ensemble des villages. Ainsi, seuls 15 villages ont été pris en compte dans l'analyse (3 villages MIS, 4 villages MIU, 3 villages MIU+BMI et 5 villages MIS+AI). Les covariables qui ont été conservées dans les modèles définitifs, les rapports de taux de densité (DRR: *density rate ratio*) et leurs intervalles de confiance à 95% (95%CI) sont présentées dans les Tableaux 4, 5 et 6 respectivement pour les modèles des comptes positifs de AF, AGM et AGS.

En raison d'erreurs provoquées lors de l'introduction des variables discrétisées en tertiles dans les modèles multivariés (non convergence des modèles), ces dernières¹⁵ ont été

¹⁵ Après avoir exclu les variables corrélées : 8, 0 et 3 variables discrètes sur 24, 13 et 12 variables restantes ont été retirées des l'analyse multivariées des comptes d'AF, AGM et AGS respectivement.

retirées de l'analyse écartant toute possibilité de mettre en évidence d'éventuelles relations non-linéaires ou monotoniques.

Les comptes positifs d'AF étaient positivement corrélés avec les cumuls de précipitations durant les 16 jours précédant la capture et avec la présence de prairies aquatiques. Ils étaient en revanche négativement corrélés avec le NDVI.

Les comptes positifs d'AGM étaient positivement corrélés avec les températures nocturnes enregistrées durant la période larvaire (2 semaines avant la capture), les cumuls de précipitations et la présence de prairies marécageuses. Ils étaient négativement corrélés avec la densité de frontières de prairies aquatiques, le nombre d'entités d'eaux de surface, la densité de frontière des végétations de strate herbacée et la présence de gîtes domestiques positifs aux larves d'*Anopheles sp.*.

Les comptes positifs d'AGS étaient positivement corrélés avec la densité de gîtes domestiques positifs aux larves d'*Anopheles sp.*, le nombre de bovins et l'altitude. Ils étaient négativement corrélés avec les températures nocturnes de la période de capture.

Plus d'individus AGM étaient capturés à l'extérieur tandis que les AGS étaient plus nombreux à l'intérieur des habitations.

Le nombre de AF était plus faible dans les villages ayant reçu les MI en combinaison avec le BMI et il y avait moins d'AGM dans les villages ayant reçu les MI en couverture universelle.

Tableau 4: Modélisation des comptes positifs à *An. funestus*

	DRR	95% CI		P-value	
NDVI (2 weeks before catch)	0.000	0.000	0.135	1.22E-02	*
Cumulated precipitation (16 days before catch) (mm)	1.006	1.001	1.011	2.89E-02	*
Aquatic grassland					
absence	1				
presence	4.713	2.179	10.194	8.20E-05	***
Vector control ¹⁶					
TLLIN	1				
ULLIN	0.605	0.334	1.097	9.80E-02	.
ULLIN+CTPS	0.168	0.056	0.504	1.40E-03	**
TLLIN+IRS	0.447	0.168	1.189	1.07E-01	

¹⁶ TLLIN = MIS ; ULLIN = MIU ; CTPS = BMI ; IRS = AI

Tableau 5: Modélisation des comptes positifs à *An. gambiae* forme M

		DRR	95% CI	P-value	
Edge density of aquatic grassland		0.912	0.856	0.972	4.44E-03 **
Number of patch of surface freshwater		0.533	0.289	0.982	4.35E-02 *
Edge density of herb stratum areas		0.969	0.954	0.985	1.60E-04 ***
Nocturnal T°(2 weeks before catch)		1.186	1.042	1.350	1.00E-02 *
Cumulated precipitation (16 days before catch)		1.008	1.006	1.010	5.30E-13 ***
Domestic breeding sites	Absence	1			
	Presence	0.911	0.858	0.968	2.60E-03 **
Herbswamp	Absence	1			
	Presence	2.569	1.147	5.753	2.18E-02 *
Vector control	TLLIN	1			
	ULLIN	0.390	0.159	0.955	3.93E-02 *
	ULLIN+CTPS	0.824	0.301	2.255	7.07E-01
	TLLIN+IRS	1.076	0.411	2.813	8.82E-01
Place	Indoor	1			
	Outdoor	1.416	1.021	1.963	3.71E-02 *

Tableau 6: Modélisation des comptes positifs à *An. gambiae* forme S

		DRR	95% CI	P-value	
Nocturnal T°(the week of catch)		0.458	0.283	0.741	1.44E-03 **
Anopheles Breteau Index		1.255	1.086	1.450	2.10E-03 **
Number of cattle		1.021	1.004	1.039	1.51E-02 *
Mean elevation (m)		1.079	1.033	1.127	5.80E-04 ***
Vector control	TLLIN	1			
	ULLIN	4.828	0.982	23.752	5.27E-02 .
	ULLIN+CTPS	1.040	0.173	6.274	9.66E-01
	TLLIN+IRS	0.499	0.118	2.108	3.44E-01
Place	Indoor	1			
	Outdoor	0.517	0.304	0.882	1.54E-02 *

Comme aucune variable dérivée de l'image SPOT n'a été retenue dans le modèle AGS (Tableau 6), nous avons pu étendre sa validation aux 28 villages de l'essai. La Figure 20 nous montre la distribution des taux d'erreur des prédictions fournies par validation croisée en fonction des comptes observés. Nous observons que l'erreur de prédiction était globalement plus faible avec le modèle AGM (médianes toujours inférieures à 0,5) qu'avec les deux autres espèces mais avec cependant des taux d'erreur importants lorsque les densités réelles étaient faibles (<10). La Figure 21 permet de comparer les comptes prédits par les modèles et les

comptes observés pour les trois espèces dans chaque village et pour chaque mission. L'efficacité du modèle AF (Figure 21A) était variable d'un village à l'autre et dans un même village, d'une période de l'année à l'autre. Le modèle AGM (Figure 21B) était le plus performant pour prédire les comptes réels et le modèle AGS (Figure 21C) sous-estimait souvent le nombre de vecteurs mais reflétait bien les tendances.

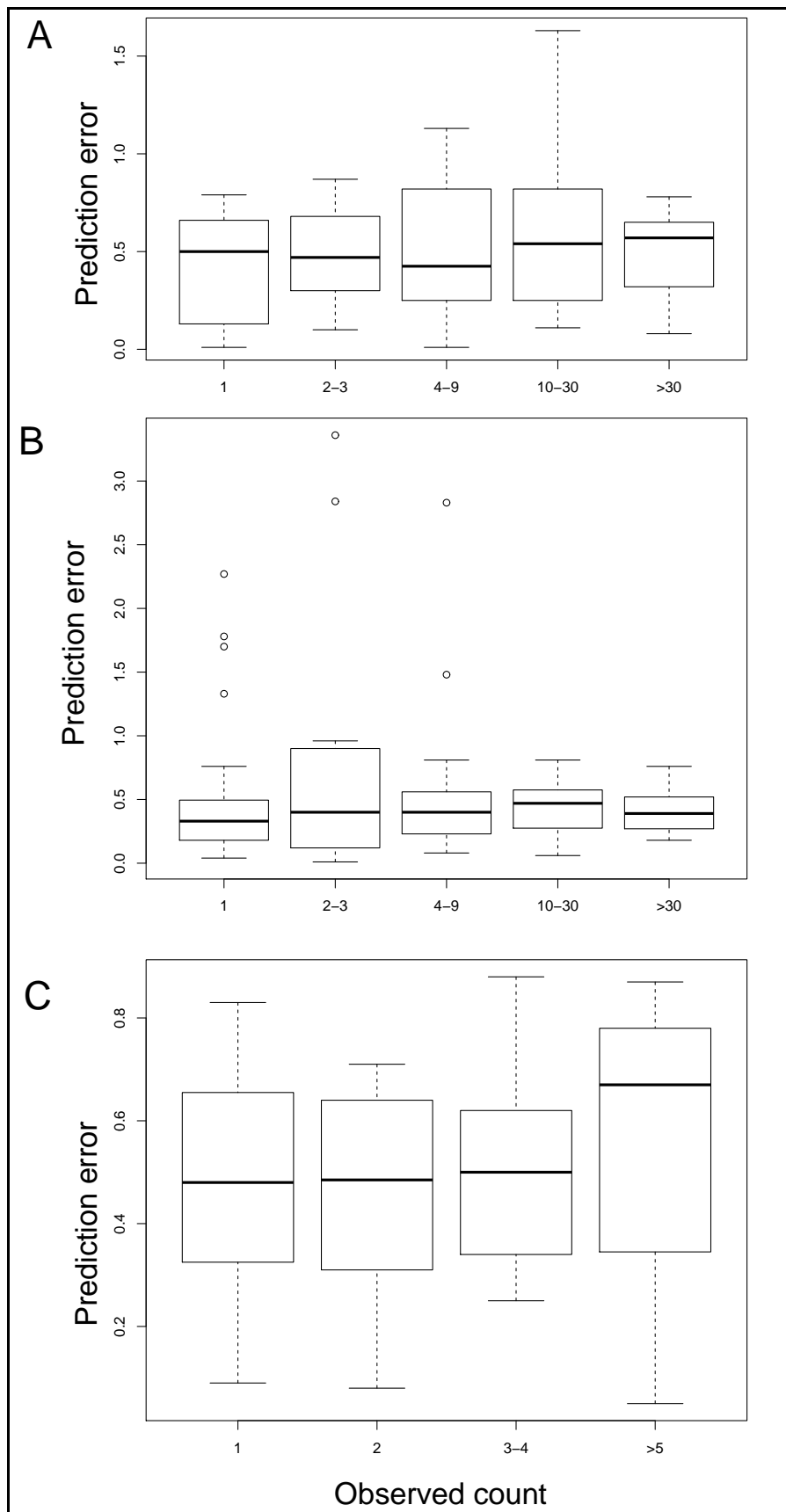


Figure 20 : Erreur de prédiction des modèles de comptes de (A) *An. funestus*,
 (B) *An. gambiae* s.s. forme M et (C) forme S.

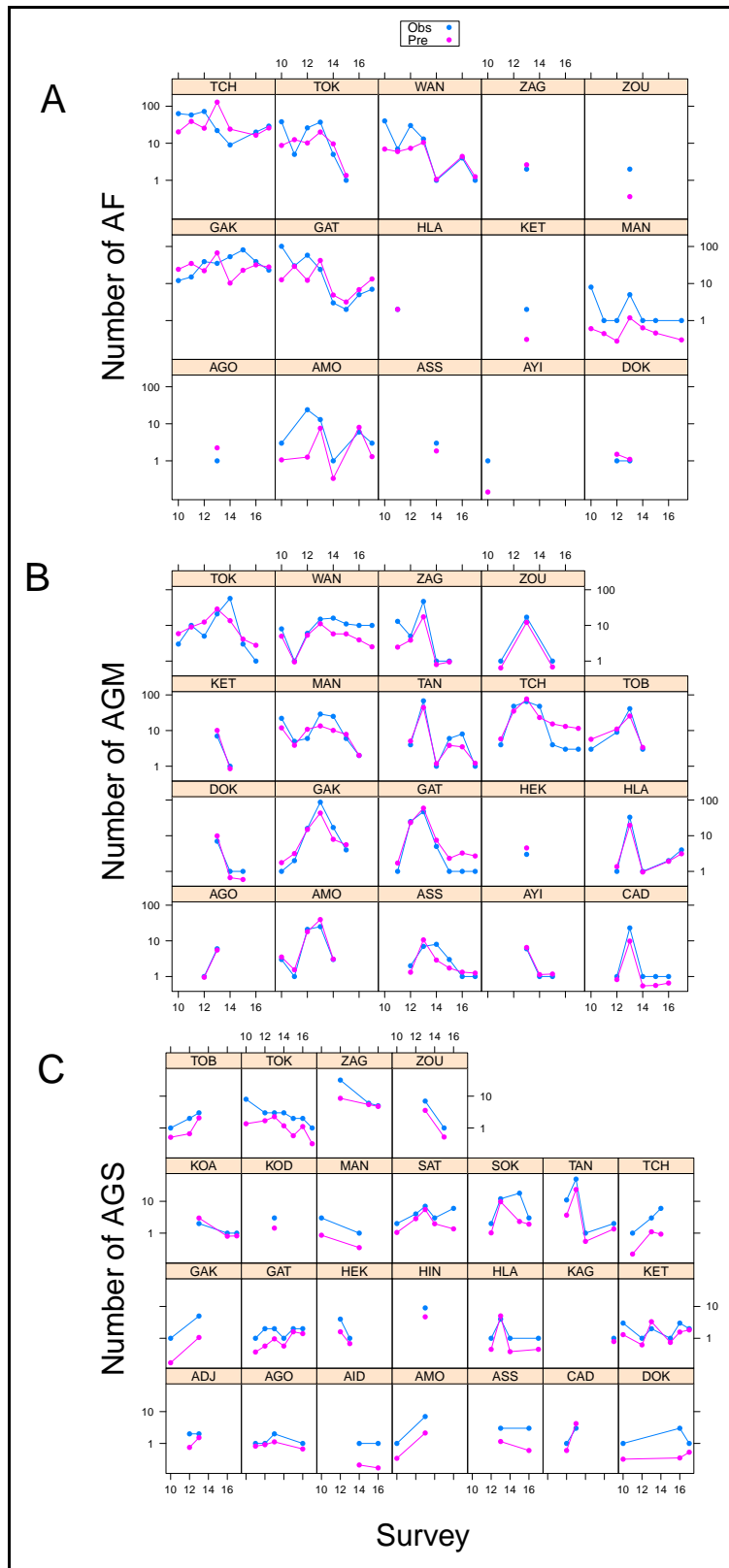


Figure 21 : Comptes de (A) *An. funestus*, (B) *An. gambiae* s.s. forme M et (C) forme S prédis et observés dans les villages de l'étude

5.4.2.3 Discussion

Les travaux présentés ici ont visé à modéliser les comptes positifs de AF, AGM et AGS afin d'identifier leurs principaux déterminants environnementaux (méthodes de LAV incluses). Nous avons pour cela utilisé des modèles mixtes "zero-truncated". En raison du retrait des variables discrétisées en tertiles, il faut noter que les modèles obtenus dans cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence d'éventuelles relations non linéaires ou monotoniques.

Lorsque AF et AGM étaient présents, les cumuls de précipitation étaient positivement corrélés avec leurs densités. Ceci indique, qu'en plus de constituer un facteur expliquant la présence des ces espèces (Article 7), un accroissement des cumuls de précipitations favoriserait la productivité ou le nombre de gîtes larvaires. Cette observation n'a cependant pas été faite pour AGS ce qui pourrait indiquer que lorsque les conditions sont réunies pour que cette espèce soit présente, des précipitations supplémentaires ne permettent pas une production larvaire (ou une production de gîtes) supérieure, tout au moins dans l'intervalle de densités observé dans les villages étudiés (entre 1 et 17 vecteurs/homme/mission).

Les densités de AF étaient supérieures en présence de prairies aquatiques qui pourraient être des milieux favorables au développement larvaire de cette espèce (Hamon 1955). La relation négative entre les densités de AF et le NDVI pourrait indiquer l'effet d'autres milieux aquatiques (qui n'auraient pas été discriminés sur l'image SPOT) sur la production larvaire puisque les eaux de surface tendent à faire diminuer le NDVI (Tucker 1979). Les densités de AGM ont augmenté, quant à elles, en présence de prairies marécageuses qui sont des milieux temporairement inondés. En revanche, deux indicateurs paysagers de zones humides permanentes (densité de frontières de prairies aquatiques et nombre d'entités d'eaux de surfaces) étaient négativement corrélés aux densités positives de AGM. Les milieux aquatiques permanents sont plus susceptibles d'accueillir des prédateurs des larves de moustiques (poissons, *Notonectidae*, *Dytiscidae*...) (Gimonneau *et al.* 2011) et une pression de prédation sur AGM pourrait expliquer ce résultat. Bien qu'étant prédictrice de la présence de AGM, la présence de gîtes domestiques positifs aux larves de *Anopheles sp.* était négativement corrélée à la densité de AGM. Ceci pourrait traduire le fait que ces gîtes larvaires (principalement dédiés au stockage d'eau), bien qu'ayant permis l'établissement de ce vecteur, ont été peu productifs. Ceci pourrait s'expliquer par des capacités faibles de développement dans ce type de milieux susceptibles de subir des perturbations régulières (prélèvement d'eau de boisson, déversement, etc.). Du reste, AGS, qui semble plus adapté aux

milieux temporaires grâce notamment à une vitesse de développement larvaire supérieure à celle d'AGM (Diabate *et al.* 2008, Diabate *et al.* 2005), présentait des densités positivement corrélées avec le nombre de gîtes domestiques. Nous avons également observé une diminution des densités d'AGM avec la longueur de frontières des milieux de strate herbacée. Puisque 84% des frontières des milieux de strate herbacée étaient communes avec des milieux de strate supérieure (arbustive ou arborescente, données non montrées), cette observation pourrait traduire un effet "barrière" jouée par les lisières entre ces milieux ouverts et les milieux fermés qui sont susceptibles de limiter la dispersion de ce vecteur. De faibles distances de dispersion ont en effet été observées chez *An. gambiae* en zone de forêt (Le Goff *et al.* 1997), cette difficulté à se déplacer dans les milieux fermés pourraient expliquer la plus faible vagilité¹⁷ de AGM par rapport à AGS comme observée précédemment au Cameroun (Simard *et al.* 2009).

Les températures enregistrées deux semaines avant les captures ont été positivement corrélées avec les densités de AGM indiquant que dans la gamme de température où AGM était présent, les températures les plus élevées favorisaient son développement larvaire. Les densités de AGS étaient quant à elles corrélées négativement avec les températures nocturnes de la période de capture ce qui pourrait indiquer que plus d'hôtes étaient disponibles¹⁸, en lien avec la diminution de l'utilisation des moustiquaires lors des nuits les plus chaudes (Article 5). Les densités de AGS augmentaient avec l'altitude. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les milieux continentaux et secs, décrits comme favorisant la présence de gîtes larvaires temporaires de cette espèce (Diabate *et al.* 2005, Gimonneau *et al.* 2011) sont situés dans les zones de plus fortes altitudes de notre zone d'étude. Les empreintes de sabots laissées par les bovins sont également susceptibles de produire des gîtes temporaires favorables à *An. gambiae* (Minakawa *et al.* 1999) ce qui peut expliquer la corrélation positive observée entre les densités d'AGS et le nombre de bovins.

Notons que lorsqu'il était présent, AGM était trouvé en plus faibles effectifs dans les villages ayant reçu les MI en couverture universelle. La faible significativité de ce résultat ($p=0,04$) et la contradiction avec les résultats de l'analyse binomiale (Article 7) ne nous permettent cependant pas de conclure à un effet direct de la méthode de lutte. En revanche, les densités de AF étaient très significativement inférieures dans les villages ayant reçu la

¹⁷ Capacité d'un organisme à se déplacer dans l'environnement, à migrer.

¹⁸ Si plus d'hôtes sont disponibles, le nombre de vecteurs par hôte (et donc par capteur) diminue (effet de dilution)

combinaison MIU+BMI ce qui tend à confirmer l'effet de cette intervention sur la densité de ce vecteur comme semblait le montrer l'analyse binomiale (Article 7).

L'analyse *zero-truncated* montre que le nombre de AGS capturés étaient en moyenne plus important à l'intérieur qu'à l'extérieur des maisons de capture bien que plus d'individus aient été capturés au total à l'extérieur (Article 7). Ceci pourrait indiquer que la fraction endophage de la population de AGS avait tendance à se concentrer dans certaines maisons dont il a été montré que les caractéristiques peuvent faire varier considérablement le taux d'entrée (Lindsay *et al.* 2003). A l'inverse, les densités positives de AGM étaient plus importantes à l'extérieur qu'à l'intérieur révélant un comportement majoritairement exophage qui est susceptible d'être une réponse aux méthodes de LAV déployées dans les villages tel que cela a déjà été observé chez des vecteurs de *Plasmodium* sur l'île de Bioko ou en Tanzanie (Reddy *et al.* 2011, Russell *et al.* 2011).

La validation croisée des modèles nous a montré une capacité de prédiction satisfaisante pour les trois espèces/formes. Les variations (augmentation ou diminution de la densité) entre deux missions de captures dans un même village étaient la plupart du temps correctement prédites par les modèles. On notera cependant une sous-estimation des densités prédites pour AGS.

5.5 Conclusion

L'analyse de la distribution statistique des comptes de vecteurs a mis en évidence la surdispersion des données en raison notamment de leur caractère *zero-inflated* (Article 6). L'hypothèse, résultante de cette observation, selon laquelle les facteurs expliquant la présence d'un vecteur ne sont pas les mêmes que ceux expliquant sa densité a été confirmée. En effet, pour chaque espèce, la structure (l'ensemble des covariables) du modèle binomial (Article 7) et celle du modèle *zero-truncated* étaient toujours différentes. De plus, il est apparu qu'une même variable pouvait agir de manière opposée sur la probabilité de présence et sur la densité. Considérer les comptes de vecteurs comme répondant à deux processus distincts s'est donc révélé pertinent pour accroître les connaissances de la bio-écologie de ces espèces et devrait être renouvelé dans des études ultérieures.

Nos modèles ont permis de mieux distinguer les différences écologiques de ces trois vecteurs dans notre zone d'étude. En premier lieu, nos résultats semblent indiquer que AF, AGM et AGS se distribuent selon un gradient de persistance des gîtes larvaires, de permanent

à temporaire. Conformément à la littérature (Gimnig *et al.* 2001, Hamon 1955), la présence et les densités d'AF étaient corrélées à la présence de milieux aquatiques permanents. AGS, quant à lui, était clairement lié à des milieux procurant des gîtes temporaires ce qui confirme plusieurs études (Gimnig *et al.* 2001, Gimonneau *et al.* 2011). AGM semblait prendre une position intermédiaire puisque d'après nos modèles, il était majoritairement associé à des milieux semi-permanents. De plus, l'analyse des comptes positifs a permis d'affiner ces observations puisque AF et AGM semblaient préférer les milieux aquatiques végétalisés (prairies aquatiques et marécageuses, respectivement).

La présence de gîtes larvaires peri-domestiques positifs pour la présence de larves de *Anopheles sp.* ont pu favoriser l'implantation des deux formes moléculaires de *An. gambiae s.s.* comme semblent l'indiquer nos modèles. Ils pourraient permettre de maintenir ces vecteurs en saison sèche lorsque que les gîtes naturels temporaires se font rares. Ces gîtes sont très accessibles et pourraient faire l'objet d'une lutte anti-larvaire peu coûteuse dont l'efficacité reste à évaluer.

La précision de la résolution temporelle des données météorologiques ou environnementales (températures, précipitations, NDVI) utilisées pour l'étude de la distribution ou de l'abondance des moustiques vecteurs est rarement exploitée. En effet, beaucoup d'auteurs utilisent une moyenne des données établie sur une base mensuelle incluant la période de la mesure entomologique (Galardo *et al.* 2009, Kristan *et al.* 2008, Mabaso *et al.* 2007). Cette méthode induit une grande perte de précision puisque des données postérieures à la mesure entomologique sont alors prises en compte, données qui n'ont pas pu influencer la valeur de cette mesure. Ici, nous avons exploité ces données sans en dégrader la résolution afin d'approcher au mieux la réalité biologique. Par exemple, nous avons récolté des données de précipitation avec une résolution journalière ce qui nous a permis d'étudier les précipitations pendant les 2 semaines précédant chaque mission de capture (influençant la phase larvaire des vecteurs capturés) et pendant les jours de captures (influençant l'activité des vecteurs). Ceci nous a donc permis d'étudier l'influence de ce phénomène en augmentant la précision de la mesure de la relation et de son interprétation.

Ces travaux ont montré qu'il était possible de produire des cartes prédictives de la distribution des différents vecteurs, à très haute résolution. Une simplification de ces modèles associée à une meilleure disponibilité de certaines données comme les données de pédologie pourraient permettre d'établir des cartes de distribution à des échelles nationales ou régionales telles qu'il en existe (Hay *et al.* 2010, Okara *et al.* 2010, Sinka *et al.* , Sinka *et al.* 2012) mais en conservant une résolution suffisante pour avoir une information à l'échelle du village. De

telles cartes constitueraient des outils performants pour adapter les méthodes de lutte dans l'espace et dans le temps en fonction des vecteurs.

Quant aux effets des différentes méthodes de lutte déployées dans les villages sur les différentes espèces de vecteurs, nos analyses nous ont permis d'affiner les résultats présentés dans l'Article 3. Il semblerait en effet que l'association MIU+BMI ait permis une diminution significative des densités d'AF sans que cela n'ait eu de répercussions sur l'intensité de la transmission et sur l'incidence palustre. De plus, AGM a montré un comportement majoritairement exophage alors qu'avant la mise en place des interventions, les individus AGM étaient capturés à parts égales entre l'intérieur et l'extérieur (*Cf.* § 4.2). Ces résultats suggèrent que des interventions de lutte anti-vectorielle pourraient induire des changements de comportement trophique chez les vecteurs (*Cf.* chapitre 6).

Chapitre 6 : Etude de la résistance comportementale

Les travaux de modélisation présentés au chapitre précédant ont montré que AGM et AGS étaient capturés plus souvent à l'extérieur des habitations alors qu'en phase pré-intervention, ces deux formes moléculaires ne présentaient pas de préférences comportementales en termes d'endophagie (§ 4.2.1). *Anopheles funestus*, qui était majoritairement endophage avant la mise en place des interventions n'a plus semblé montrer cette préférence en phase post-intervention. Ces observations semblent indiquer un accroissement de l'exophagie chez ces vecteurs qui pourrait résulter de l'implémentation des méthodes de LAV. En effet, des résistances comportementales qui permettent aux vecteurs de *Plasmodium* d'éviter le contact avec les insecticides ont été rapportées à plusieurs reprises en Afrique (Geissbuhler *et al.* 2007, Govella and Ferguson 2012, Pates and Curtis 2005, Russell *et al.* 2011). Ces changements de comportement peuvent se traduire par un accroissement de l'exophagie, par un ajustement de l'horaire d'activité ou par une diminution de l'anthropophilie. Dans ce chapitre, nous avons souhaité étudier l'influence de la mise en place de MI (intervention commune à tous les bras dans l'essai clinique) sur l'exophagie et les horaires de piqûre des vecteurs. Pour se prévaloir de tout facteur confondant lié à la résistance aux insecticides, nous avons focalisé nos travaux sur *An. funestus* qui ne présentait pas de résistance connue aux pyréthrinoïdes pouvant interférer avec le comportement (résistance à l'effet excito-répulsif des MI). Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *The Journal of Infectious Disease*.

Article 8 : Changes in Anopheles funestus biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin

**Moiroux N, Gomez B.M., Pennetier C., Elanga E., Djenontin A., Djegbe I., Chandre F.,
Guis H., Corbel V.**

The Journal of Infectious Diseases 2012; 206 (10), 1622-9

Résumé

Dans cette étude, nous avons étudié l'exophagie et les horaires de piqûre de *An. funestus* dans deux villages (Tokoli et Lokohouè), avant, un an après et trois ans après la mise en place de MI en couverture universelle. Cette étude a été réalisée sur la base des données récoltées par CSH durant la phase de pré-intervention (Cf. § 4.1), durant le premier semestre 2009 de l'essai clinique (1 an après la mise en place de la couverture universelle) et en avril 2011 lors de collections supplémentaires (3 an après la mise en place de la couverture universelle). Nous avons analysé l'évolution du taux d'exophagie et de l'heure médiane de capture qui représente l'heure à laquelle 50 % des vecteurs piquant durant la nuit de capture étaient collectés à chaque enquête. Durant la troisième phase de capture en 2011, nous avons prolongé les captures jusqu'à 9h le matin afin d'évaluer la part de vecteur piquant après 6h du matin (heure à laquelle les captures étaient interrompues durant les phases précédentes). Des vecteurs capturés début 2010 ont été élevés à l'insectarium et la première génération obtenue de ces moustiques de terrain ont fait l'objet de test de sensibilité à la deltaméthrine, l'insecticide utilisé pour l'imprégnation des moustiquaires.

Dans les deux villages, l'heure médiane de capture (pour la période de capture 23 h - 6 h) s'est décalée de 2 h à Tokoli et 3 h à Lokohouè à 5 h du matin dans les deux villages. A Tokoli, le taux d'exophagie a augmenté significativement de 45 à plus de 60 % après la mise en place de la couverture universelle tandis qu'il est resté stable à Lokohouè (45 %). Dans ce dernier village, en revanche, nous avons observé, 3 ans après la mise en place des moustiquaires en couverture universelle, une plus forte proportion de vecteurs capturés après 6 h du matin (26 % contre 6,6 %). La population de *An. funestus* étudiée ne présentait aucune résistance à la deltaméthrine.

Nos résultats ont montré un changement significatif de comportement des populations de *An. funestus* dans deux villages ayant reçu des MI en couverture universelle. Nous avons en effet observé un décalage de l'horaire de piqûre dans les deux villages, mettant en évidence un pic d'agressivité à l'aube, lorsque les habitants ne sont plus protégés par des moustiquaires. Ce comportement était exacerbé à Lokohouè où nous avons capturé une large proportion de la population agressive de *An. funestus* après 6h du matin. Cette observation montre que les vecteurs de *Plasmodium* ne sont pas exclusivement nocturnes et qu'il est important de réaliser des séances de captures aux marges des horaires habituels, particulièrement dans des contextes de LAV. Ce comportement diurne était peu observé à Tokoli où, en revanche, le comportement d'évitement privilégié était l'exophagie. Il est donc intéressant de noter qu'un

type de comportement d'évitement semble avoir été privilégié par chacune des populations d'*An. funestus* dans chaque village. Ceci nous renvoie à d'intéressantes interrogations quant aux mécanismes de sélection de ces comportements en relation avec la LAV (plasticité phénotypique *versus* sélection génétique) qu'il sera important d'étudier dans l'avenir.

Ces travaux nous permettent de mettre en évidence une limite importante à l'efficacité des méthodes de LAV évaluées durant l'essai. En effet, la transmission impliquant *An. funestus* s'est accru à l'extérieur des habitations, et après l'aube, en des lieux et des horaires où les populations ne bénéficiaient d'aucune protection puisque les MI, BMI et AI ne ciblent pas ces populations de vecteurs. Ceci peut également expliquer pourquoi la réduction de densité de *An. funestus* observée dans le bras MIU+BMI n'a pas entraîné de réduction des cas de paludisme. Il y a donc urgence à déployer sur le terrain des méthodes de LAV capable de cibler ces vecteurs exophages et/ou qui présentent un comportement de piqûre tardif afin de réduire plus fortement la transmission.

Chapitre 7 : Discussion générale

Durant la décennie 2000, la mortalité et la prévalence du paludisme a diminué substantiellement en Afrique sub-saharienne (WHO 2011). Supportée par un accroissement des financements nationaux et internationaux ayant permis d'accroître la couverture effective en MI et AI, l'objectif d'élimination a fait son retour sur le plan d'action mondial contre le paludisme (Feachem and Sabot 2008, RBM 2008). Malheureusement, des rapports récents ont pointé des résurgences de paludisme dans plusieurs pays soulignant les limitations des méthodes et stratégies de lutte anti-vectorielle (Protopopoff *et al.* 2007, Trape *et al.* 2011, WHO 2011). La plupart des méthodes de LAV reposent sur l'utilisation d'insecticides chimiques. En raison de la distribution massive de MI depuis les années 2000 et du regain d'intérêt qu'on connu les AI en Afrique sub-saharienne, les pyréthriinoïdes ont été utilisés à outrance par les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme. L'exposition croissante à ces composés a induit une augmentation considérable des résistances à cette classe d'insecticide chez les principaux vecteurs de *Plasmodium* (Article 1). A un niveau local, au Bénin, nous avons observé la présence systématique de résistances aux pyréthriinoïdes chez les populations de *An. gambiae*, particulièrement dans le Sud du pays (Article 2). Ces résistances font appel à des mécanismes polyfactoriels basés sur la modification de la cible des pyréthriinoïdes (mutations kdr) et sur un accroissement des processus de métabolisation des insecticides. Selon l'OMS (WHO 2011), les résistances aux insecticides constitueraient une menace sérieuse à l'encontre des objectifs de l'initiative "Faire reculer le paludisme" qui vise notamment une réduction de 75 % de la mortalité et de la morbidité due au paludisme d'ici 2015.

Des stratégies de gestion de la résistance adaptées localement (en tenant compte des faciès entomologiques) sont désormais préconisées par l'OMS (WHO 2012). Celles-ci font appel à la rotation des insecticides, aux mosaïques d'insecticides, aux mixtures et à la combinaison d'interventions basées sur au moins deux insecticides à modes d'action différents (Cf. chapitre 3). Il est important que les deux familles d'insecticides ne montrent pas de résistance croisée afin de ne pas annuler l'effet bénéfique des associations.

Au Bénin, les problèmes posés par la résistance des vecteurs aux insecticides pyréthriinoïdes (Asidi *et al.* 2012, N'Guessan *et al.* 2007) ont poussé l'IRD et ses partenaires béninois (CREC, Ministère de la santé, PNL) à évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie de lutte anti-vectorielle basée sur la combinaison de MI et de AI de carbamates. Le mode

d'action différent des carbamates (ciblant l'acétylcholinestérase) ainsi que l'absence de résistances croisées avec les pyréthrinoides (Djogbenou *et al.* 2011) ont guidé le choix de cette famille insecticide pour les AI. Les postulats étaient que les associations d'insecticides permettraient (i) une protection supplémentaire contre le paludisme, (ii) une augmentation de la couverture efficace des interventions et (iii) une meilleure gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides que ne le fournit la couverture sélective de moustiquaires imprégnées (femmes enceintes et enfants de moins de 6 ans).

L'essai clinique réalisé dans la zone Ouidah-Kpomassè-Tori (OKT) visait à comparer l'impact (en termes d'incidence clinique du paludisme et de gestion de la résistance) de combinaisons d'interventions (associant MI et BMI ou AI de carbamate) et d'une couverture universelle de MI avec celui d'une couverture sélective (Article 3). Les résultats de cet essai ont montré que les combinaisons (MIU+BMI et MIS+AI) et les MI en couverture universelle n'ont pas réduit significativement la densité des accès palustres chez les enfants de moins de 6 ans, ni la prévalence des infections ni la densité parasitaire moyenne chez les enfants asymptomatiques par rapport au bras de référence (MI en couverture sélective) (Article 4). De plus, les combinaisons d'insecticide n'ont pas ralenti l'accroissement de la fréquence de la mutation kdr dans les populations de *An. gambiae*. Afin de mieux comprendre les causes de ces échecs et dans le but d'améliorer et de définir les caractéristiques des futures stratégies de lutte contre les vecteurs (The malERA Consultative Group on Vector Control 2011), il était important de mieux comprendre les facteurs opérationnels (liés aux interventions), biologiques (liés aux vecteurs) et environnementaux susceptibles d'impacter l'utilisation et l'efficacité des stratégies de lutte contre ces populations locales de vecteurs.

7.1 Identification et compréhension des limites de la LAV

7.1.1 Limitations opérationnelles

L'une des hypothèses émise pour expliquer l'absence d'efficacité supplémentaire de la couverture universelle de MI et des combinaisons était un trop faible taux d'utilisation de ces MI. Durant l'essai clinique, pour aucune des interventions, le taux moyen d'utilisation des MI n'a dépassé le seuil critique des 60%, seuil dont nous avons montré qu'il doit être atteint pour permettre une réduction de l'incidence palustre (Article 5). Nous savons également que le taux d'utilisation des MI peut varier considérablement en suivant un cycle saisonnier. Damien *et al.*

(2011) ont en effet montré une diminution du taux d'utilisation des MI de 80 à 30% chez les enfants de moins de 6 ans en saison sèche dans les villages ayant reçu la couverture sélective de MI. Nous avons montré que cette réduction spectaculaire pouvait être expliquée par la hausse des températures et la diminution des nuisances dues aux piqûres de *culicidae* (Article 5) confirmant plusieurs études qualitatives (Ahorlu *et al.* 1997, Binka and Adongo 1997, Frey *et al.* 2006, Korenromp *et al.* 2003). Lorsque la nuisance est principalement due aux anophèles, la baisse de cette nuisance est associée à une baisse du contact hôte-vecteur et donc du risque de transmission (Thomson *et al.* 1994). Ainsi, dans de telles situations, la baisse d'utilisation des moustiquaires induite par la baisse de la nuisance, ne se traduit pas forcément par une augmentation du risque de transmission. Dans la zone OKT, la nuisance n'était pas due aux vecteurs de *Plasmodium* et la transmission était maintenue en saison sèche via *An. funestus* (Article 5) dont (i) les densités étaient fortes durant cette saison (Chapitre 4 et Article 8) et (ii) la distribution variait peu d'une saison à l'autre (Article 7). Il y a donc un réel risque à l'abandon des moustiquaires en saison sèche qui pourrait jouer un rôle dans l'efficacité préventive des interventions.

Bien que la couverture ait été élevée, l'usage des carbamates en aspersion intradomiciliaire ou en imprégnation de bâches murales n'a pas eu les effets attendus (Djenontin *et al.* 2009). Les facteurs opérationnels qui ont été mis en cause sont la faible activité résiduelle des carbamates lors de leur pulvérisation sur les murs poreux des maisons en terre et l'insuffisante surface de mur couverte (1/3) par les BMI n'ayant probablement pas permis un impact suffisant sur la densité et la longévité des populations de vecteurs.

7.1.2 Diversité des vecteurs

Le rôle joué par *An. funestus* dans la transmission en saison sèche met en évidence l'importance de l'étude de la diversité et du rôle vectoriel des anophèles pour mieux comprendre l'impact des interventions de LAV.

Trois vecteurs majeurs de *Plasmodium* ont été capturés dans notre zone d'étude : *An. funestus*, *An. gambiae s.s.* forme moléculaire M et forme moléculaire S (Article 4). Ces vecteurs se caractérisaient par des niches comportementales différentes et notamment des taux d'exophagie différents (§ 4.2) : les deux formes moléculaires de *An. gambiae s.s.* n'étaient pas majoritairement endophages. Cette caractéristique comportementale intrinsèque des vecteurs est particulièrement problématique puisque les méthodes de LAV qui ont été déployée et

évaluées durant l'essai clinique (MI seules ou en combinaison avec BMI ou AI) sont basées sur d'anciennes descriptions de comportements majoritairement endophages des populations de vecteurs en Afrique sub-saharienne (Gillies and De Meillon 1968). Ces stratégies "résiduelles" placées dans les habitations ciblent donc les vecteurs endophages et/ou endophiles (The malERA Consultative Group on Vector Control 2011). Le comportement exophage observé à OKT chez *An. gambiae s.s.* pourrait donc considérablement limiter l'efficacité de telles méthodes de lutte et constituait un frein à l'utilisation des stratégies combinées dans les habitations (Govella and Ferguson 2012).

Un autre vecteur potentiel, *An. pharoensis*, a également été capturé dans les villages de l'étude et présentait des densités non négligeables (18% de la faune vectorielle ; Article 4). Le rôle de cet anophèle dans la transmission du *Plasmodium* a été montré ou soupçonné en Egypte, au Sénégal et au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.* 2006, Carrara *et al.* 1990, Dia *et al.* 2008, Morsy *et al.* 1995). Il est cependant considéré comme un vecteur secondaire puisque rarement majoritaire et présentant un comportement relativement opportuniste. Les espèces de vecteurs considérées comme secondaires sont néanmoins susceptibles de maintenir des niveaux résiduels de transmission en raison notamment de particularités écologiques et comportementales. La faible fraction de transmission qu'elles assurent peut maintenir les *Plasmodium* dans la population humaine (Beier *et al.* 1999). De plus, cette transmission initialement résiduelle peut prendre de l'ampleur à la suite de l'implémentation de mesure de LAV efficaces contre des vecteurs prioritaires qui laissent alors des niches écologiques libres pour des vecteurs initialement minoritaires (Bayoh *et al.* 2010, Gillies and Furlong 1964, Gillies and Smith 1960, Trung *et al.* 2005). Les vecteurs secondaires méritent donc une attention particulière (Ferguson *et al.* 2010) et le rôle vectoriel de *An. pharoensis*, ses niches écologiques et comportementales devront faire l'objet d'études plus poussées afin de comprendre son implication dans la transmission de *Plasmodium* dans la zone d'intervention.

La distribution géographique et la composition spécifique des populations des vecteurs confirmés (*An. funestus*, *An. gambiae s.s.* forme M et S) étaient complexes et présentaient une forte hétérogénéité locale (§ 4.2). L'analyse de la distribution spatiale de ces vecteurs majeurs a mis en évidence un assemblage d'espèces qui pourrait être capable d'exploiter une grande diversité de gîtes larvaires, de permanents à temporaires et des plus naturels (lacs, prairie aquatiques ou marécageuses) aux plus anthropiques (stockage d'eau de boisson) (Article 7 et § 5.4.2). L'affinité de *An. funestus* pour les milieux aquatiques permanents mise en évidence par

nos modèles et confirmant la littérature (Gillies and De Meillon 1968, Hamon 1955) explique pourquoi celui-ci est capable d'assurer la transmission pendant la saison sèche, période pendant laquelle les densités de *An. gambiae s.s.* diminuent. Son aire de distribution variait d'ailleurs peu d'une saison à l'autre tandis que celles des deux formes moléculaires d'*An. gambiae s.s.* étaient clairement dépendantes de la saison, particulièrement pour la forme S, inféodée aux milieux temporaires et donc dépendante des précipitations. Notons que nous avons observé une forte relation entre la présence des deux formes de *An. gambiae s.s.* et la présence ou la densité de gîtes larvaires domestiques (jarres...) faisant office de stockage d'eau dans le voisinage (où parfois à l'intérieur) des maisons. Ces gîtes que Hamon (1955) et Holstein (1954) décrivaient comme exceptionnels pourraient pourtant maintenir les populations de *An. gambiae s.s.* tout au long de l'année favorisant ainsi la continuité de la transmission. De plus, cette fraction « domestique » de la population de vecteur pourrait avoir un rôle majeur dans la transmission car étant situé à proximité des habitations (temps de vol plus courts, accès facilité aux hôtes, etc.). Des investigations doivent clairement être menées pour (i) étudier la composition spécifique des populations larvaires dans ce type de gîtes et (ii) mesurer l'intensité de cette production domestique et évaluer sa part dans la transmission.

Notons que les densités de vecteurs mesurées dans la zone d'étude (environ 1 piqûre de vecteur par homme et par nuit) étaient relativement faibles. Plusieurs études ont montré que le développement larvaire, la fécondité, le taux de survie et de croissance des vecteurs étaient inversement corrélés à la densité (Briegel 1990, Lyimo *et al.* 1992, Yang *et al.* 2008). Il est donc raisonnable de penser que les populations de vecteurs de la zone d'étude, malgré leur faible densité, étaient hautement compétitives comme l'attestent par ailleurs les taux de parturité élevés chez les anophèles femelles capturées (> 85%).

Cette diversité de vecteurs s'est traduite également par une diversité des réponses de ces populations face aux interventions. En premier lieu, les populations de *An. gambiae s.s.* ont fait l'objet d'un accroissement spectaculaire de la fréquence allélique de la mutation kdr. En 18 mois, cette fréquence est passée de 30% environ à plus de 80% dans l'ensemble des villages, quelle que soit l'intervention déployée. Ceci traduit la grande capacité d'adaptation de ces vecteurs et marque l'échec des combinaisons associant un carbamate en aspersion sur bâches ou sur des murs pour gérer la résistance au pyréthrianoïdes. La résistance a été précédemment mise en cause dans l'échec des interventions impliquant des MI ou des AI (Asidi *et al.* 2012, N'Guessan *et al.* 2007, Trape *et al.* 2011). De plus, plusieurs changements

dans le comportement des vecteurs sont également susceptibles de concourir à cet échec. Chez *An. funestus*, nous avons montré un changement drastique du comportement de piqûre qui s'est traduit dans les deux villages étudiés par un décalage des horaires d'activité après la mise en place des moustiquaires en couverture universelle (Article 8). Un an après l'implémentation de l'intervention, ces vecteurs ont présenté un pic d'activité à l'aube, horaire auquel les populations de ces régions rurales ont déjà commencé leur travail. Ils piquent également majoritairement à l'extérieur où les habitants ne bénéficient d'aucune protection. Par ailleurs, dans un des deux villages (Lokohouè), nous avons mis en évidence une activité diurne importante durant les premières heures du jour. Cette observation est inquiétante puisque les vecteurs ayant adopté ce comportement échappent totalement aux méthodes de LAV déployées. Notons que des investigations récentes réalisées dans ce village semblent montrer que ce comportement diurne est également présent chez *An. gambiae* s.s. (Duarte *et al.* 2012). Nous avons également observé que dans le second village (Tokoli), où le comportement diurne était marginal, le taux d'exophagie s'était considérablement accru (jusqu'à 68%) tandis qu'il restait stable (environ 45%) à Lokohouè. Au regard des observations faites par Lochouarn (1998) au Sénégal et Costantini (1999) au Burkina Faso où différentes formes chromosomiques d'*An. funestus* étaient associées à des comportements différents, nous pensons que la LAV a pu jouer un rôle dans la sélection de deux stratégies distinctes d'évitement chez *An. funestus*. Des études de cytogénétique devront être proposées pour vérifier cette hypothèse. Des investigations doivent également être menées pour mieux comprendre les mécanismes induisant les résistances comportementales et les processus de sélection de ces caractères.

Nos travaux ont visé également à préciser l'évaluation entomologique des méthodes de LAV mise en place dans le cadre de l'essai clinique. Nous avons pour cela intégré la LAV dans notre analyse de la distribution et de l'abondance des vecteurs avec une approche spécifique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une probable efficacité de la combinaison de MI en couverture universelle et de BMI de carbamate sur les populations de *An. funestus* sans pour autant déceler d'impact épidémiologique. La probabilité de présence et l'abondance des populations de *An. funestus* étaient en effet plus faibles dans les villages ayant reçu cette intervention par rapport aux villages ayant reçu les MI en couverture sélective. Pour les autres vecteurs, aucun effet réducteur des interventions n'a été mis en évidence. Ceci montre que l'effet des interventions a pu être différent en fonction des espèces de vecteur.

7.2 Propositions pour une lutte plus efficace

Nos travaux ont permis de mettre en évidence les limites des méthodes de LAV les plus largement déployées en Afrique pour lutter contre le paludisme. Ce travail doit servir à améliorer les stratégies de lutte actuelles et à définir les caractéristiques indispensables des futurs outils comme préconisé par le groupe consultatif du malERA sur la lutte anti-vectorielle (The malERA Consultative Group on Vector Control 2011).

7.2.1 L'amélioration des méthodes déployées

Nous avons relevé une baisse significative de l'utilisation de MI durant la saison sèche, en raison, notamment de l'accroissement des températures et de la baisse de la nuisance due aux piqûres de moustiques. Il existe plusieurs méthodes pour lutter contre les fortes températures mais elles sont en général onéreuses (climatisation, ventilateurs) et nécessitent une connexion au réseau électrique, deux limites sérieuses à leur emploi massif dans les zones rurales africaines. Nous savons également que la conception des moustiquaires peut considérablement influencer la température, l'humidité et le flux d'air (von Seidlein *et al.* 2012) et donc le confort à dormir dessous. Nous pensons donc que le développement de MI favorisant le flux d'air sous celles-ci permettrait d'en favoriser l'usage pendant les périodes de forte chaleur (en améliorant par exemple les types de matériaux utilisés, le tressage...etc.). Par ailleurs, l'usage des moustiquaires est conditionné par l'intensité du risque ressenti par ses utilisateurs dont une mesure est la perception que les gens se font de la densité de moustiques (Pulford *et al.* 2011). La densité de moustiques pouvant ne pas refléter la densité de vecteurs (Article 5), une sensibilisation sur ce point devrait être faite auprès des populations pour accroître l'utilisation des moustiquaires durant la saison sèche.

L'accroissement de la fréquence de la mutation kdr chez *An. gambiae s.s.* dans l'ensemble des villages, quelle que soit l'intervention déployée nous interpelle sur l'efficacité à long terme des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes pour réduire la densité et la longévité des populations de vecteurs. Aujourd'hui, seule cette famille d'insecticide est autorisée pour l'imprégnation des moustiquaires et il semble urgent de développer de nouvelles molécules pour les MI, acceptables du point de vue de leur toxicité pour les mammifères. Ceci permettraient d'utiliser des MI imprégnées de mélanges d'insecticides (Guillet *et al.* 2001, Hougard *et al.* 2003, Pannetier *et al.* 2008) ou en mosaïques à échelles

finies (IRAC 2011) dans le but de gérer les résistances aux insecticides. Récemment, de nouvelles technologies de moustiquaires sont apparues sur le marché combinant un pyréthrianoïde et un synergiste (pyperonyl butoxide, PBO) (Corbel *et al.* 2010), c'est-à-dire un inhibiteur des enzymes oxydases. D'autres générations de moustiquaires combinant un insecticide et un répulsif ou un insecticide et un régulateur de croissance sont également en cours de développement (Curtis *et al.* 1998, Pennetier *et al.* 2007, Pennetier *et al.* 2009). L'efficacité de ces nouvelles « technologies » insecticides sur la prévention du paludisme reste à ce jour inconnue et mériterait d'être évaluée dans des zones de résistance aux pyréthrianoïdes.

L'usage des carbamates en aspersion intra-domiciliaire ou en imprégnation de bâches murales n'a pas eu les effets attendus (Djenontin *et al.* 2009). La fréquence des aspersion et la surface couverte par les bâches ont été évoquées pour expliquer ce manque d'efficacité (Article 3). Il conviendrait donc de réévaluer ces outils en ajustant ces paramètres (fréquence des applications plus courtes, utilisation de formulations et/ou de bâches imprégnées de "longue durée"), dans la limite de leur acceptabilité par les populations humaines (Corbel and Henry 2011). Des formulations insecticides à longue durée sont également nécessaires pour palier le manque d'activité résiduelle des formulations actuelles sur les murs des habitations (Corbel and Henry 2011). Enfin des matériaux imprégnés d'insecticides directement fabriqués en usine pourraient représenter une alternative aux AI qui sont onéreuses, peu efficaces et qui nécessitent du personnel qualifié.

7.2.2 Des méthodes complémentaires pour une lutte intégrée

La caractérisation comportementale des populations de vecteurs avant la mise en place des interventions, et les effets observés des méthodes de luttés sur leurs comportements pointent clairement la nécessité de cibler les vecteurs piquant à l'extérieur des habitations et aux horaires pendant lesquels les populations ne sont pas protégées par les moustiquaires.

L'approche la plus simple consiste à cibler l'ensemble de la population de vecteur sans distinction de comportement, c'est ce que font les méthodes anti-larvaires qui en tuant les insectes à leurs stades aquatiques sont théoriquement aussi efficaces contre les vecteurs endophages et exophages (Govella and Ferguson 2012, Killeen *et al.* 2002). L'application de la lutte anti-larvaire devrait, selon l'OMS (2011), être strictement limitée aux zones où les

gîtes larvaires sont peu nombreux, stables et facilement identifiables. Ce sont, en effet, dans ces conditions que les méthodes anti-larvaires ont montré le meilleur rapport coût-efficacité en Afrique (Worrall and Fillinger 2011). Des études récentes en Afrique de l'Est (Fillinger *et al.* 2008, Fillinger and Lindsay 2006, Fillinger *et al.* 2009, Geissbuhler *et al.* 2009, Shililu *et al.* 2003) et au Bénin en zone urbaine (Kinde-Gazard and Baglo 2012) ont montré des réductions importantes des densités de vecteurs et/ou de l'incidence palustre suivant l'implémentation d'une lutte larvaire adaptée et ciblée. Les biolarvicides en particulier offrent d'intéressantes perspectives pour l'avenir en raison notamment de la diversité des micro-organismes susceptibles d'être utilisés (Abdul-Ghani *et al.* 2012) et donc du faible risque de développement de résistances chez les vecteurs. Dans la zone OKT, la diversité des vecteurs présents dont l'écologie, comme semblent le confirmer nos travaux, permet l'exploitation d'une large diversité de gîtes larvaires n'apparaît pas très favorable au déploiement d'une lutte anti-larvaire. En effet, les gîtes larvaires à *An. funestus*, qui assure une part importante de la transmission, sont difficiles à identifier et donc à traiter (Hamon 1955). En revanche, nous avons observé que les gîtes péri-domestiques favorisaient la présence des deux formes moléculaires de *An. gambiae s.s.* laissant supposer qu'une part non négligeable de la population de ces vecteurs pourrait être atteinte relativement facilement par une lutte larvaire sélective et complémentaire.

Parmi les techniques ciblant l'ensemble de la population de vecteurs (sans distinction de comportement), les méthodes de lutte génétique pourraient dans le futur constituer des outils intéressants pour le contrôle des vecteurs de *Plasmodium* (Benedict and Robinson 2003, Raghavendra *et al.* 2011). Cependant, au-delà des risques que comporte l'introduction de moustiques génétiquement modifiés dans l'environnement (Benedict *et al.* 2011, Knols *et al.* 2007), les lâchers de moustiques génétiquement modifiés (mâles stériles inclus) ne sont pour l'instant envisageables que dans des zones relativement isolées et où une seule espèce de vecteur est prédominante (Helinski *et al.* 2008, Munhenga *et al.* 2011, Raghavendra *et al.* 2011, Takken and Knols 2009).

D'autres outils ont fait l'objet de publications ces dernières années et pourraient constituer dans le futur des approches intéressantes pour cibler spécifiquement les vecteurs exophages ou présentant un comportement de piqûre "original". Parmi les méthodes pouvant être utilisées à de larges échelles, citons les répulsifs cutanés qui permettent de limiter le contact hôte-vecteur aux heures où les populations sont directement exposées à la piqûre. Si la

protection individuelle que confèrent les répulsifs corporels a été démontrée (Rowland *et al.* 2004, Rowland *et al.* 2004), il n'y a pas encore de preuves de leur efficacité à l'échelle communautaire¹⁹ (voir Carnevale *et al.* (2009) pour une revue sur le sujet). L'utilisation de "répulsifs spatiaux" à l'échelle communautaire qui vise à maintenir de larges espaces sans vecteurs (village), prévenant ainsi le contact hôte-vecteur, pourrait également être envisagée (Achee *et al.* 2012). Cette méthode contraindrait les vecteurs à se détourner vers des hôtes alternatifs (comme le bétail) à l'extérieur des villages et pourrait donc être associée avec l'application d'insecticides sur les hôtes alternatifs qui vise des vecteurs exophages, opportunistes ou soumis à une faible disponibilité en hôtes humains et qui peut montrer une certaine efficacité (Rowland *et al.* 2001).

L'accroissement de l'intérêt porté aux mécanismes de l'olfaction chez les vecteurs et l'accroissement des connaissances dans ce domaine pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de pièges à odeur ou le développement de techniques de confusion (Okumu *et al.* 2010, Ramirez *et al.* 2009, Takken and Knols 1999) qui, placés à l'extérieur pourraient également être envisagées pour cibler les vecteurs exophages. Il peut également être envisagé d'utiliser des appâts à odeur en extérieur pour infecter les vecteurs avec un agent entomo-pathogène (virus, champignons) pouvant tuer le vecteur ou sa descendance par transport passif jusqu'au gîtes larvaires (Abdul-Ghani *et al.* 2012, Thomas and Read 2007).

Les champignons entomo-pathogènes représentent une méthode alternative intéressante basée sur un le concept "*evolution proof*", c'est-à-dire limitant la sélection et l'évolution de mécanismes de résistance (Koella *et al.* 2009). En effet, l'effet pathogène de ces champignons est lent et ne tue les vecteurs qu'au-delà d'un certain âge, les vecteurs sensibles ont donc le temps de pondre leurs œufs et d'assurer une descendance sensible (Michalakis and Renaud 2009). En théorie, les techniques basées sur le principe "*evolution proof*" pourraient constituer des outils efficaces pour réduire la transmission des *Plasmodium* puisque l'effet létal du champignon interviendrait avant que les femelles adultes soient infectieuses (par exemple avant la réalisation du cycle extrinsèque du *Plasmodium*). Read *et al.* (2009) ont proposé d'exporter ce principe aux insecticides (*Late Acting Insecticides*) en développant des méthodes basées sur la diminution des dosages ou sur de nouvelles formulations qui ne seraient létales qu'au-delà d'un certain âge, en exploitant par exemple la diminution avec l'âge

¹⁹ Un essai contrôlé randomisé sur l'efficacité des répulsifs contre le paludisme est en cours au Cambodge (<http://www.malariaworld.org/blog/e-interview-prof-marc-coosemans-belgium>)

de la résistance et de la capacité de détoxification des vecteurs (Chen *et al.* 2008, Hodjati and Curtis 1999, Lines and Nassor 1991, Rowland and Hemingway 1987). L'utilisation de virus recombinants comme agents « synergisant » permettant d'augmenter la sensibilité des récepteurs cibles aux insecticides a également été proposée (Lapied *et al.* 2009). Cette technique pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des insecticides existants et de limiter les risques de résistances chez les populations de vecteurs. Cette technique offre également la possibilité de réduire drastiquement les doses d'insecticides utilisées.

Les méthodes alternatives sont nombreuses (Abdul-Ghani *et al.* 2012, Raghavendra *et al.* 2011, Ramirez *et al.* 2009, Takken and Knols 2009). Cependant, plusieurs aspects de la bio-écologie des vecteurs restent mal connus et peu étudiés pour la plupart des espèces vectrices : gîtes larvaires, essaimage et accouplement, sites de repos, comportement d'oviposition (Ferguson *et al.* 2010, The malERA Consultative Group on Vector Control 2011). Ces aspects de la bio-écologie des vecteurs pourraient constituer des cibles pour de nouvelles méthodes de LAV à développer.

La diminution de la probabilité de présence d'un vecteur et la diminution de ses densités sont potentiellement deux objectifs distincts de la LAV (éradication *versus* contrôle). L'étude séparée des déterminants de la présence et de la densité telle que nous l'avons réalisée (Article 6 et § 5.4.2) devrait être encouragée puisqu'elle pourrait permettre d'identifier des cibles distinctes pour la LAV (en lien avec l'écologie des vecteurs) répondant à chacun des objectifs d'éradication et de contrôle. Ces efforts de recherche sur la biologie et l'écologie des vecteurs devront certainement être réalisés si l'on souhaite atteindre les objectifs de l'OMS sur la réduction de la morbidité d'ici 2015 et d'éradication du paludisme en Afrique (WHO 2011).

7.2.3 Modélisation et concept de "diagnostic entomologique"

L'accroissement des résistances aux insecticides (Article 1), la multiplication des comportements d'évitement (Govella and Ferguson 2012)(Article 8), et l'absence de nouvelles classes d'insecticides soulignent la nécessité d'employer les outils de LAV basés sur des insecticides de manière non exclusive, mesurée et ciblée avec le souci de préserver leur efficacité. Ainsi, qu'il s'agisse de méthodes de LAV existantes ou de celles qui compléteront dans le futur l'arsenal des PNL, le choix et l'implémentation de certaines d'entre-elles devrait succéder à un diagnostic entomologique précis du territoire ciblé (Manguin 2009). Nos

travaux ont montré que la diversité spécifique des populations de vecteurs était à l'origine de nombreux obstacles à l'efficacité de la LAV. En effet, les différentes espèces possèdent des caractéristiques intrinsèques qui les rendent plus ou moins sensibles à la lutte et sont capables de développer des stratégies différentes pour en réchapper. En conséquence, le diagnostic entomologique devrait permettre de savoir, en premier lieu, quelles sont les espèces vectrices présentes et quelle est leur distribution spatio-temporelle. Comme nos travaux l'ont montré, la modélisation du contact hôte-vecteur comme outil de prédiction spatio-temporelle peut y répondre. L'échelle pertinente de ce diagnostic semble être le village puisque nous avons vu que la diversité des vecteurs pouvait beaucoup varier à une échelle micro-géographique (§ 4.2).

Puisque les différentes espèces vectrices possèdent un certain nombre de caractéristiques spécifiques, notamment du point de vue des mécanismes de résistance qu'elles sont susceptibles de posséder ou de développer, des cartes de distribution des espèces pourraient constituer des indicateurs pertinents de l'efficacité potentielle des méthodes de LAV et des risques d'échec de celles-ci en un lieu donné. Malheureusement, en raison de son statut de vecteur majeur en Afrique et de la relative facilité à l'élever en insectarium, *An. gambiae* s.s. est l'objet de toutes les attentions pour l'étude de la résistance et du comportement. Des études doivent donc être poursuivies sur les autres espèces de vecteurs pour garantir l'efficacité des méthodes de LAV dans des contextes environnementaux changeant.

Le but ultime de la LAV est d'interrompre la transmission du *Plasmodium* et les indicateurs entomologiques de la transmission (la taux d'inoculation entomologique h et la capacité vectorielle C) sont donc les indicateurs théoriquement les plus pertinents pour le choix et l'évaluation des méthodes de LAV (The malERA Consultative Group on Vector Control 2011). Ces indicateurs sont basés sur les densités de vecteurs (Garrett-Jones 1964, Macdonald 1957, Ross 1911) et un modèle visant à prédire dans l'espace et dans le temps ces densités tel que celui développé dans nos travaux pourrait être intégré dans un modèle mathématique de la transmission. Cependant, d'autres paramètres entomologiques, qui doivent être estimés, interviennent dans le calcul de ces indicateurs (s pour le calcul de h ; a et p pour

le calcul de C)²⁰. Les variations spatio-temporelles de ces paramètres sont méconnues et complexes et diffèrent selon les espèces vectrices. Par exemple, s peut être estimé en connaissant la proportion d'hôtes humains infectieux (prévalence) et la compétence vectorielle du vecteur étudié (Killeen *et al.* 2000). Cependant, considérant la variabilité locale de la prévalence du paludisme (Damien *et al.* 2011) et la résolution à laquelle cette donnée est disponible (districts sanitaires) et, considérant le peu de connaissance sur la compétence vectorielle des différentes espèces et formes sous-spécifiques de vecteurs (Cohuet *et al.* 2010), l'estimation précise de s apparaît difficile. Le taux de survie p influence considérablement la valeur de C (Cf. § 1.4.2). Or, p peut-être estimé indirectement connaissant s (Graves *et al.* 1990) qui, nous l'avons vu, ne peut être estimé précisément... Dans l'état actuel des connaissances et étant donné le cumul d'imprécisions entachant le calcul des indicateurs de transmission, ces derniers ne peuvent être utilisés pour un diagnostic entomologique à haute résolution spatiale tel que nous le proposons dans ces travaux. Le corolaire de cette observation est que des investigations visant à améliorer l'estimation des paramètres entrant dans le calcul de h et C sont nécessaires à l'utilisation pertinente de ces indicateurs de transmission.

Dans le contexte africain d'accroissement généralisé des différents mécanismes de résistance dans les populations de vecteurs et dans des contextes épidémiologiques faisant intervenir plusieurs espèces, des outils doivent être mis à disposition des PNLP (basés sur les SIG par exemple) pour leur permettre de définir les méthodes de LAV susceptibles d'obtenir la meilleure efficacité. Des cartographies nationales à haute résolution de la distribution et de la densité des vecteurs associée à une meilleure connaissance des mécanismes de résistance et du comportement des différentes espèces de vecteurs, constitueraient des outils prospectifs puissants pour l'élaboration de diagnostics entomologiques et pour le choix des méthodes de LAV à implémenter.

Pour conclure, notons que même en améliorant considérablement l'efficacité des méthodes de lutte, leur seul usage ne permettra probablement pas d'atteindre les seuils requis pour interrompre durablement la transmission (The malERA Consultative Group on Vector Control 2011). Ainsi, la lutte contre le paludisme ne peut reposer uniquement sur la lutte anti-vectorielle. En attendant la mise au point d'un vaccin efficace contre le paludisme (The

²⁰ s est l'indice sporozoïtique, h le TIE, a la préférence trophique, p le taux de survie et C la capacité vectorielle. Cf. § 1.4.2.

malERA Consultative Group on Vaccines 2011), des progrès en matière de diagnostique et de prise en charge des malades doivent également être réalisés pour que la lutte intégrée contre le paludisme permette à moyen terme d'endiguer le fléau sur le continent africain.

Références bibliographiques

1. ABDUL-GHANI R., AL-MEKHLAFI A. M., ALABSI M. S. Microbial control of malaria: biological warfare against the parasite and its vector. *Acta Trop*, 2012, 121 (2), 71-84.
2. ACHEE N. L., BANGS M. J., FARLOW R., KILLEEN G. F., LINDSAY S., LOGAN J. G., MOORE S. J., ROWLAND M., SWEENEY K., TORR S. J., ZWIEBEL L. J., GRIECO J. P. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. *Malar J*, 2012, 11, 164.
3. AGEEP T. B., COX J., HASSAN M. M., KNOLS B. G., BENEDICT M. Q., MALCOLM C. A., BABIKER A., EL SAYED B. B. Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in northern Sudan: influence of environmental factors and implications for vector control. *Malar J*, 2009, 8, 123.
4. AHORLU C. K., DUNYO S. K., AFARI E. A., KORAM K. A., NKRUMAH F. K. Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control. *Trop Med Int Health*, 1997, 2 (5), 488-99.
5. AITKIN MURRAY. A general maximum likelihood analysis of overdispersion in generalized linear models. In: Stat Comput. *Statistics and Computing*, 1996, 6 (3), 251-262.
6. AKOGBETO M. C., PADONOU G. G., GBENOU D., IRISH S., YADOLETON A. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malar J*, 2010, 9, 204.
7. AKOGBETO M., PADONOU G. G., BANKOLE H. S., GAZARD D. K., GBEDJISSI G. L. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 85 (4), 586-93.
8. ALPHEY L., BEARD C. B., BILLINGSLEY P., COETZEE M., CRISANTI A., CURTIS C., EGGLESTON P., GODFRAY C., HEMINGWAY J., JACOBS-LORENA M., JAMES A. A., KAFATOS F. C., MUKWAYA L. G., PATON M., POWELL J. R., SCHNEIDER W., SCOTT T. W., SINA B., SINDEN R., SINKINS S., SPIELMAN A., TOURE Y., COLLINS F. H. Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science*, 2002, 298 (5591), 119-21.
9. ALPHEY L., BENEDICT M., BELLINI R., CLARK G. G., DAME D. A., SERVICE M. W., DOBSON S. L. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10 (3), 295-311.
10. ANDERSON J.R. *A land use and land cover classification system for use with remote sensor data*. US Government Printing Office, 1976.
11. ANOSIKE J. C., NWOKE B. E., OKERE A. N., OKU E. E., ASOR J. E., EMMY-EGBE I. O., ADIMIKE D. A. Epidemiology of tree-hole breeding mosquitoes in the tropical rainforest of Imo State, south-east Nigeria. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14 (1), 31-8.
12. ANTONIO-NKONDJIO C., KERAH C. H., SIMARD F., AWONO-AMBENE P., CHOUAIBOU M., TCHUINKAM T., FONTENILLE D. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *J Med Entomol*, 2006, 43 (6), 1215-21.
13. ANTONIO-NKONDJIO CHRISTOPHE, ATANGANA JEAN, NDO CYRILLE, AWONO-AMBENE PARFAIT, FONDJO ETIENNE, FONTENILLE DIDIER, SIMARD FRÉDÉRIC. Malaria transmission and rice cultivation in Lagdo, northern Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 102 (4), 352-359.
14. 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 (7), 1101-6.
15. AUBREVILLE A. Accord à Yangambi sur la nomenclature des types africains de végétation. *Bois et forêts des tropiques*, 1957, 51, 23-27.
16. AWONO-AMBENE H. P., KENGNE P., SIMARD F., ANTONIO-NKONDJIO C., FONTENILLE D. Description and bionomics of *Anopheles (Cellia) ovengensis* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *J Med Entomol*, 2004, 41 (4), 561-8.
17. BAILEY S. F., BAERG D. C. The flight habits of *Anopheles freeborni* aitken. *Proc Pap Annu Conf Calif Mosq Control Assoc*, 1967, 35, 55-69.
18. BAYOH M. N., LINDSAY S. W. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*, 2003, 93 (5), 375-81.

19. BAYOH M. N., LINDSAY S. W. Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. *Med Vet Entomol*, 2004, 18 (2), 174-9.
20. BAYOH M. N., MATHIAS D. K., ODIERE M. R., MUTUKU F. M., KAMAU L., GIMNIG J. E., VULULE J. M., HAWLEY W. A., HAMEL M. J., WALKER E. D. *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. *Malar J*, 2010, 9, 62.
21. BEIER J. C., KILLEEN G. F., GITHURE J. I. Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61 (1), 109-13.
22. BENEDICT M. Q., JAMES A. A., COLLINS F. H. Safety of genetically modified mosquitoes. *JAMA*, 2011, 305 (20), 2069-70; author reply 2070.
23. BENEDICT M. Q., ROBINSON A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol*, 2003, 19 (8), 349-55.
24. BENZ U.C., HOFMANN P., WILLHAUCK G., LINGENFELDER I., HEYNEN M. Multi-resolution, object-oriented fuzzy analysis of remote sensing data for GIS-ready information. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2004, 58 (3â€“4), 239-258.
25. BIDLINGMAYER W. L. The Effect of Moonlight on the Flight Activity of Mosquitoes. *Ecology*, 1964, 45 (1), 87-94.
26. BINKA F. N., ADONGO P. Acceptability and use of insecticide impregnated bednets in northern Ghana. *Trop Med Int Health*, 1997, 2 (5), 499-507.
27. BIO-BANGANA A.S., DJENONTIN A. , MOIROUX N., OSSE R., CHABI J., KOUDENOUKPO S., BOKO M., CHANDRE F. , AKOGBETO M.C. , CORBEL V. . *Characterization of mosquito fauna in Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito Sanitary Zone in Benin (West Africa) [MIM16671490]*. In: 2009, 5th MIM Pan-African Malaria Conference, Nairobi, Kenya.
28. BIRLEY MARTIN H. *Guidelines for forecasting the vector-borne disease implications of water resources development* 2nd. Geneva: World Health Organization, 1991, 2(PEEM guidelines series).
29. BOCKARIE M. J., DAGORO H. Are insecticide-treated bednets more protective against *Plasmodium falciparum* than *Plasmodium vivax*-infected mosquitoes? *Malar J*, 2006, 5, 15.
30. BOGH C., CLARKE S. E., JAWARA M., THOMAS C. J., LINDSAY S. W. Localized breeding of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) along the River Gambia, West Africa. *Bull Entomol Res*, 2003, 93 (4), 279-87.
31. BOUDET G., BAEYENS F. Une méthode d'étude et de cartographie des pâturages tropicaux. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 1963, 16 (2), 191-219.
32. BRIEGEL H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J Med Entomol*, 1990, 27 (5), 839-50.
33. BROOKE B. D., KLOKE G., HUNT R. H., KOEKEMOER L. L., TEMU E. A., TAYLOR M. E., SMALL G., HEMINGWAY J., COETZEE M. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 2001, 91 (4), 265-272.
34. BRUNHES J., LE GOFF G., GEOFFROY B. Afro-tropical anopheline mosquitoes : 3. Description of three new species : *Anopheles carnevalei* sp. nov., *An. hervyi* sp. nov., and *An. dualaensis* sp. nov., and resurrection of *An. rageai* Mattingly and Adam. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1999, 15 (4), 552-558.
35. BRUNHES J., LE GOFF G., GEOFFROY B. Anophèles afro-tropicaux : 1. Descriptions d'espèces nouvelles et changements de statuts taxonomiques (Diptera : Culicidae). *Annales de la Société Entomologique*, 1997, 33 (2), 173-183.
36. BUGORO H., HII J., RUSSELL T. L., COOPER R. D., CHAN B. K., IRO'OF A C., BUTAFA C., APAIRAMO A., BOBOGARE A., CHEN C. C. Influence of environmental factors on the abundance of *Anopheles farauti* larvae in large brackish water streams in Northern Guadalcanal, Solomon Islands. *Malar J*, 2011, 10, 262.
37. CARNEVALE P., ROBERT V., MANGUIN S., CORBEL V., FONTENILLE D., GARROS C., ROGIER C., ROUX J. *Les anophèles : biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. Marseille: IRD, 2009, 391 p. (Didactiques).
38. CARRARA G. C., PETRARCA V., NIANG M., COLUZZI M. *Anopheles pharoensis* and transmission of *Plasmodium falciparum* in the Senegal River delta, West Africa. *Med Vet Entomol*, 1990, 4 (4), 421-4.
39. CATOR L. J., LYNCH P. A., READ A. F., THOMAS M. B. Do malaria parasites manipulate mosquitoes? *Trends in Parasitology*, 2012, 28 (11), 466-470.

40. CHANDRE F., DABIRE R. K., HOUGARD J. M., DJOGBENOU L. S., IRISH S. R., ROWLAND M., N'GUESSAN R. Field efficacy of pyrethroid treated plastic sheeting (durable lining) in combination with long lasting insecticidal nets against malaria vectors. *Parasit Vectors*, 2010, 3 (1), 65.
41. CHARLWOOD J. D., PARU R., DAGORO H., LAGOG M. Influence of moonlight and gonotrophic age on biting activity of *Anopheles farauti* (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. *J Med Entomol*, 1986, 23 (2), 132-5.
42. CHEN H., GITHEKO A. K., GITHURE J. I., MUTUNGA J., ZHOU G., YAN G. Monoxygenase Levels and Knockdown Resistance (kdr) Allele Frequencies in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 2008, 45, 242-250.
43. CHITNIS N., SCHAPIRA A., SMITH T., STEKETEE R. Comparing the effectiveness of malaria vector-control interventions through a mathematical model. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 83 (2), 230-40.
44. CHRISTIE M. A critical review of the role of the immature stages of anopheline mosquitoes in the regulation of adult numbers, with particular reference to *Anopheles gambiae*. *Trop Dis Bull*, 1959, 56 (4), 385-99.
45. CLARKE S. E., BOGH C., BROWN R. C., PINDER M., WALRAVEN G. E., LINDSAY S. W. Do untreated bednets protect against malaria? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001, 95 (5), 457-62.
46. CLARKE S. E., BOGH C., BROWN R. C., WALRAVEN G. E., THOMAS C. J., LINDSAY S. W. Risk of malaria attacks in Gambian children is greater away from malaria vector breeding sites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002, 96 (5), 499-506.
47. COETZEE M., FONTENILLE D. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34 (7), 599-605.
48. COFFINET T., ROGIER C., PAGES F. [Evaluation of the anopheline mosquito aggressivity and of malaria transmission risk: methods used in French Army]. *Med Trop (Mars)*, 2009, 69 (2), 109-22 Evaluation de l'agressivite des anopheles et du risque de transmission du paludisme: methodes utilisees dans les Armees francaises.
49. COHUET A., HARRIS C., ROBERT V., FONTENILLE D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol*, 2010.
50. COLDITZ R.R., CONRAD C., WEHRMANN T., SCHMIDT M., DECH S. TiSeG: A flexible software tool for time-series generation of MODIS data utilizing the quality assessment science data set. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 2008, 46 (10), 3296-3308.
51. COLUZZI M., PETRARCA V., DI DECO M. A. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bollettino di zoologia*, 1985, 52 (1-2), 45-63.
52. COLUZZI M., SABATINI A., DELLA TORRE A., DI DECO M. A., PETRARCA V. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 2002, 298 (5597), 1415-8.
53. COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V., DI DECO M. A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1979, 73 (5), 483-97.
54. CORBEL V., CHABI J., DABIRE R. K., ETANG J., NWANE P., PIGEON O., AKOGBETO M., HOUGARD J. M. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. *Malar J*, 2010, 9, 113.
55. CORBEL V., HENRY M. C. Prevention and control of malaria and sleeping sickness in Africa: where are we and where are we going? *Parasit Vectors*, 2011, 4, 37.
56. CORBEL V., N'GUESSAN R., BRENGUES C., CHANDRE F., DJOGBENOU L., MARTIN T., AKOGBETO M., HOUGARD J. M., ROWLAND M. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*, 2007, 101 (3), 207-16.
57. COSTANTINI C., AYALA D., GUELBEOGO W. M., POMBI M., SOME C. Y., BASSOLE I. H., OSE K., FOTSING J. M., SAGNON N., FONTENILLE D., BESANSKY N. J., SIMARD F. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol*, 2009, 9, 16.
58. COSTANTINI C., LI S-G., DELLA TORRE A., SAGNON N., COLUZZI M., TAYLOR C. E. Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. *Medical and Veterinary Entomology*, 1996, 10 (3), 203-219.
59. COSTANTINI C., SAGNON N., ILBOUDO-SANOGO E., COLUZZI M., BOCCOLINI D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*, 1999, 41 (4), 595-611.

60. COSTANTINI C., SAGNON N.F., SANOGO E., MERZAGORA L., COLUZZI M. Relationship to human biting collections and influence of light and bednet in CDC light-trap catches of West African malaria vectors. *Bulletin of Entomological Research*, 1998, 88 (05), 503-511.
61. COTTRELL G., KOUWAYE B., PIERRAT C., LE PORT A., BOURAIMA A., FONTON N., HOUNKONNOU M. N., MASSOUBODJI A., CORBEL V., GARCIA A. Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in Benin and its implications for cohort study. *PLoS One*, 2012, 7 (1), e28812.
62. CURRAN P. J., ATKINSON P. M., FOODY G. M., MILTON E. J. Linking remote sensing, land cover and disease. *Adv Parasitol*, 2000, 47, 37-80.
63. CURTIS C. F., MILLER J. E., HODJATI M. H., KOLACZINSKI J. H., KASUMBA I. Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria vectors? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, 353 (1376), 1769-75.
64. DAMBACH P., SIE A., LACAUX J. P., VIGNOLLES C., MACHAULT V., SAUERBORN R. Using high spatial resolution remote sensing for risk mapping of malaria occurrence in the Nouna district, Burkina Faso. *Glob Health Action*, 2009, 2.
65. DAMIEN G., DJENONTIN A., ROGIER C., CORBEL V., BANGANA S. B., CHANDRE F., AKOGBETO M., KINDE-GAZARD D., MASSOUBODJI A., HENRY M-C. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malaria J*, 2011, 9 (1), 380.
66. DARRIET FRÉDÉRIC. *Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides*. Paris: IRD, 2007, 116 p. (Didactiques).
67. DARRIET FRÉDÉRIC, ROBERT VINCENT, THO VIEN N., CARNEVALE PIERRE. *Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées*. Bobo-Dioulasso: OCCGE, 1984, 35 p. multigr.
68. DAS M. K., PRASAD R. N. Evaluation of mosquito fish *Gambusia affinis* in the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian J Malariol*, 1991, 28 (3), 171-7.
69. DAVIES T. G., FIELD L. M., USHERWOOD P. N., WILLIAMSON M. S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 2007, 59 (3), 151-62.
70. DE MEILLON B., GRAB B., SEBASTIAN A. Evaluation of *Wuchereria bancrofti* infection in *Culex pipiens fatigans* in Rangoon, Burma. *Bull. Wld Hlth Organ*, 1967, 36 (1), 91-100.
71. DE MEILLON B. The Control of Malaria in South Africa by Measures directed against the Adult Mosquitoes in Habitations. *Quarterly Bulletin of the Health Organization of the League of Nations*, 1936, 5, 134-137.
72. DELLA TORRE A., FANELLO C., AKOGBETO M., DOSSOU-YOVO J., FAVIA G., PETRARCA V., COLUZZI M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol*, 2001, 10 (1), 9-18.
73. DETINOVA T. S. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monogr Ser World Health Organ*, 1962, 47, 13-191.
74. DIA I., KONATE L., SAMB B., SARR J. B., DIOP A., ROGERIE F., FAYE M., RIVEAU G., REMOUE F., DIALLO M., FONTENILLE D. Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Trop*, 2008, 105 (2), 145-53.
75. DIA I., LOCHOUARN L., BOCCOLINI D., COSTANTINI C., FONTENILLE D. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite*, 2000, 7 (3), 179-84.
76. DIABATE A., BALDET T., CHANDRE F., AKOGBETO M., GUIGUEMDE T. R., DARRIET F., BRENGUES C., GUILLET P., HEMINGWAY J., SMALL G. J., HOUGARD J. M. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 67 (6), 617-22.
77. DIABATE A., CHANDRE F., ROWLAND M., N'GUESSAN R., DUCHON S., DABIRE K. R., HOUGARD J. M. The indoor use of plastic sheeting pre-impregnated with insecticide for control of malaria vectors. *Trop Med Int Health*, 2006, 11 (5), 597-603.
78. DIABATE A., DABIRE R. K., HEIDENBERGER K., CRAWFORD J., LAMP W. O., CULLER L. E., LEHMANN T. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evol Biol*, 2008, 8, 5.
79. DIABATE A., DABIRE R. K., KIM E. H., DALTON R., MILLOGO N., BALDET T., SIMARD F., GIMNIG J. E., HAWLEY W. A., LEHMANN T. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae*

- (Diptera: Culicidae) in different habitats: a translocation experiment. *J Med Entomol*, 2005, 42 (4), 548-53.
80. DJEGBE I., BOUSSARI O., SIDICK A., MARTIN T., RANSON H., CHANDRE F., AKOGBETO M., CORBEL V. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malaria Journal*, 2011, 10 (1), 261.
 81. DJENONTIN A., CHABI J., BALDET T., IRISH S., PENNETIER C., HOUGARD J. M., CORBEL V., AKOGBETO M., CHANDRE F. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J*, 2009, 8, 233.
 82. DJENONTIN A., CHANDRE F., DABIRE K. R., CHABI J., N'GUESSAN R., BALDET T., AKOGBETO M., CORBEL V. Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long-lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 83 (2), 266-70.
 83. DJOGBENOU L., PASTEUR N., AKOGBETO M., WEILL M., CHANDRE F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol*, 2011, 25 (3), 256-67.
 84. DJOGBENOU L., PASTEUR N., BIO-BANGANA S., BALDET T., IRISH S. R., AKOGBETO 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.
 85. DJOUAKA R. F., BAKARE A. A., COULIBALY O. N., AKOGBETO M. C., RANSON H., HEMINGWAY J., STRODE C. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*, 2008, 9, 538.
 86. DRAME P. M., POINSIGNON A., BESNARD P., CORNELIE S., LE MIRE J., TOTO J. C., FOUMANE V., DOS-SANTOS M. A., SEMBENE M., FORTES F., SIMONDON F., CARNEVALE P., REMOUE F. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One*, 2010, 5 (12), e15596.
 87. DUARTE E.H., DIOP M.M., ZOGO B., SOUKOU K.B.G., SIDICK A., MOIROUX N., PENNETIER C. *Differences in behavioural preferences between the two major malaria vectors Anopheles gambiae and Anopheles funestus under long-lasting net universal coverage pressure in southern Benin*. In: 2012, 18th international conference of the European Society for Vector Ecology Montpellier, France.
 88. DUCHON S., HERVE JP, HOUGARD JM. WHOPES Phase I study on PermaNet 2. *Unpublished report to the WHO Pesticide Evaluation Scheme*, 2003.
 89. DURRHEIM D. N., GOVERE J. M. Malaria outbreak control in an African village by community application of 'deet' mosquito repellent to ankles and feet. *Med Vet Entomol*, 2002, 16 (1), 112-5.
 90. DWYER J., WEISS J., SCHMIDT G., LOGAR T., BURREL R., STUBBENDIECK G., RISHEA J., MISTEREK B., JIA S., HEUSER K. *The MODIS reprojection tool*. In: 2001, American Geophysical Union Spring Meeting.
 91. DYE C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annu Rev Entomol*, 1992, 37, 1-19.
 92. EDILLO F. E., TOURE Y. T., LANZARO G. C., DOLO G., TAYLOR C. E. Spatial and habitat distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani village, Mali. *J Med Entomol*, 2002, 39 (1), 70-7.
 93. EDWARDS F.W. *Mosquitoes of the Ethiopian Region. III.-Culicine Adults and Pupae*. London: Brit. Mus. (N. H.), 1941.
 94. ELISSA N., MOUCHET J., RIVIERE F., MEUNIER J. Y., YAO K. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Cote d'Ivoire. *Ann Soc Belg Med Trop*, 1993, 73 (4), 291-4.
 95. FAVIA G., LANFRANCOTTI A., SPANOS L., SIDEN-KIAMOS I., LOUIS C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 2001, 10 (1), 19-23.
 96. FEACHEM RICHARD, SABOT OLIVER. A new global malaria eradication strategy. *The Lancet*, 2008, 371 (9624), 1633-1635.
 97. FERGUSON H. M., DORNHAUS A., BEECHE A., BORGEMEISTER C., GOTTLIEB M., MULLA M. S., GIMNIG J. E., FISH D., KILLEEN G. F. Ecology: a prerequisite for malaria elimination and eradication. *PLoS Med*, 2010, 7 (8), e1000303.
 98. FETTENE M., HUNT R. H., COETZEE M., TESSEMA F. Behaviour of *Anopheles arabiensis* and *An. Quadriannulatus* sp. B mosquitoes and malaria transmission in southwestern Ethiopia. *African Entomology*, 2004, 12 (1), 83-87.

99. FILLINGER U., KANNADY K., WILLIAM G., VANEK M. J., DONGUS S., NYIKA D., GEISSBUHLER Y., CHAKI P. P., GOVELLA N. J., MATHENGE E. M., SINGER B. H., MSHINDA H., LINDSAY S. W., TANNER M., MTASIWA D., DE CASTRO M. C., KILLEEN G. F. A tool box for operational mosquito larval control: preliminary results and early lessons from the Urban Malaria Control Programme in Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J*, 2008, 7, 20.
100. FILLINGER U., LINDSAY S. W. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Tropical Medicine & International Health*, 2006, 11 (11), 1629-1642.
101. FILLINGER U., NDENGA B., GITHEKO A., LINDSAY S. W. Integrated malaria vector control with microbial larvicides and insecticide-treated nets in western Kenya: a controlled trial. *Bull World Health Organ*, 2009, 87 (9), 655-65.
102. FLETCHER WILLIAM. QUININE RESISTANT MALARIA. *The Lancet*, 1918, 192 (4961), 432-433.
103. FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIAGNE N., SOKHNA C., LEMASSON J. J., DIATTA M., KONATE L., FAYE F., ROGIER C., TRAPE J. F. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56 (3), 247-53.
104. FONTENILLE D., LOCHOUARN L., DIATTA M., SOKHNA C., DIA I., DIAGNE N., LEMASSON J. J., BA K., TALL A., ROGIER C., TRAPE J. F. Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, 91 (6), 647-52.
105. FONTENILLE DIDIER, LAGNEAU C., LECOLLINET S., LEFAIT ROBIN RÉGINE, SETBON M., TIREL B., YEBAKIMA A. *La lutte antivectorielle en France = Disease vector control in France*. Marseille: IRD, 2009, 533 p. (Expertise Collégiale).
106. FREY CLAUDIA, TRAORE CORNEILLE, DE ALLEGRI MANUELA, KOUYATE BOCAR, MULLER OLAF. Compliance of young children with ITN protection in rural Burkina Faso. *Malaria J*, 2006, 5 (1), 70.
107. GADIAGA L., MACHAULT V., PAGES F., GAYE A., JARJAVAL F., GODEFROY L., Cisse B., LACAUX J. P., SOKHNA C., TRAPE J. F., ROGIER C. Conditions of malaria transmission in Dakar from 2007 to 2010. *Malar J*, 2011, 10, 312.
108. GAHAN J.B., LINDQUIST A.W. DDT residual sprays applied in buildings to control *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal of Economic Entomology*, 1945, 38 (2), 223-230.
109. GALARDO A. K. R., ZIMMERMAN R. H., LOUNIBOS L. P., YOUNG L. J., GALARDO C. D., ARRUDA M., D'ALMEIDA COUTO A. A. R. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria along the Matapí River, Amapá, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 2009, 23 (4), 335-349.
110. GARRET-JONES C, SHIDRAWI GR. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. *WHO Bulletin*, 1969, 40, 531-545.
111. GARRETT-JONES C. The possibility of active long-distance migrations by *Anopheles pharoensis* Theobald. *Bull World Health Organ*, 1962, 27, 299-302.
112. GARRETT-JONES C. Prognosis for Interruption of Malaria Transmission Through Assessment of the Mosquito's Vectorial Capacity. *Nature*, 1964, 204 (4964), 1173-1175.
113. GEISSBUHLER Y., CHAKI P., EMIDI B., GOVELLA N. J., SHIRIMA R., MAYAGAYA V., MTASIWA D., MSHINDA H., FILLINGER U., LINDSAY S. W., KANNADY K., DE CASTRO M. C., TANNER M., KILLEEN G. F. Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J*, 2007, 6, 126.
114. GEISSBUHLER Y., KANNADY K., CHAKI P. P., EMIDI B., GOVELLA N. J., MAYAGAYA V., KIAMA M., MTASIWA D., MSHINDA H., LINDSAY S. W., TANNER M., FILLINGER U., DE CASTRO M. C., KILLEEN G. F. Microbial larvicide application by a large-scale, community-based program reduces malaria infection prevalence in urban Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS One*, 2009, 4 (3), e5107.
115. GEORGHIOU G.P. Insecticide resistance and prospects for its management. *Residue reviews*, 1980, 76, 131-145.
116. GEORGHIOU GEORGE P., TAYLOR CHARLES E. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. *Journal of Economic Entomology*, 1977, 70 (5), 653-658.
117. GHOSH S. K., TIWARI S. N., SATHYANARAYAN T. S., SAMPATH T. R. R., SHARMA V. P., NANDA NUTAN, JOSHI HEMA, ADAK T., SUBBARAO S. K. Larvivoracious fish in wells target the malaria vector sibling species of the *Anopheles culicifacies* complex in villages in Karnataka, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 99 (2), 101-105.

118. GILLIES M. T. Studies on the dispersion and survival of *Anopheles gambiae* Giles in East Africa, by means of marking and release experiments. *Bulletin of Entomological Research*, 1961, 52 (01), 99-127.
119. GILLIES M. T., FURLONG M. An investigation into the behaviour of *Anopheles parensis* Gillies at Malindi on the Kenya coast. *Bulletin of Entomological Research*, 1964, 55 (01), 1-16.
120. GILLIES M. T., SMITH A. The effect of a residual house-spraying campaign in East Africa on species balance in the *Anopheles funestus* group. The replacement of *A. funestus* Giles by *A. rivulorum* Leeson. *Bulletin of Entomological Research*, 1960, 51 (02), 243-252.
121. GILLIES MT, COETZEE M. *A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region)*. Johannesburg, South Africa: South African Institute for Medical Research, 1987, 143 p.
122. GILLIES MT, DE MEILLON B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Publication of the South Afr Inst Med Res*, 1968, (54), 343.
123. GIMNIG J. E., OMBOK M., KAMAU L., HAWLEY W. A. Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in Western Kenya. *J Med Entomol*, 2001, 38 (2), 282-8.
124. GIMONNEAU G., BOUYER J., MORAND S., BESANSKY N. J., DIABATE A., SIMARD F. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol*, 2010, 21 (5), 1087-1092.
125. GIMONNEAU G., POMBI M., CHOISY M., MORAND S., DABIRE R. K., SIMARD F. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol*, 2011, 26 (1), 9-17.
126. GIMONNEAU G., POMBI M., DABIRE R. K., DIABATE A., MORAND S., SIMARD F. Behavioural responses of *Anopheles gambiae sensu stricto* M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit Vectors*, 2012, 5, 65.
127. GOMA L. K. H. Experimental Breeding of *Anopheles gambiae* Giles in Papyrus Swamps. *Nature*, 1960, 187 (4743), 1137-1138.
128. GORGAS WC. Malaria prevention on the Isthmus of Panama. In: ROSS R. *The Prevention of Malaria*. 1910, 346-352.
129. GOVELLA N. J., FERGUSON H. Why Use of Interventions Targeting Outdoor Biting Mosquitoes will be Necessary to Achieve Malaria Elimination. *Front Physiol*, 2012, 3, 199.
130. GRAHAM K., MOHAMMAD N., REHMAN H., NAZARI A., AHMAD M., KAMAL M., SKOVMAND O., GUILLET P., ALLAN R., ZAIM M., YATES A., LINES J., ROWLAND M. Insecticide-treated plastic tarpaulins for control of malaria vectors in refugee camps. *Med Vet Entomol*, 2002, 16 (4), 404-8.
131. GRAVES P. M., BURKOT T. R., SAUL A. J., HAYES R. J., CARTER R. Estimation of Anopheline Survival Rate, Vectorial Capacity and Mosquito Infection Probability from Malaria Vector Infection Rates in Villages Near Madang, Papua New Guinea. *Journal of Applied Ecology*, 1990, 27 (1), 134-147.
132. GUILLAUMET JL, KOECHLIN J. Contribution à la définition des types de végétation dans les régions tropicales (exemple de Madagascar). *Candollea*, 1971, 26 (2), 263-277.
133. GUILLET P., N'GUESSAN R., DARRIET F., TRAORE-LAMIZANA M., CHANDRE F., CARNEVALE P. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. In: *Med Vet Entomol. Medical and Veterinary Entomology*, 2001, 15 (1), 105-12.
134. HAMON JACQUES. Biologie d'*Anopheles funestus*. In: *Biologie des anophèles d'AOF et d'AEF*. Paris: ORSTOM, 1955, 2/+, 6 multigr.
135. HAMON JACQUES. Biologie d'*Anopheles gambiae*. In: *Biologie des anophèles d'AOF et d'AEF*. Paris: ORSTOM, 1955, 3/+, 11 multigr.
136. HAMON JACQUES. Contribution à l'étude des culicidés de la région de Porto Novo (Bas-Dahomey). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1954, 29 (5-6), 588-594.
137. HAMON JACQUES. Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta) : cycles d'agressivité et variations saisonnières. *Annales de la Société Entomologique de France*, 1963, 132, 85-144.
138. HAWLEY W. A., PHILLIPS-HOWARD P. A., TER KUILE F. O., TER LOUW D. J., VULULE J. M., OMBOK M., NAHLEN B. L., GIMNIG J. E., KARIUKI S. K., KOLCZAK M. S., HIGHTOWER A. W. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 68 (4 Suppl), 121-7.
139. HAY S. I., OMUMBO J. A., CRAIG M. H., SNOW R. W. Earth observation, geographic information systems and *Plasmodium falciparum* malaria in sub-Saharan Africa. *Adv Parasitol*, 2000, 47, 173-215.

140. HAY S. I., SINKA M. E., OKARA R. M., KABARIA C. W., MBITHI P. M., TAGO C. C., BENZ D., GETHING P. W., HOWES R. E., PATIL A. P., TEMPERLEY W. H., BANGS M. J., CHAREONVIRIYAPHAP T., ELYAZAR I.R. F., HARBACH R. E., HEMINGWAY J., MANGUIN S., MBOGO C. M., RUBIO-PALIS Y., GODFRAY H. C. J. Developing Global Maps of the Dominant *Anopheles* Vectors of Human Malaria. *PLoS Med*, 2010, 7 (2), e1000209.
141. HELFENSTEIN PAUL, VEVERKA JOSEPH. Photometric properties of lunar terrains derived from Hapke's equation. *Icarus*, 1987, 72 (2), 342-357.
142. HELINSKI M. E., HASSAN M. M., EL-MOTASIM W. M., MALCOLM C. A., KNOLS B. G., EL-SAYED B. Towards a sterile insect technique field release of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Sudan: irradiation, transportation, and field cage experimentation. *Malar J*, 2008, 7, 65.
143. HEMINGWAY J., HAWKES N. J., MCCARROLL L., RANSON H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34 (7), 653-65.
144. HINDE JOHN, DEMÉTRIO CLARICE G. B. Overdispersion: Models and estimation. *Computational Statistics & Data Analysis*, 1998, 27 (2), 151-170.
145. HODJATI M.H., CURTIS C.F. Evaluation of the effect of mosquito age and prior exposure to insecticide on pyrethroid tolerance in *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 1999, 89 (04), 329-337.
146. HOLSTEIN M.H. *Biology of Anopheles gambiae: research in French West Africa*. World Health Organization, 1954.
147. HOUGARD J. M., CORBEL V., N'GUESSAN R., DARRIET F., CHANDRE F., AKOGBETO M., BALDET T., GUILLET P., CARNEVALE P., TRAORE-LAMIZANA M. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res*, 2003, 93 (6), 491-8.
148. HUFFMAN G.J., BOLVIN D.T. TRMM and other data precipitation data set documentation. *Laboratory for Atmospheres, NASA Goddard Space Flight Center and Science Systems and Applications*, 2007.
149. HUTTEL J. Note sur la répartition des moustiques dans le Bas-Dahomey. *Bull Sot Path Exot*, 1950, 43, 563-566.
150. IRAC. *Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance* 2nd Edition. Insecticide Resistance Action Committee 2011, 72p.
151. JEPSON W. F., MOUTIA A., COURTOIS C. The malaria problem in Mauritius; the bionomics of Mauritian anophelines. *Bull Entomol Res*, 1947, 38 (1), 177-208.
152. JONES CHRISTOPHER M., LIYANAPATHIRANA MILINDU, AGOSSA FIACRE R., WEETMAN DAVID, RANSON HILARY, DONNELLY MARTIN JAMES, WILDING CRAIG S. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109 (17), 6614-6619.
153. KAMPANGO A., CUAMBA N., CHARLWOOD J. D. Does moonlight influence the biting behaviour of *Anopheles funestus*? *Medical and Veterinary Entomology*, 2011, no-no.
154. KEATING JOSEPH, EISELE THOMAS P. Epidemiology of malaria morbidity after control scale-up. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11 (12), 891-892.
155. KEISER J., SINGER B. H., UTZINGER J. Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5 (11), 695-708.
156. KELLY-HOPE L. A., HEMINGWAY J., MCKENZIE F. E. Environmental factors associated with the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in Kenya. *Malar J*, 2009, 8, 268.
157. KILLEEN G. F., FILLINGER U., KNOLS B. G. Advantages of larval control for African malaria vectors: low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage. *Malar J*, 2002, 1, 8.
158. KILLEEN G. F., MCKENZIE F. E., FOY B. D., SCHIEFFELIN C., BILLINGSLEY P. F., BEIER J. C. 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 (5), 535-44.
159. KILLEEN G. F., SMITH T. A. Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2007, 101 (9), 867-80.
160. KINDE-GAZARD D., BAGLO T. Assessment of microbial larvicide spraying with *Bacillus thuringiensis israelensis*, for the prevention of malaria. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2012, 42 (3), 114-118.

161. KIRBY M. J., LINDSAY S. W. Responses of adult mosquitoes of two sibling species, *Anopheles arabiensis* and *A. gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae), to high temperatures. *Bull Entomol Res*, 2004, 94 (5), 441-8.
162. KLEINSCHMIDT I., SCHWABE C., SHIVA M., SEGURA J. L., SIMA V., MABUNDA S. J., COLEMAN M. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *Am J Trop Med Hyg*, 2009, 81 (3), 519-24.
163. KLINKENBERG E., MCCALL P., WILSON M. D., AMERASINGHE F. P., DONNELLY M. J. Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana. *Malar J*, 2008, 7, 151.
164. KNOLS B. G., BOSSIN H. C., MUKABANA W. R., ROBINSON A. S. Transgenic mosquitoes and the fight against malaria: managing technology push in a turbulent GMO world. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77 (6 Suppl), 232-42.
165. KOEKEMOER L. L., KAMAU L., HUNT R. H., COETZEE M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 66 (6), 804-11.
166. KOELLA J. C., SORENSEN F. L., ANDERSON R. A. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci*, 1998, 265 (1398), 763-8.
167. KOELLA JACOB C., LYNCH PENELOPE A., THOMAS MATTHEW B., READ ANDREW F. Towards evolution-proof malaria control with insecticides. *Evolutionary Applications*, 2009, 2 (4), 469-480.
168. KORENROMP ELINE L., MILLER JOHN, CIBULSKIS RICHARD E., KABIR CHAM M., ALNWICK DAVID, DYE CHRISTOPHER. Monitoring mosquito net coverage for malaria control in Africa: possession vs. use by children under 5 years. *Trop Med Int Health*, 2003, 8 (8), 693-703.
169. KRAFSUR ES. Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect populations: 55 years and counting. *Journal of Agricultural Entomology*, 1998, 15 (4), 303-317.
170. KRISTAN M., ABEKU T. A., BEARD J., OKIA M., RAPUODA B., SANG J., COX J. Variations in entomological indices in relation to weather patterns and malaria incidence in East African highlands: implications for epidemic prevention and control. *Malar J*, 2008, 7, 231.
171. KULKARNI MANISHA A., DESROCHERS RACHELLE E., KERR JEREMY T. High Resolution Niche Models of Malaria Vectors in Northern Tanzania: A New Capacity to Predict Malaria Risk? *PLoS One*, 2010, 5 (2), e9396.
172. LAMBERT DIANE. Zero-Inflated Poisson Regression, with an Application to Defects in Manufacturing. *Technometrics*, 1992, 34 (1), 1-14.
173. LAPIED B., PENNETIER C., APAIRE-MARCHAIS V., LICZNAK P., CORBEL V. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol*, 2009, 27 (4), 190-8.
174. LAWRENCE C. E., CROFT A. M. Do mosquito coils prevent malaria? A systematic review of trials. *J Travel Med*, 2004, 11 (2), 92-6.
175. LE GOFF G., CARNEVALE PIERRE, ROBERT VINCENT. Low dispersion of anopheline malaria vectors in the African equatorial forest. *Parasite*, 1997, (4), 187-189.
176. LENGELER C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, (2), CD000363.
177. LENGELER C., ARMSTRONG-SHELLENBERG J., D'ALESSANDRO U., BINKA F., CATTANI J. Relative versus absolute risk of dying reduction after using insecticide-treated nets for malaria control in Africa. *Trop Med Int Health*, 1998, 3 (4), 286-90.
178. LENSEN A., BRIL A., VAN DE VEGTE M., VAN GEMERT G. J., ELING W., SAUERWEIN R. *Plasmodium falciparum*: Infectivity of Cultured, Synchronized Gametocytes to Mosquitoes. *Experimental Parasitology*, 1999, 91 (1), 101-103.
179. LINDSAY S. W., CAMPBELL H., ADIAMAH J. H., GREENWOOD A. M., BANGALI J. E., GREENWOOD B. M. Malaria in a peri-urban area of The Gambia. *Ann Trop Med Parasitol*, 1990, 84 (6), 553-62.
180. LINDSAY S. W., JAWARA M., PAINE K., PINDER M., WALRAVEN G. E., EMERSON P. M. Changes in house design reduce exposure to malaria mosquitoes. *Trop Med Int Health*, 2003, 8 (6), 512-7.
181. LINES J. D., NASSOR N. S. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Medical and Veterinary Entomology*, 1991, 5 (3), 261-265.
182. LIVADAS G. *Do anophelines acquire resistance to DDT?* Geneva: World Health Organization, 1951, 3p.
183. LIVADAS G. A., GEORGOPOULOS G. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in Greece. *Bull World Health Organ*, 1953, 8 (4), 497-511.

184. LOCHOUARN L., DIA I., BOCCOLINI D., COLUZZI M., FONTENILLE D. Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, 92 (6), 607-12.
185. LYIMO E. O., TAKKEN W., KOELLA J. C. Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1992, 63 (3), 265-271.
186. MABASO M. L., CRAIG M., ROSS A., SMITH T. Environmental predictors of the seasonality of malaria transmission in Africa: the challenge. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76 (1), 33-8.
187. MACDONALD G. *The epidemiology and control of malaria*. London: Oxford Univ. Pr., 1957.
188. MACLACHLAN G. J., PEEL D. *Finite mixture models*. New York [etc.]: Wiley, 2000, (Wiley series in probability and statistics).
189. MAJAMBERE S., PINDER M., FILLINGER U., AMEH D., CONWAY D. J., GREEN C., JEFFRIES D., JAWARA M., MILLIGAN P. J., HUTCHINSON R., LINDSAY S. W. Is mosquito larval source management appropriate for reducing malaria in areas of extensive flooding in The Gambia? A cross-over intervention trial. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82 (2), 176-84.
190. MANGA L., FONDJO E., CARNEVALE P., ROBERT V. Importance of low dispersion of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) on malaria transmission in hilly towns in south Cameroon. *J Med Entomol*, 1993, 30 (5), 936-8.
191. MANGUIN S., CARNEVALE P., MOUCHET J., COOSEMANS M., JULVEZ J., RICHARD-LENOBLE D., SIRCOULON J. *Biodiversity of malaria in the world*. John Libbey Eurotext, 2008.
192. MANGUIN SYLVIE. *Use of diagnostics for effective vector control*. In: Mowing forward in diagnosis of infectious diseases in developing countries : a focus on malaria. Fondation Mérieux ; Roll Back Malaria, 2009, 1. Forum : Mowing Forward in Diagnosis of Infectious Diseases in Developing Countries : a Focus on Malaria : Session 1 : Landcaspe of Parasitic Diagnostics for Malaria Control : from Recommendations to Practice, Lyon (FRA) ; Genève, 2009/06/22-24.
193. MARIE A., CORNELIE S., ROSSIGNOL M., DEMETTRE E., SEVENO M., TCHIOFFO TSAPI M., CORBEL V., CHANDRE F., MORLAIS I., REMOUE F. *What modifications in salivary glands are induced by parasites? Differential proteomic study of Anopheles gambiae salivary glands uninfected versus infected by wild Plasmodium falciparum*. In: 2012, 18th international conference of the European Society for Vector Ecology, Montpellier, France.
194. MARTENS WILLEM J. M., JETTEN THEO H., FOCKS DANA A. SENSITIVITY OF MALARIA, SCHISTOSOMIASIS AND DENGUE TO GLOBAL WARMING. *Climatic Change*, 1997, 35 (2), 145-156.
195. MARTINEZ-TORRES D., CHANDRE F., WILLIAMSON M. S., DARRIET F., BERGE J. B., DEVONSHIRE A. L., GUILLET P., PASTEUR N., PAURON D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 1998, 7 (2), 179-84.
196. MATTHYS B., VOUNATSOU P., RASO G., TSCHANNEN A. B., BECKETT E. G., GOSONI L., CISSE G., TANNER M., N'GORAN E K., UTZINGER J. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 75 (6), 1223-31.
197. MCCALL P. J., MOSHA F. W., NJUNWA K. J., SHERLOCK K. Evidence for memorized site-fidelity in *Anopheles arabiensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001, 95 (6), 587-590.
198. MCGARIGAL K., CUSHMAN SA. , ENE E. *FRAGSTATS v4: Spatial Pattern Analysis Program for Categorical and Continuous Maps*. Amherst: University of Massachusetts, 2012.
199. MICHALAKIS Y., RENAUD F. Malaria: Evolution in vector control. *Nature*, 2009, 462 (7271), 298-300.
200. MINAKAWA N., MUTERO C. M., GITHURE J. I., BEIER J. C., YAN G. Spatial distribution and habitat characterization of anopheline mosquito larvae in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61 (6), 1010-6.
201. MISHRA NEERU SINGH A.K., CURTIS C.F., SHARMA V.P. Influence of moonlight on light-trap catches of the malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae) in central India. *Bulletin of Entomological Research*, 1996, 86 (04), 475-479.
202. MOFFETT A., SHACKELFORD N., SARKAR S. Malaria in Africa: vector species' niche models and relative risk maps. *PLoS One*, 2007, 2 (9), e824.
203. MOHAMED A. A. Study of larvivorous fish for malaria vector control in Somalia, 2002. *East Mediterr Health J*, 2003, 9 (4), 618-26.
204. MOLINEAUX L., GRAMICCIA G. The garki project. Geneva: World Health Organization, 1980, 1 (1), 887—893.

205. MOLINEAUX L., WERNSDORFER WH, MCGREGOR I. The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. In: *Malaria: principles and practice of malariology*. 1988, 2, 913-998.
206. MORSY T. A., EL KADRY A. A., SALAMA M. M., SABRY A. H., EL SHARKAWY I. M. Studies on the bionomics and vector competence of adult anopheline mosquitoes in El Faiyum Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*, 1995, 25 (1), 213-44.
207. MOUCHET J., CARNEVALE P., COOSEMANS M., JULVEZ J., MANGUIN S., RICHARD-LENOBLE D., SIRCOULON J. *Biodiversité du paludisme dans le monde*. John Libbey Eurotext, 2004.
208. MOUCHET JEAN, GARIOU JACQUES. ANOPHELES MOUCHETI au Cameroun. *Cahiers ORSTOM.SÃ©rie Entomologie MÃ©dicale et Parasitologie*, 1966, 4 (6), 71-81.
209. MÜLLER P. *Das Insektizid Dichlordiphenyl-trichloräthan und seine Bedeutung*. Basel & Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1955.
210. MULLER P., DONNELLY M. J., RANSON H. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics*, 2007, 8, 36.
211. MULLER P., WARR E., STEVENSON B. J., PIGNATELLI P. M., MORGAN J. C., STEVEN A., YAWSON A. E., MITCHELL S. N., RANSON H., HEMINGWAY J., PAINE M. J., DONNELLY M. J. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet*, 2008, 4 (11), e1000286.
212. MUNGA S., MINAKAWA N., ZHOU G., MUSHINZIMANA E., BARRACK O. O., GITHEKO A. K., YAN G. Association between land cover and habitat productivity of malaria vectors in western Kenyan highlands. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 74 (1), 69-75.
213. MUNHENGGA G., BROOKE B. D., CHIRWA T. F., HUNT R. H., COETZEE M., GOVENDER D., KOEKEMOER L. L. Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa. *Parasit Vectors*, 2011, 4, 208.
214. MURRAY CHRISTOPHER J. L., ROSENFELD LISA C., LIM STEPHEN S., ANDREWS KATHRYN G., FOREMAN KYLE J., HARING DIANA, FULLMAN NANCY, NAGHAVI MOHSEN, LOZANO RAFAEL, LOPEZ ALAN D. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet*, 2012, 379 (9814), 413-431.
215. MUTUKU F. M., ALAII J. A., BAYOH M. N., GIMNIG J. E., VULULE J. M., WALKER E. D., KABIRU E., HAWLEY W. A. Distribution, description, and local knowledge of larval habitats of *Anopheles gambiae* s.l. in a village in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 74 (1), 44-53.
216. MUTUKU F. M., BAYOH M. N., HIGHTOWER A. W., VULULE J. M., GIMNIG J. E., MUEKE J. M., AMIMO F. A., WALKER E. D. A supervised land cover classification of a western Kenya lowland endemic for human malaria: associations of land cover with larval *Anopheles* habitats. *Int J Health Geogr*, 2009, 8, 19.
217. MWANGI T. W., ROSS A., MARSH K., SNOW R. W. The effects of untreated bednets on malaria infection and morbidity on the Kenyan coast. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2003, 97 (4), 369-72.
218. N'GUESSAN R., CORBEL V., AKOGBETO M., ROWLAND M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13 (2), 199-206.
219. N'GUESSAN R., DARRIET F., GUILLET P., CARNEVALE P., TRAORE-LAMIZANA M., CORBEL V., KOFFI A. A., CHANDRE F. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol*, 2003, 17 (1), 19-25.
220. NAGIN D. S., ODGERS C. L. Group-based trajectory modeling in clinical research. In: *Annu Rev Clin Psychol. Annual review of clinical psychology*, 2010, 6, 109-38.
221. NAMONTOUGOU M., DABIRE K. R., ETANG J., NWANE P., PIAMEU M., BALDET T., MARTIN T., OUEDRAOGO J. B., DIABATE A., SIMARD F. *Dynamics of insecticide resistance in Anopheles gambiae s.l. according to cotton cultivation schemes in Burkina Faso, West Africa*. In: 2011, 60th annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene, Philadelphia, USA, 4-8 December.
222. NCHINDA T. C. Malaria: a reemerging disease in Africa. *Emerg Infect Dis*, 1998, 4 (3), 398-403.
223. NDIATH M. O., COHUET A., GAYE A., KONATE L., MAZENOT C., FAYE O., BOUDIN C., SOKHNA C., TRAPE J. F. Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malar J*, 2011, 10, 269.

224. NJAN NLOGA A., ROBERT VINCENT, TOTO J.C., CARNEVALE PIERRE. Anopheles moucheti, vecteur principal du paludisme au Sud-Cameroun. *Bulletin de Liaison et de Documentation - OCEAC*, 1993, 26 (2), 63-67.
225. O'REILLY A. O., KHAMBAY B. P., WILLIAMSON M. S., FIELD L. M., WALLACE B. A., DAVIES T. G. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem J*, 2006, 396 (2), 255-63.
226. OESTERHOLT M. J., BOUSEMA J. T., MWERINDE O. K., HARRIS C., LUSHINO P., MASOKOTO A., MWERINDE H., MOSHA F. W., DRAKELEY C. J. Spatial and temporal variation in malaria transmission in a low endemicity area in northern Tanzania. *Malar J*, 2006, 5, 98.
227. OHBA M., SAITOH H., MIYAMOTO K., HIGUCHI K., MIZUKI E. Bacillus thuringiensis serovar higo (flagellar serotype 44), a new serogroup with a larvicidal activity preferential for the anopheline mosquito. *Lett Appl Microbiol*, 1995, 21 (5), 316-8.
228. OKARA R. M., SINKA M. E., MINAKAWA N., MBOGO C. M., HAY S. I., SNOW R. W. Distribution of the main malaria vectors in Kenya. *Malar J*, 2010, 9, 69.
229. OKUMU F. O., MADUMLA E. P., JOHN A. N., LWETOJERA D. W., SUMAYE R. D. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations - The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasit Vectors*, 2010, 3, 12.
230. OKUMU F. O., MOORE S. J. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malar J*, 2011, 10, 208.
231. OPPENOORTH F.J. Biochemistry and Physiology of Resistance. In: KERKUT G. A., GILBERT L. I. . *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford: Pergamon Press, 1985, 2, pp 731-773.
232. OVERGAARD HANS, EKBOM BARBARA, SUWONKERD WANNAPA, TAKAGI MASAHIRO. Effect of landscape structure on anopheline mosquito density and diversity in northern Thailand: Implications for malaria transmission and control. *Landscape Ecology*, 2003, 18 (6), 605-619.
233. PAAIJMANS K. P., WANDAGO M. O., GITHEKO A. K., TAKKEN W. Unexpected high losses of Anopheles gambiae larvae due to rainfall. *PLoS One*, 2007, 2 (11), e1146.
234. PAL M. K., TANDON N. Field evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis (Bacticide) against Anopheles stephensi breeding in Calcutta city. *J Commun Dis*, 2001, 33 (2), 143-6.
235. PARENT JASON, CIVCO DANIEL L., ANGEL SHLOMO. *Compactness: A Comprehensive Set of Metrics and Rationale for Use*. In: 2009, Esri International User Conference, San Diego, USA.
236. PATES H., CURTIS C. Mosquito behavior and vector control. *Annu Rev Entomol*, 2005, 50, 53-70.
237. PATES H. V., TAKKEN W., STUKE K., CURTIS C. F. Differential behaviour of Anopheles gambiae sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human and cow odours in the laboratory. *Bull Entomol Res*, 2001, 91 (4), 289-96.
238. PATZ J. A., STRZEPEK K., LELE S., HEDDEN M., GREENE S., NODEN B., HAY S. I., KALKSTEIN L., BEIER J. C. Predicting key malaria transmission factors, biting and entomological inoculation rates, using modelled soil moisture in Kenya. *Trop Med Int Health*, 1998, 3 (10), 818-27.
239. PENNETIER C., CORBEL V., BOKO P., ODJO A., N'GUESSAN R., LAPIED B., HOUGARD J. M. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles gambiae. *Malar J*, 2007, 6, 38.
240. PENNETIER C., COSTANTINI C., CORBEL V., LICCIARDI S., DABIRE R. K., LAPIED B., CHANDRE F., HOUGARD J. M. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14 (11), 1707-14.
241. PENNETIER C., COSTANTINI C., CORBEL V., LICCIARDI S., DABIRE R. K., LAPIED B., CHANDRE F., HOUGARD J. M. Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying An. gambiae mosquitoes. *PLoS One*, 2009, 4 (11), e7896.
242. PHILLIPS MARGARET., MILLS A., DYE CHRISTOPHER. *Guidelines for cost-effectiveness analysis of vector control* Geneva: World Health Organization, 1993, 3, 192 (PEEM guidelines series).
243. POINSIGNON A., CORNELIE S., BA F., BOULANGER D., SOW C., ROSSIGNOL M., SOKHNA C., CISSE B., SIMONDON F., REMOUE F. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites. *Malar J*, 2009, 8, 198.
244. POINSIGNON A., SAMB B., DOUCOURE S., DRAME P. M., SARR J. B., SOW C., CORNELIE S., MAIGA S., THIAM C., ROGERIE F., GUINDO S., HERMANN E., SIMONDON F., DIA I., RIVEAU G., KONATE L., REMOUE F. First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool

- for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites. *Trop Med Int Health*, 2010, 15 (10), 1198-203.
245. PRASAD H., PRASAD R. N., HAQ S. Control of mosquito breeding through *Gambusia affinis* in rice fields. *Indian J Malariol*, 1993, 30 (2), 57-65.
 246. PRIOR A., TORR S. J. Host selection by *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* feeding on cattle in Zimbabwe. *Med Vet Entomol*, 2002, 16 (2), 207-13.
 247. PROTOPOPOFF N., VAN HERP M., MAES P., REID T., BAZA D., D'ALESSANDRO U., VAN BORTEL W., COOSEMANS M. Vector control in a malaria epidemic occurring within a complex emergency situation in Burundi: a case study. *Malar J*, 2007, 6, 93.
 248. PULFORD J., HETZEL M. W., BRYANT M., SIBA P. M., MUELLER I. Reported reasons for not using a mosquito net when one is available: a review of the published literature. *Malar J*, 2011, 10, 83.
 249. R DEVELOPMENT CORE TEAM. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2.12, 2010.
 250. RAGHAVENDRA K., BARIK T. K., REDDY B. P., SHARMA P., DASH A. P. Malaria vector control: from past to future. *Parasitol Res*, 2011, 108 (4), 757-79.
 251. RAMIREZ J. L., GARVER L. S., DIMOPOULOS G. Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Curr Mol Med*, 2009, 9 (2), 116-30.
 252. RANSON H., HEMINGWAY J. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 2005, 401, 226-41.
 253. RANSON H., JENSEN B., VULULE J. M., WANG X., HEMINGWAY J., COLLINS F. H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 2000, 9 (5), 491-7.
 254. RBM. *Global malaria action plan*. Geneva: Roll Back Malaria Partnership, 2008.
 255. READ A. F., LYNCH P. A., THOMAS M. B. How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol*, 2009, 7 (4), e1000058.
 256. REDDY MICHAEL, OVERGAARD HANS, ABAGA SIMON, REDDY VAMSI, CACCONE ADALGISA, KISZEWSKI ANTHONY, SLOTMAN MICHEL. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, 2011, 10 (1), 184.
 257. REITER MATTHEW E., LAPOINTE DENNIS A. Landscape Factors Influencing the Spatial Distribution and Abundance of Mosquito Vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in a Mixed Residential and Agricultural Community in Hawaii. *Journal of Medical Entomology*, 2007, 44 (5), 861-868.
 258. REMOUE F., CISSE B., BA F., SOKHNA C., HERVE J. P., BOULANGER D., SIMONDON F. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100 (4), 363-70.
 259. RICHARDS J.A. *Remote sensing digital image analysis: an introduction*. 5th edition. Springer, 2012.
 260. ROGIER C., HENRY M. C., ROWLAND M., CARNEVALE P., CHANDRE F., CORBEL V., CURTIS C., HOUGARD J. M. [Guidelines for phase III evaluation of vector control methods against malaria]. *Med Trop (Mars)*, 2009, 69 (2), 173-84 Guide pour l'évaluation en Phase III de la lutte antivectorielle contre le paludisme.
 261. ROSS R. *The prevention of malaria*. 2nd. London: Murray, 1911.
 262. ROWLAND M., DOWNEY G., RAB A., FREEMAN T., MOHAMMAD N., REHMAN H., DURRANI N., REYBURN H., CURTIS C., LINES J., FAYAZ M. DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan. *Trop Med Int Health*, 2004, 9 (3), 335-42.
 263. ROWLAND M., DURRANI N., KENWARD M., MOHAMMAD N., URAHMAN H., HEWITT S. Control of malaria in Pakistan by applying deltamethrin insecticide to cattle: a community-randomised trial. *Lancet*, 2001, 357 (9271), 1837-41.
 264. ROWLAND M., FREEMAN T., DOWNEY G., HADI A., SAEED M. DEET mosquito repellent sold through social marketing provides personal protection against malaria in an area of all-night mosquito biting and partial coverage of insecticide-treated nets: a case-control study of effectiveness. *Trop Med Int Health*, 2004, 9 (3), 343-50.
 265. ROWLAND MARK, HEMINGWAY JANET. Changes in malathion resistance with age in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1987, 28 (2), 239-247.
 266. RUBIO-PALIS Y. Influence of moonlight on light trap catches of the malaria vector *Anopheles nuneztovari* in Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc*, 1992, 8 (2), 178-80.

267. RUSSELL T. L., GOVELLA N. J., AZIZI S., DRAKELEY C. J., KACHUR S. P., KILLEEN G. F. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J*, 2011, 10, 80.
268. SABATINELLI G., BLANCHY S., MAJORI G., PAKAKAY M. [Impact of the use of larvivorous fish *Poecilia reticulata* on the transmission of malaria in FIR of Comoros]. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1991, 66 (2), 84-8 Impact de l'utilisation du poisson larvifère *Poecilia reticulata* sur la transmission du paludisme en RFI des Comores.
269. SACHS J., MALANEY P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, 2002, 415 (6872), 680-5.
270. SAITOH H., HIGUCHI K., MIZUKI E., OHBA M. Larvicidal toxicity of Japanese *Bacillus thuringiensis* against the mosquito *Anopheles stephensi*. *Med Vet Entomol*, 1998, 12 (1), 98-102.
271. SANNER M.F. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 1999, 17 (1), 57-61.
272. SCHRECK C. E., POSEY K., SMITH D. Durability of permethrin as a potential clothing treatment to protect against blood-feeding arthropods. *J Econ Entomol*, 1978, 71 (3), 397-400.
273. SCOTT J. A., BROGDON W. G., COLLINS F. H. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 49 (4), 520-9.
274. SERVICE M. W. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal--the long and short of it. *J Med Entomol*, 1997, 34 (6), 579-88.
275. SHILILU J. I., TEWOLDE G. M., BRANTLY E., GITHURE J. I., MBOGO C. M., BEIER J. C., FUSCO R., NOVAK R. J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus* and temephos for managing *Anopheles* larvae in Eritrea. *J Am Mosq Control Assoc*, 2003, 19 (3), 251-8.
276. SILVER J.B. Measuring Adult Dispersal. In: *Mosquito Ecology*. 2008, 1377-1424.
277. SILVER J.B. Sampling Adults by Animal Bait Catches and by Animal-Baited Traps. In: *Mosquito Ecology*. 2008, 493-675.
278. SILVER J.B. Sampling Adults with Light-Traps. In: *Mosquito Ecology*. 2008, 845-946.
279. SILVER J.B. Sampling the Larval Population. In: *Mosquito Ecology*. 2008, 137-338.
280. SIMARD F., AYALA D., KAMDEM G. C., POMBI M., ETOUNA J., OSE K., FOTSING J. M., FONTENILLE D., BESANSKY N. J., COSTANTINI C. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol*, 2009, 9, 17.
281. 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 (5), 726-31.
282. SINKA M. E., BANGS M. J., MANGUIN S., COETZEE M., MBOGO C. M., HEMINGWAY J., PATIL A. P., TEMPERLEY W. H., GETHING P. W., KABARIA C. W., OKARA R. M., VAN BOECKEL T., GODFRAY H. C., HARBACH R. E., HAY S. I. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors*, 3, 117.
283. SINKA M. E., BANGS M. J., MANGUIN S., RUBIO-PALIS Y., CHAREONVIRIYAPHAP T., COETZEE M., MBOGO C. M., HEMINGWAY J., PATIL A. P., TEMPERLEY W. H., GETHING P. W., KABARIA C. W., BURKOT T. R., HARBACH R. E., HAY S. I. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*, 2012, 5, 69.
284. SITARAMAN N. L., KARIM M. A., REDDY G. V. Observations on the use of *Gambusia affinis* Holbrooki to control *A. stephensi* breeding in wells. Results of two years' study in Greater Hyderabad City--India. *Indian J Med Res*, 1975, 63 (10), 1509-16.
285. SKAUG H., FOURNIER D., NIELSEN A., MAGNUSSON A., BOLKER B. *glmmADMB: Generalized Linear Mixed Models Using AD Model Builder*. R package version 0.7.2.5/r186, 2012.
286. SMITH D. L., MCKENZIE F. E., SNOW R. W., HAY S. I. Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control. *PLoS Biol*, 2007, 5 (3), e42.
287. SOUSA CARLA A., PINTO JOÃO, ALMEIDA A. PAULO G., FERREIRA CONCEIÇÃO, ROSÁRIO VIRGÍLIO E. DO, CHARLWOOD J. DEREK. Dogs as a Favored Host Choice of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae) of São Tomé, West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 2001, 38 (1), 122-125.
288. STAPLETON D. H. Lessons of history? Anti-malaria strategies of the International Health Board and the Rockefeller Foundation from the 1920s to the era of DDT. *Public Health Rep*, 2004, 119 (2), 206-15.
289. TAKKEN W, CHARLWOOD JD, BILLINGSLEY PF, GORT G. Review Article-Dispersal and survival of *Anopheles funestus* and *A. gambiae* s1 (Diptera: Culicidae) during the rainy season in southeast Tanzania. *Bulletin of Entomological Research*, 1998, 88 (5), 561-566.

290. TAKKEN W., KNOLS B. G. Malaria vector control: current and future strategies. *Trends Parasitol*, 2009, 25 (3), 101-4.
291. TAKKEN W., KNOLS B. G. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol*, 1999, 44, 131-57.
292. THE MALERA CONSULTATIVE GROUP ON VACCINES. A Research Agenda for Malaria Eradication: Vaccines. *PLoS Med*, 2011, 8 (1), e1000398.
293. THE MALERA CONSULTATIVE GROUP ON VECTOR CONTROL. A Research Agenda for Malaria Eradication: Vector Control. *PLoS Med*, 2011, 8 (1), e1000401.
294. THOMAS D. D., DONNELLY C. A., WOOD R. J., ALPHEY L. S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 2000, 287 (5462), 2474-6.
295. THOMAS M. B., READ A. F. Can fungal biopesticides control malaria? *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5 (5), 377-83.
296. THOMSON M. C., CONNOR S. J. Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol*, 2000, 14 (3), 227-44.
297. THOMSON M. C., CONNOR S. J., QUINONES M. L., JAWARA M., TODD J., GREENWOOD B. M. Movement of *Anopheles gambiae* s.l. malaria vectors between villages in The Gambia. *Med Vet Entomol*, 1995, 9 (4), 413-9.
298. THOMSON M. C., D'ALESSANDRO U., BENNETT S., CONNOR S. J., LANGEROCK P., JAWARA M., TODD J., GREENWOOD B. M. Malaria prevalence is inversely related to vector density in The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, 88 (6), 638-43.
299. TIFFEN MARY. *Guidelines for the incorporation of health safeguards into irrigation projects through intersectoral cooperation with special reference to the vector-borne diseases* 2nd. Geneva: World Health Organization, 1991, 1, 81 (PEEM guidelines series).
300. TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET JJ, SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A. *Epidemiologie appliquee à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Maison-Alfort: AEEMA, 2010.
301. TRAN A., BITEAU-COROLLER F., GUIIS H., ROGER F. Modélisation des maladies vectorielles. *Epidemiol. et sante anim.*, 2005, 47, 35-51.
302. TRAPE J. F., TALL A., DIAGNE N., NDIATH O., LY A. B., FAYE J., DIEYE-BA F., ROUCHER C., BOUGANALI C., BADIANE A., SARR F. D., MAZENOT C., TOURE-BALDE A., RAOULT D., DRUILHE P., MERCEREAU-PUJALON O., ROGIER C., SOKHNA C. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11 (12), 925-32.
303. TRUNG H. D., BORTEL W. V., SOCHANATHA T., KEOKENCHANH K., BRIET O. J., COOSEMANS M. Behavioural heterogeneity of *Anopheles* species in ecologically different localities in Southeast Asia: a challenge for vector control. *Trop Med Int Health*, 2005, 10 (3), 251-62.
304. TUCKER COMPTON J. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sensing of Environment*, 1979, 8 (2), 127-150.
305. USAID. *The President's Malaria Initiative: sixth annual report*. Washigton: U.S. Agency for International Development, 2012.
306. VOLKOFF BORIS, WILLAIME PIERRE. *Carte pédologique de reconnaissance de la République Populaire du Bénin à 1/200 000 : feuille de Porto-Novo*. Paris: ORSTOM, 1976, 41 p. multigr.
307. VON SEIDLEIN L., IKONOMIDIS K., BRUUN R., JAWARA M., PINDER M., KNOLS B. G., KNUDSEN J. B. Airflow attenuation and bed net utilization: observations from Africa and Asia. *Malar J*, 2012, 11, 200.
308. WAN Z. MODIS land-surface temperature algorithm theoretical basis document (LST ATBD). *Institute for Computational Earth System Science, Santa Barbara*, 1999, 75.
309. WEILL M., MALCOLM C., CHANDRE F., MOGENSEN K., BERTHOMIEU A., MARQUINE M., RAYMOND M. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*, 2004, 13 (1), 1-7.
310. WHITE G. B. *Anopheles bwambae* sp.n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An.gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 1985, 10 (4), 501-522.
311. WHITE G. B., MAGAYUKA S. A., BOREHAM P. F. L. Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt., Culicidae): bionomics and vectorial activity of species A and species B at Segera, Tanzania. *Bulletin of Entomological Research*, 1972, 62 (02), 295-317.

312. WHITE M. T., GRIFFIN J. T., CHURCHER T. S., FERGUSON N. M., BASANEZ M. G., GHANI A. C. Modelling the impact of vector control interventions on *Anopheles gambiae* population dynamics. *Parasit Vectors*, 2011, 4, 153.
313. WHO. *Expert Committee on Malaria : 6th report*. Athènes: World Health Organization, 1956.
314. WHO. *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*. Geneva: World Health Organization, 2012, 131.
315. WHO. Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). 2006, WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP/2006.3.
316. WHO. Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group. *WHO technical report series*, 2006, 936.
317. WHO. *Pesticides and their application : for the control of vectors and pests of public health importance* 6th. Geneva: World Health Organization, 2006, 114.
318. WHO. *Report of the WHO Informal Consultation Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. Geneva: World Health Organization:Parasitic Diseases and Vector Control (PVC)/Communicable Disease Control, Prevention and Eradication (CPE), 1998, 43.
319. WHO. *World Malaria Report 2010*. Geneva: World Health Organization, 2010.
320. WHO. *World Malaria Report: 2011*. Geneva: World Health Organization, 2011, 259.
321. WHO. *Yellow-fever panel: report on the first session*. Geneva: World Health Organization, 1950, World Health Organization technical report series 12.
322. WIRTZ R. A., ZAVALA F., CHAROENVIT Y., CAMPBELL G. H., BURKOT T. R., SCHNEIDER I., ESSER K. M., BEAUDOIN R. L., ANDRE R. G. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ*, 1987, 65 (1), 39-45.
323. WONDJI C. S., IRVING H., MORGAN J., LOBO N. F., COLLINS F. H., HUNT R. H., COETZEE M., HEMINGWAY J., RANSON H. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res*, 2009, 19 (3), 452-9.
324. WORRALL E., FILLINGER U. Large-scale use of mosquito larval source management for malaria control in Africa: a cost analysis. *Malar J*, 2011, 10, 338.
325. YADOLETON A. W., ASIDI A., DJOUAKA R. F., BRAIMA J., AGOSSOU C. D., AKOGBETO M. C. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J*, 2009, 8, 103.
326. YANG G. J., BROOK B. W., WHELAN P. I., CLELAND S., BRADSHAW C. J. Endogenous and exogenous factors controlling temporal abundance patterns of tropical mosquitoes. *Ecol Appl*, 2008, 18 (8), 2028-40.
327. ZAIM M., AITIO A., NAKASHIMA N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol*, 2000, 14 (1), 1-5.
328. ZUUR A.F., IENO E.N., WALKER N.J., SAVELIEV A.A., SMITH G.M. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer Verlag, 2009.

Annexe 1 : Facteurs du modèle conceptuel et variables potentielles déduites

Éléments de la Bio-écologie		Facteurs		Caractéristiques d'intérêt de l'entité secondaire	Variables potentielles identifiées	Références
Nom	Comment ?	Nom	Hypothèse liées à l'entité secondaire			
Gites lanvaires		Végétation	Certains types de végétation peuvent favoriser la création de gites	qualité, surface, distance	Surfaces d'occupation du sol NDVI (indice intégrateur : relief, précipitations...)	Mutuku 2009, Minakawa 1996, Munga 2006, Costantini, Simard 2009, Thomson 2000, Hay 2000, Dambach 2009, Gillies 1987, Gimnig 2001, Ageep 2009, Ayala 2009
		Hydrographie	Les eaux permanentes ou temporaire du réseau hydrographique favorise la création de gites lanvaires.	qualité, surface, distance, intégrale	réseau hydro, temporalité, surfaces	Mutuku 2009, Costantini, Simard 2009, Hamon 1955a, 1955b, Ageep 2009
		Gites domestiques	L'homme crée/détruit des gites domestiques et péri-domestiques	qualité, quantité, localisation, distance, temporalité	Nombre et type de gites domestiques	Holstein 1954, Hamon 1955a, 1955b
		Agriculture	Certaines pratiques agricoles favorisent la création de gites	qualité, surface, distance	Surfaces d'occupation du sol	Mutuku 2009, Munga 2006, Anosiké 2007, Matthys 2006, Klinkelberg 2008, Ayala 2009
		Élevage	L'élevage favorise la création de gites (ex : empreintes de sabots des bovins)	qualité, surface, distance	Surfaces pâturées, stabulations	Minakawa 1996
		Relief	Des situation morphologiques favorisent la création de gites (pentes faibles, dépressions) et les conditions de remplissage ou de lessivage	qualité, surface, distance	Pentes, orientation, altitude, variation locales (dépressions)	Costantini, Simard 2009, Moffet 2007, Patz 1998, Ayala 2009
		Sols	Certains sols favorisent la création de gites, leur remplissage et leur durée en eau (imperméabilité)	qualité, surface, distance	Surface des type de sols	Minakawa 1996
		Pistes	Les pistes peuvent favoriser la création de gites	qualité, surface, distance	longueur de réseau, distance au réseau, sommes, moyennes, maximum, nb de jours de pluie.	Minakawa 1996, Edlilo 2002, Hamon 1955, Ayala 2009
		Précipitation	Les précipitations remplissent, maintiennent et lessivent les gites	quantité, fréquence	nb d'heure d'ensoleillement	Christie 1959, White 1972, Molineux and Gramiccia 1980, Charwood 1995, Covell, 1957, Paajmans 2007, Moffet 2007
		Ensoleillement	L'ensoleillement modifie la température de l'eau (durée du dev lanvaire)	quantité		Ayala 2009
		Température	La température ambiante modifie la température de l'eau et la durée du développement lanvaire	quantité	sommes, moyennes, maximum	Bayoh 2003 et 2004, Costantini, Simard 2009, Ayala 2009
		Qualité Eau	Les caractéristiques de l'eau peut faire varier la durée du cycle lanvaire	qualité	Surfaces d'occupation du sol (eaux permanentes), hydrographie, physico-chimie.	Praehler 2006
		Paysage	modifie les possibilités de dispersion	efficacité	répartition des prédateurs des gites lanvaire...	Diabaté 2008, Gimonneau 2012
Micro-climat	modifie l'activité, la survie, la longévité et la dispersion des vecteurs	Végétation	La fermeture du milieu diminue les possibilités de dispersion. Effet répulsif de certaines plantes	qualité, surface, distance	Cf. supra	Le Goff 1997, Silver 2008
		Relief	Un relief accidenté (fortes pentes) limite la dispersion des vecteurs	qualité, surface, distance	Cf. supra	Manga 1993
Micro-climat	modifie l'activité, la survie, la longévité et la dispersion des vecteurs	Humidité	La survie et la longévité des vecteurs dépendent de l'humidité	quantité	humidité relative (min, max, moy)	Leeson 1939, Mayne 1930, Kessler 2008
		Température	La survie et l'activité des vecteurs adultes dépendent de la température	quantité	températures (min, max, moy)	Jepson 1947, Macdonald, 1957, Detinova, 1962; Martens 1997; Moffet 2007, Kirby 2004,
		Vent	Le vent modifie la dispersion des vecteurs	quantité	orientation, vitesse	Gillies 1961, Midega 2012

Entités primaires influençant		Entités secondaires			variables potentielles identifiées	References
Nom	Comment ?	Nom	Hypothèse liées à l'entité secondaire	Caractéristiques d'intérêt de l'entité secondaire		
Résistance aux insecticides	favorise la survie face à la lutte	Agriculture	L'utilisation d'insecticides favorise les résistances	qualité, surface, distance	surfaces d'occupation du sol (maraichage), quantité de produits utilisés	N'goussan 2003, Ellisa 1993, Diabaté 2002, Yadouleton 2009
Lutte antivectorielle	tue les vecteurs susceptibles	Lutte antivectorielle	Les lutttes contrôlent / favorisent les résistances	type, couverture, intensité	Cf. Infra	IRAC 2011
		Interventions	Les types d'intervention n'ont pas la même efficacité	type, couverture	Intervention, Taux de couverture, Taux d'utilisation	Langeler 1998, 2004, Akogbeto 2011
		Lutte villageoise	L'utilisation d'insecticides domestiques a un effet sur les populations de vecteurs	type, intensité	quantité de produits utilisés, produits et fréquence d'utilisation dans les foyers	Hudson 1971, Masha 1992
Hôtes	modifie la dispersion des vecteurs et leur anthropophilie	Hameau de mesure	Des caractéristiques du hameau font varier sont attractivité pour les vecteurs	fragmentation, population, surface, forme.	Nombre d'habitants, surface, densité, indice de forme, nombre d'entité, surfaces d'occupation du sol.	Robert 2003,
		Autres hameaux	Les autres hameaux modifient la dispersion les vecteurs	population, surface, distance, orientation	Nombre d'habitants, surface, densité, indice de forme, nombre d'entité, surfaces d'occupation du sol.	Gillies 1961, Thomson 1995
		Élevages	Les élevages modifient la dispersion des vecteurs les moins anthropophiles / plus opportunistes	qualité, nombre, surface, distance, orientation	Localisation des élevages, nombre de têtes.	Killeen 2007, Dia 2008, fontemille 1997
Mesure	modifie la vision de la réalité	Collecteur	La qualité de la mesure varie d'un capteur à l'autre	attractivité, compétence	nom, contrôle qualité	Lyndsay 1993, Brady 1997, Knols 1995
		Maison de capture	Les caractéristiques de la maison de capture font varier la mesure	attractivité, pénétrabilité	nombre et concentration des dormeurs, matériaux de construction, ouvertures.	Lyndsay 2003,
Prédation	fait fluctuer la population de vecteurs	Espèce	Chaque prédateur a une distribution et un impact différent.	Consommation journalière, nombre, répartition	Présence des prédateurs	Canyon 1997, Nelson 2006, Jackson 2005
				Facteurs tertiaires	variables identifiées	
				Géologie	Surfaces des socles géologiques	
				ressource en eau	distance, quantité et type de points d'eau (eau de surface, adduction, puits), quantité et qualité du stockage	
				Nuisance	Agressivité culicidienne	

Annexe 2 : Description des relations internes du modèle conceptuel

Géologie	Relief	Le relief est déterminé par la géologie (sous l'influence du climat)
Géologie	Soils	La formation des sols est étroitement dépendante des matériaux souterrains
Géologie	ressource en eau	La géologie détermine les conditions d'accès aux eaux souterraines (profondeur de la nappe)
Géologie	Pistes	La nature des pistes peut être la même que celle de la roche mère
Relief	Hydrographie	Le relief définit les écoulements
Relief	Soils	La formation des sols dépend notamment du relief et de la géologie
Relief	Végétation + Agriculture	Certaines plantes sont adaptées à des conditions particulières de relief
Relief	Pistes	Les reliefs sont des facteurs limitant dans la création d'infrastructures de transport
Hydrographie	Metéo	Le relief provoque des variations locales des conditions météorologiques
Hydrographie	Agriculture	Le besoin en eau (et donc son accès) limite les pratiques (variétés) agricoles
Hydrographie	Qualité Eau	Le renouvellement de l'eau est fonction du réseau hydrographique
Soils	ressource en eau	L'hydrographie détermine les conditions d'accès aux eaux de surfaces
Soils	Végétation + Agriculture	La nature et la qualité des sols sont déterminantes pour les variétés cultivées
Soils	Pistes	La nature des pistes peut être la même que celle des sols
Soils	Hydrographie	Les caractéristiques des sols font varier la permanence du réseau (imperméabilité)
Soils	Qualité Eau	La nature du sol détermine les caractéristiques physico-chimiques (et biologique) de l'eau des gîtes
Végétation + Agriculture	Elevage	Certaines cultures agricoles et certains types de végétation favorisent l'établissement de troupeaux.
Agriculture	Qualité Eau	Les pratiques agricoles (intrants) et les caractéristiques propres au végétal (filtre) modifient la qualité de l'eau des gîtes
Végétation + Agriculture	Metéo	A une échelle locale, les types d'occupation du sol modifient les conditions climatiques (micro-climats)
Végétation + Agriculture	Lutte villageoise	Les insecticides utilisés en agriculture sont une part de la lutte villageoise
Agriculture	Gîtes domestiques	Un accès difficile à la ressource en eau favorise la création de gîte anthropique (stockage)
ressource en eau	Elevage	L'établissement d'un troupeau est conditionné par un accès à une source d'eau (souterraine ou de surface)
ressource en eau	Hydrographie	Les conditions météo font varier la permanence du réseau
Metéo	Végétation + Agriculture	Les types de végétations et de culture sont fortement influencés par les conditions météo.
Metéo	Qualité Eau	Les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des gîtes varient en fonction des conditions météorologiques
Metéo	Gîtes domestiques	Les conditions météo peuvent favoriser la création de gîtes domestiques (stockage)
Température	Interventions	L'usage des moustiquaires est souvent faible lors des périodes les plus chaudes.
Hameau de mesure	Lutte anti-vectorielle	Les caractéristiques socio-culturelles d'un hameau peuvent faire varier l'usage (qualité, intensité) de moyens de lutte
Hameau de mesure	Captureur	Le captureur est socio-culturellement influencé par le lieu qu'il habite
Hameau de mesure	Gîtes domestiques	Des pratiques en termes de stockage/créations de gîtes anthropiques peuvent être influencé par des facteurs socio-culturels
Hameau de mesure	Végétation + Agriculture	Les pratiques agricoles et de gestion de la végétation sont influencées socio-culturellement
Hameau de mesure	Elevage	Les pratiques agricoles et de gestion de la végétation sont influencées socio-culturellement
Autres hameaux	Végétation + Agriculture	Les pratiques agricoles et de gestion de la végétation sont influencées socio-culturellement
Autres hameaux	Elevage	Les pratiques agricoles et de gestion de la végétation sont influencées socio-culturellement
Densité culicidé	Lutte anti-vectorielle	L'usage des moyens de lutte est influencé par la nuisance

Annexe 3 : Utilisation des SIG en épidémiologie

Utilisation des systèmes d'information géographique en épidémiologie.

Guis H, Gély M, **Moiroux N**, Tran A:

In Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures Edited by Toma B, Dufour B, Bénét JJ, Sanaa M, Shaw A, Moutou F: AEEMA

2010: 600

UTILISATION DES SYSTEMES D'INFORMATION GEOGRAPHIQUE EN EPIDEMIOLOGIE

Hélène Guis¹, Marie Gély², Nicolas Moiroux³, Annelise Tran^{2,4}

PLAN

1. Définition
2. Principe
3. Domaines d'utilisation
4. Les données d'un SIG
5. Les fonctionnalités d'un SIG
6. Lectures pour aller plus loin
7. Liste des principaux logiciels de SIG
8. Liens et forums

1. DEFINITION

Un système d'information géographique (SIG) est un outil permettant l'acquisition, le stockage, la mise à jour, l'intégration, l'analyse spatiale, la visualisation et la restitution de données numériques géoréférencées, c'est-à-dire localisées dans l'espace par leurs coordonnées géographiques. Il permet de manipuler et de traiter des données spatialisées de nature et de sources différentes. L'ensemble du système est constitué des matériels (tels que les ordinateurs et GPS (Global Positioning System, ou système de positionnement global)), logiciels, données, méthodes et utilisateurs.

2. PRINCIPE

Le principe des SIG est que chaque type d'objet est représenté par une couche d'information spatialisée : on peut par exemple avoir des couches avec les élevages, les villes, les cours d'eau, l'occupation du sol, le relief, la composition des sols... Le SIG permet de superposer ces couches en fonction de leur position dans l'espace (figure 1).

3. DOMAINES D'UTILISATION

Les SIG sont utilisés dans de très nombreux domaines : urbanisme, aménagement du territoire, environnement, agriculture, foresterie, géologie, transports, marketing... Ils sont de plus en plus utilisés dans le domaine de l'épidémiologie, qu'elle soit humaine, animale ou végétale. En effet, l'épidémiologie vise à étudier les phénomènes de santé d'une population dans l'espace et dans le temps et les SIG facilitent la représentation, l'analyse et la caractérisation de la composante spatiale (ou spatio-temporelle) des phénomènes de santé. Ils permettent par exemple de cartographier une maladie (en termes d'incidence ou de prévalence), les zones où le risque (produit de l'aléa et de la vulnérabilité) est le plus élevé, celles où le rapport bénéfice/coût de la lutte est le plus grand, de caractériser la structure spatiale d'événements de santé (telle que leur agrégation ou diffusion spatiale) ou encore de décrire leur voisinage afin de rechercher des facteurs de risques.

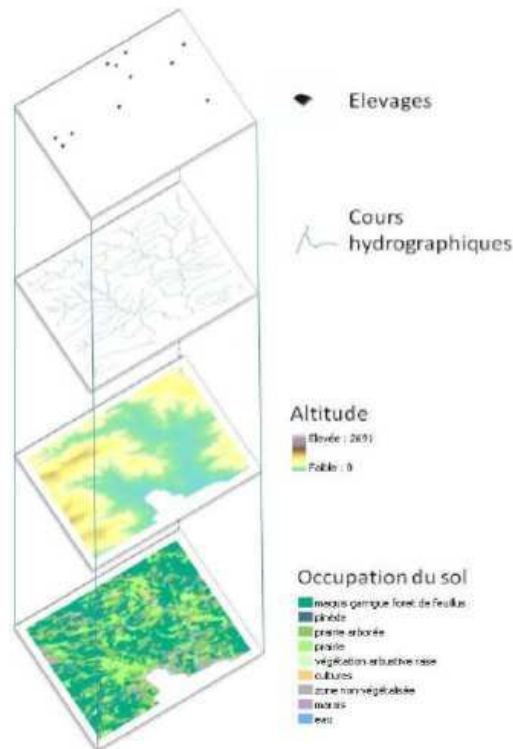
¹ Cirad, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France

² Cirad, UPR AGIRS, F-34398 Montpellier, France

³ IRD, UR 016, Cotonou, Bénin

⁴ Cirad, UMR TETIS, F-34398 Montpellier, France

Figure 1
Couches thématiques d'un SIG



4. LES DONNEES D'UN SIG

Un SIG permet d'intégrer des couches thématiques regroupant des objets de même nature. Il existe deux modes de représentation des objets :

- Le mode vectoriel, dit « vecteur », c'est-à-dire sous forme de points, lignes ou polygones,
- Le mode matriciel, dit « raster », c'est-à-dire sous forme d'une image ou grille composée de cellules de même taille appelées pixels.

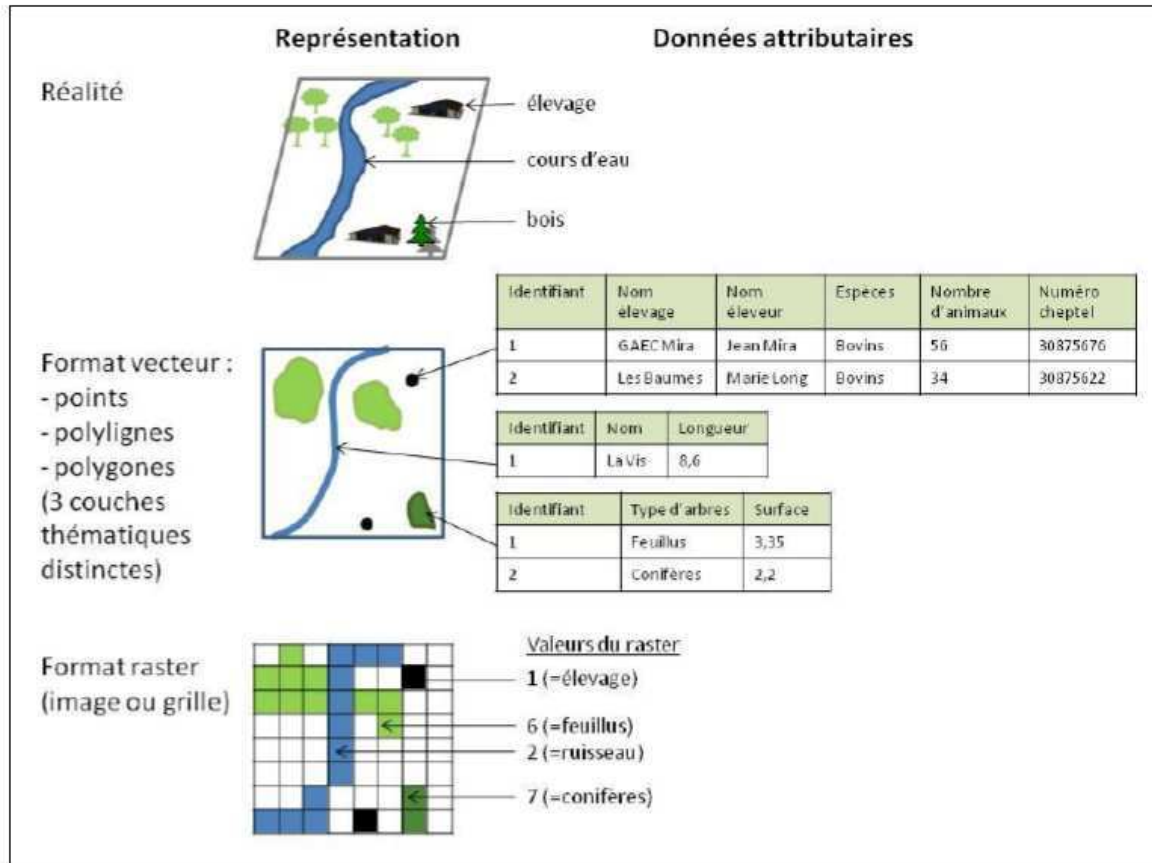
Dans les deux cas, l'information géographique est couplée avec une information attributaire renseignant sur les propriétés de l'objet (figure 2).

Pour un objet vectoriel, l'information attributaire est stockée dans une table associée. Par exemple, on peut avoir une couche thématique avec les élevages représentés sous forme de points. Dans la table attributaire, chaque ligne correspond à un élevage, et chaque colonne à un attribut de cet élevage : nom de l'élevage, nom de l'éleveur, nombre d'animaux pour chaque espèce, date de création, superficie...

Pour un objet matriciel, une information attributaire est associée à chaque pixel, c'est la valeur du pixel. Dans le cas d'un modèle numérique de terrain, la valeur des pixels sera l'altitude. Dans le cas d'une couche d'occupation du sol, chaque pixel aura une valeur représentant une classe de végétation (1 = forêt, 2 = eau, 3 = prairie... par exemple).

Figure 2

Formats de représentation des données dans un SIG et données attributaires associées

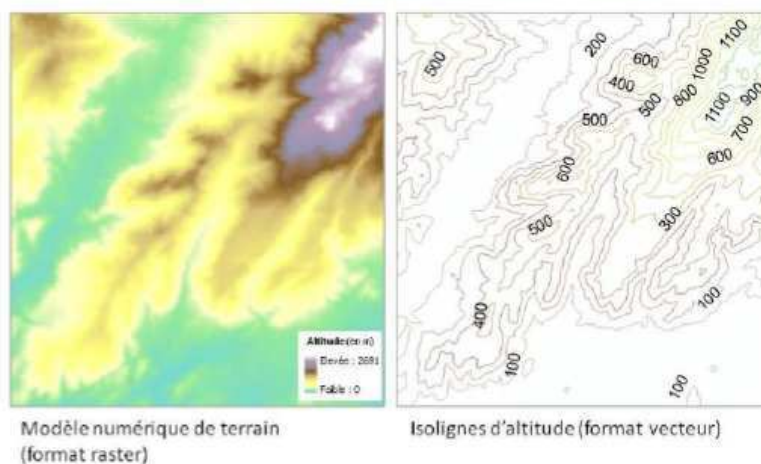


Un même objet peut être représenté dans les deux modes : par exemple une couche d'occupation du sol peut être représentée sous forme matricielle (comme expliqué précédemment) ou sous forme vectorielle, avec des polygones représentant des surfaces homogènes ayant la même occupation du sol. De même, un cours d'eau peut être représenté sous forme d'une ligne ou d'un polygone, ou bien sous forme d'une matrice codée sous forme binaire : tous les pixels ne représentant pas de l'eau sont codés avec la valeur 0 et ceux représentant de l'eau avec la valeur 1. De la même façon, l'altitude peut être représentée sous forme d'une couche matricielle ou sous forme de « courbes de niveaux » (ou isolignes ou isoplète d'altitude), chaque courbe étant en fait une ligne joignant tous les points d'une altitude donnée (figure 3).

Le choix de représentation d'un objet dans un mode ou dans l'autre dépend de la nature des données et des analyses que l'on veut effectuer. Les données présentant une variation continue dans l'espace sont souvent représentées sous forme matricielle ; inversement, les données fortement délimitées dans l'espace se prêtent bien à des représentations ponctuelles, linéaires ou polygonales. Les analyses effectuées à partir de ces deux modes de représentations peuvent différer : à partir de données vectorielles on peut calculer des distances entre objets ou compter un nombre d'objets dans un voisinage, alors qu'à partir de données matricielles, on peut effectuer des opérations arithmétiques par exemple multiplier, en tout point de l'espace, une valeur d'aléa avec une valeur de vulnérabilité pour calculer un risque. Certaines analyses peuvent être effectuées quel que soit le mode de représentation de l'objet ; par exemple, la densité d'élevages par région peut être calculée soit à partir du nombre d'élevages représentés en mode ponctuel rapportée à la surface de la région, soit en moyennant, dans la région d'intérêt, les pixels d'une couche matricielle de densité d'élevage.

Figure 3

Altitude représentée aux formats raster et vecteur



Il est possible dans un SIG de transformer une couche matricielle en une couche vectorielle, par exemple en regroupant les pixels de même valeur dans un polygone, et inversement de transformer une couche vectorielle en couche matricielle, en découpant les objets vectoriels en pixels par exemple.

5. FONCTIONNALITES DES SIG

On peut distinguer 4 fonctionnalités principales des SIG : l'acquisition de données, la gestion, l'analyse et la visualisation.

5.1. L'ACQUISITION DE DONNEES

Les SIG permettent de saisir et de recueillir des données, notamment *via*

- L'intégration de points relevés par GPS sur le terrain,
- Le géoréférencement d'un objet comme une image aérienne ou satellitaire. Géoréférencer un objet consiste à préciser ses coordonnées géographiques afin qu'il soit spatialisé,
- La digitalisation d'une carte, ce qui consiste à redessiner dans l'espace les objets (tels que les cours d'eau ou les courbes de niveaux) qui la composent de façon à obtenir des couches d'objets spatialisés.

5.2. LA GESTION, LE STOCKAGE ET L'INTEGRATION DE DONNEES SPATIALISEES

Les SIG permettent de sauvegarder, échanger, mettre à jour et intégrer les données acquises. Ils permettent de modifier les données : changer de format entre raster et vecteur, changer de projections ou rajouter des objets à une couche afin de la mettre à jour par exemple. Il est possible (et fortement recommandé !) de garder la trace de ce qui a été fait au travers des métadonnées. Les métadonnées sont des informations sur les données : qui les a créées, comment, quand, quelles modifications ont été apportées, à quoi correspondent les objets... Les SIG proposent des outils pour gérer facilement les métadonnées.

5.3. L'ANALYSE SPATIALE

Les SIG sont des outils conçus pour réaliser des analyses spatiales. Ils permettent :

- D'effectuer des requêtes et interrogations comme par exemple déterminer le nombre d'élevages situés à moins de 2 km d'un cours d'eau,
- De réaliser des agrégations ou des découpages des données,

- D'interpoler des informations comme par exemple déterminer l'altitude d'un site en fonction de sa position par rapport à des courbes de niveaux,
- De réaliser des simulations comme par exemple déterminer l'écoulement de la pluie en fonction du relief et ainsi délimiter les bassins versants d'une région,
- De modéliser des phénomènes ou processus tels que la distribution d'une espèce animale ou la vitesse de diffusion d'une épidémie.

5.4. LA VISUALISATION ET LA RESTITUTION

Les capacités des SIG à proposer des outils de visualisation et de restitution simples, compréhensibles et percutants sont une des raisons de leur fort développement actuel. Ils sont devenus de véritables outils de communication et d'aide à la décision. Le mode de représentation majoritaire reste la carte en 2 dimensions, mais d'autres formes de restitution sont possibles : tableaux, graphiques, films animés, cartes en 3 dimensions... Les cartes sont des outils puissants mais il est facile de détourner les messages qu'elles portent ; il faut donc veiller à les réaliser correctement, notamment à discrétiser (découper en classes) les données correctement (cf. article de Rican dans la rubrique « lectures pour aller plus loin »).

Ainsi, les SIG doivent permettre de répondre aux questions suivantes : « où, quoi, comment, quand, et si » .

1. **Où** : où se trouve l'objet ? Les SIG permettent de répondre aux questions relatives à la répartition spatiale d'objets.
2. **Quoi** : que trouve t'on à cet endroit ? Les SIG permettent de réaliser des inventaires d'objets en tenant compte de leur nature ou propriétés.
3. **Comment** : quelles sont les relations entre les objets ? Les SIG permettent de mesure des distances entre objets, de calculer des densités spatiales, de caractériser le voisinage d'objets et de localiser des trajectoires.
4. **Quand** : à quel moment un phénomène a eu lieu ? Les SIG permettent aussi d'effectuer des analyses temporelles.
5. **Et si** : que peut-il se passer dans tel scénario ? Les SIG sont très utiles pour réaliser des prédictions, prévisions et simulations.

6. LECTURES POUR ALLER PLUS LOIN

6.1. LECTURES GENERALES SUR LES SIG

J. Denègre J & Salgé F. (2004) *Les systèmes d'information géographique*. Presses Universitaires de France, collection Que sais-je ?, 128 p.

Robin M. (2002) *Télédétection. Des satellites aux SIG*. Nathan université, collection fac, 128 p.

Steinberg J. (2002) *Cartographie. Systèmes d'information géographique et télédétection*. Armand Colin, collection Campus, 159p.

6.2. LECTURES SUR LES APPLICATIONS DES SIG EN EPIDEMIOLOGIE

De Savigny D. & Wijeyaratne P. (1995) *GIS for health and the environment*. CRDI, 172 p. Disponible en ligne sur : http://www.crdi.ca/parteneriats/ev-9357-201-1-DO_TOPIC.html

Durr, P. & Gatrell, A. (Eds) (2004) *GIS and spatial analysis in veterinary science*. CABI Publishing, 314 p.

Gatrell, A. C. & M. Löytönen (1998) *GIS and Health*. Taylor & Francis Ltd, 212 p.

Graham A.J., Atkinson P.M. & Danson F.M. (2004) Spatial analysis for epidemiology. *Acta Trop* 91(3):219-225.

Hay S.I. (1997) Remote sensing and disease control: past, present and future. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(2):105-106.

Hay S.I. (2000) An overview of remote sensing and geodesy for epidemiology and public health application. *Adv Parasitol* 47:1-35.

Herbreteau V., Salem G., Souris M., Hugot J.P. & Gonzalez J.P. (2007) Thirty years of use and improvement of remote sensing, applied to epidemiology: from early promises to lasting frustration. *Health Place* 13(2):400-403

Ostfeld R.S., Glass G.E. & Keesing F. (2005) Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol Evol* 20(6):328-336.

Rican S. (1998) La cartographie des données épidémiologiques. Les principales méthodes de discrétisation et leur importance dans la représentation cartographique. *Cahiers Santé* 8:461-470.

Rogers D.J., Randolph S.E., Snow R.W. & Hay S.I. (2002) Satellite imagery in the study and forecast of malaria. *Nature* 415(6872):710-715.

Rogers D.J. & Randolph S.E. (2003) Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. *Nat Rev Microbiol* 1(3):231-237.

Rogers D.J. (2006) Models for vectors and vector-borne diseases. *Adv Parasitol* 62:1-35.

Pfeiffer D.U., Robinson T.P., Stevenson M., Stevens K.M, Rogers D. & Clements C.A. (2008) *Spatial Analysis in Epidemiology*. Oxford University Press, 208 p.

Tran A., Biteau-Coroller F., Guis H. & Roger F. (2005) Modélisation des maladies vectorielles. *Epidémiologie et santé animale* (47):35-51. Disponible en ligne sur : <http://aecema.vet-alfort.fr/public/pdf/revue/47.04.pdf>

Tran A., Guis H., Guernier V. & Gerbier G. (2008) Epidémiologie spatiale : les maladies vues du ciel. Introduction à l'épidémiologie intégrative des maladies infectieuses et parasitaires, ed. Université DB (Guégan J.F. et Choisy M.), p 522.

7. LISTES DES PRINCIPAUX LOGICIELS DE SIG

Tableau 1 : Liste des principaux logiciels SIG

Nom du logiciel	Lien
DIVA GIS*	http://www.diva-gis.org/
ERDAS Imagine	http://www.erdas.com/default.aspx
ESRI ArcGIS (ArcInfo et ArcView)	http://www.esrifrance.fr/
FGIS [#]	http://www.forestpal.com/fgis.html
GeoTools*	http://www.geotools.org/
GMT*	http://gmt.soest.hawaii.edu/
GRASS*	http://www.phygeo.uni-hannover.de/grass/index.php
IDRISI	http://www.clarklabs.org/
Intergraph	http://www.intergraph.com/global/fr/cgi/default.aspx
Manifold System	http://www.manifold.net/index.shtml
MapInfo	http://www.pbmapinfo.eu/products/mapinfo-professional/
MapIt*	http://www.mapit.de/mapit.en.html
MapPoint	http://www.microsoft.com/france/mappoint/
MapServer*	http://mapserver.org/index.html
Open JUMP*	http://www.openjump.org/
QGIS* (Quantum GIS)	http://www.qgis.org/
SavGIS (IRD)*	http://www.savgis.org/

*Logiciels libres, [#]N'est plus mis à jour depuis 2005

8. LIENS ET FORUMS

8.1. DONNEES GEOGRAPHIQUES SUR INTERNET

Le tableau 2 présente une liste non exhaustive de sites internet proposant des données géographiques (gratuites pour la plupart). Les lecteurs ayant une recherche spécifique (nature des données et zone géographique définies) sont vivement encouragés à effectuer leurs propres recherches sur internet car de nouveaux sites voient le jour régulièrement et il existe de très nombreux sites dédiés à un pays ou une région en particulier que nous n'avons

pas pu recenser ici (il existe par exemple pour le Canada le site [geogratias \(http://geogratias.cgdi.gc.ca/geogratias/fr/collection/search.do\)](http://geogratias.cgdi.gc.ca/geogratias/fr/collection/search.do) qui propose des données géographiques de natures diverses couvrant le Canada). Enfin, la plupart des pays ont un organisme géographique national (comme l'Institut géographique national en France) qui propose des données gratuites ou payantes.

Tableau 2
Liste de sites proposant des données géographiques

Nom du site	Descriptif et lien
Données générales	
DIVAGIS*	Données diverses (limites administratives, routes, réseaux ferrés...) par pays pour le Monde http://www.diva-gis.org/gData
GeoPortail*	Données diverses sur les territoires français, à visualiser, certaines étant téléchargeables. http://www.geoportail.fr
Geodata*	Données diverses sur le Monde du Programme des Nations Unies pour l'Environnement http://geodata.grid.unep.ch/
European Environment Agency*	Données de l'agence Européenne pour l'Environnement http://www.eea.europa.eu/data-and-maps
IFEN*	Données à visualiser, statistiques et observations sur l'environnement en France http://www.ifen.fr/
GeoNetwork*	Plateforme de données géospatiales du CGIAR-CSI http://geonetwork.csi.cgiar.org/geonetwork/srv/en/main.home
Eros* (USGS)	Données diverses du centre EROS (Earth Resources Observation and Science) de l'USGS (US Geological Survey) http://eros.usgs.gov/#/Find_Data
Occupation du sol	
Corinne Land Cover*	Occupation du sol en Europe http://www.eea.europa.eu/themes/landuse/clc-download ou, pour la France uniquement : http://www.ifen.fr/index.php?id=88 ou http://sd1878-2.sivit.org/
Postel*	Occupation du sol du Monde à une résolution de 300m http://postel.mediasfrance.org/breve.php3?id_breve=21
Données climatiques	
WorldClim*	Données climatiques passées, présentes et futures (issues du 3 ^e rapport du GIEC) http://www.worldclim.org/
CRU TS 2.1*	Données climatiques mondiales issues du CRU (Climatic research unit) de l'Université de East Anglia à 0,5 degrés de résolution http://csi.cgiar.org/cru/
IRI/LDEO*	Données climatiques (et autres) de la librairie IRI/LDEO http://iridl.ldeo.columbia.edu/
NOAA*	Données des satellites de la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) http://www.ncdc.noaa.gov/oa/satellite.html#randm
Données sur l'altitude (Modèles numériques de terrain (MNT))	
SRTM*	MNT issu de la mission SRTM (Shuttle Radar Topographic Mission) de la NASA pour le monde entier avec une résolution de 90 m à l'équateur http://srtm.cgiar.org/ et http://srtm.cgiar.org/SELECTION/inputCoord.asp
Gtopo30*	MNT pour le monde entier issu du centre EROS (Earth Resources Observation and Science) de l'USGS (US Geological Survey) avec une résolution d'environ 1 km http://eros.usgs.gov/#/Find_Data/Products_and_Data_Available/gtopo30_info
Données satellitaires	
TETIS*	Liste de capteurs satellitaires et prix des images sur le site de TETIS (Territoires, environnement, télédétection et information spatiale) http://tetis.teledetection.fr/index.php?option=com_content&task=view&id=415&Itemid=1
GLCF*	Site du GLCF (Global land cover facility) où l'on trouve des données de plusieurs satellites (Aster, Landsat, Modis, Ikonos, Orbview, Quickbird...) http://glcf.umiacs.umd.edu/data/
SPOTimage	Données (payantes) du satellite SPOT (satellite pour l'observation de la terre) http://www.spotimage.com/?countryCode=FR&languageCode=fr
Isis (CNES)	Programme du CNES (Centre National d'Etudes spatiales) promouvoir l'utilisation de l'imagerie spatiale SPOT auprès de la communauté scientifique française en lui permettant d'acquérir ces données satellitaires à un tarif préférentiel.

Annexe 4 : Classes d'occupation de sol potentielles et définitions

Catégorie	Classe	Définition
Plantation		Sites sylvicoles et arboricoles
	Palmier	à palmiers à huile (<i>Elaeis guineensis</i>)
	Cocotiers	à cocotiers (<i>Cocos nucifera</i>)
	Teck	à teck (<i>Tectona grandis</i>)
	Eucalyptus	à eucalyptus (<i>Eucalyptus sp.</i>)
	Bananier	à bananiers (<i>Musa sp.</i>)
	Ananas	à ananas (<i>Ananas comosus</i>)
	Oranger	à tangelo (<i>Citrus xtangelo</i>)
	Papayer Manguier	à papayer (<i>Carica papaya</i>) à manguiers (<i>Mangifera indica</i>)
Culture		Sites horticoles et agricoles
	Maraîchage	à légumes et fruits (sauf arbres), irrigués
	Maïs	à maïs
	Manioc	à manioc
	Haricot	à haricots
	Patate Arachide	à patates douces à arachide
Forêt		Forêt non inféodées aux zones humides (non inondables)
	Friche (jachère)	Zones agricoles laissées en jachère et colonisé par un peuplement dense arbustif et peu pénétrable
	Dense Fourré	Forêt dense primaire ou secondaire Type de végétation arbustif fermé, unistrate ou avec une strate arborée très discontinue, généralement peu pénétrable, souvent morcelé, à tapis herbacé absent ou discontinu
Savane		Formation herbeuse comportant une strate herbacée supérieure d'au moins 80 cm de hauteur qui influence une strate inférieure
	Boisée	où arbres et arbustes forment un couvert clair et continu
	Arborée	où arbres et arbustes sont disséminés
	Arbustive	où seuls les arbustes sont présents
	Herbeuse	sans arbres ni arbustes
Zone humide		Zone inondé de manière permanente ou temporaire
	Eau permanente Prairie aquatique	Zone d'eaux profondes Formation fermée constituée principalement de graminées et cypéracées en eaux profondes

Prairie marécageuse	Formation fermée constituée principalement de graminées et cypéracées en eaux peu profondes ou fréquemment inondées
Mangrove	Formation ligneuse à palétuviers dans les zones de balancement de marée (eaux saumâtres)
Forêt marécageuse	Formation forestière des zones inondées de manière permanente ou fréquente
Forêt ripicole	Formation forestière des bords de cours d'eau, temporairement inondées

Milieu dégradé

Bâti
Sol nu

Sable sec
Piste
Roche

Milieus non végétalisés

Milieus construits (villages)
Sols nu dégradés ou sols nu agricoles
Sols recouverts de sable
Voies de circulation en terre
Affleurements rocheux

Annexe 5 : Code pour extraire les températures moyennes dans le voisinage des villages d'après des images MODIS-LST

```
#Script to extract mean temperature in buffer around points
#from MODIS 8-Days LST raster and a table of date (survey) at each points
#
#created on: January 2012
#By Nicolas Moiroux
#From Institut de Recherche pour le Développement
#    Montpellier, France

#-----
#-----

# Import system modules
import sys, string, os, arcpy, traceback
from arcpy.sa import *
from arcpy import env
from datetime import timedelta, datetime
# Verification de Spatial analyst
arcpy.CheckOutExtension("spatial")

#-----
#-----

#Settings
#Emplacement de la table contenant les identifiant des points
(Village_abr), les codes d'enquête (NumMis) et les dates d'enquête
(Date_dbt) (sans '/' final)
sDateDbt = "C:/ArcgisWork/MODIS.mdb/DateDbt"
#Emplacement des rasters MODIS (sans '/' final), Les fichier rasters
doivent porter leur nom original
(MOD11A2.Aaaaajjj.h18[.....]LST_Day_1km.tif)
sTiffFolder = "C:/ArcgisWork/TIFF"
#Emplacement du fichier de forme contenant les point des lieux d'enquête
(Villages) avec comme identifiant unique le champs 'Abrege'
sPointsShpFile = "C:/ArcgisWork/XYHameaux_REFS.shp"
#Identifiant des Points
sIdPoint = "Abrege"
#Dossier dans lequel seront créés l'ensemble des fichiers pouvant être
supprimer ensuite (avec '/' final)
sTempFolder = "C:/ArcgisWork/Temp/"
#Table contenant les résultats finaux
final_output = "C:/ArcgisWork/Results.dbf"
#definir le nombre de jour entre la période d'intérêt et l'enquête
dNbJour = timedelta(days = 0)
#Liste des rayons de zone tampon (en metres) qui seront analysées
lListBuffer = ["2000","1000","500"]

#-----
#-----

#FONCTIONS USED IN THE PROGRAM

#Obtenir le jour 1 du fichier MODIS (au format integer) à partir d'une date
au format datetime
def DateToYday (sDate):
    #Obtenir le numero du jour de début de mission dans l'année à partir
d'une date au format datetime
    dDmis = sDate
```



```

    t = dDmis.timetuple()
    iDmis = t.tm_yday
    #obtenir le numéro du jour correspondant au jour 1 du fichier MODIS
    (au format integer)
    iJour1 = int(round(iDmis/8)*8+1)
    return iJour1

#Obtenir l'année (au format string) à partir d'une date au format datetime
def DateToStrYear (sDate):
    dDmis = sDate
    t = dDmis.timetuple()
    iYear = t.tm_year
    sYear = str(iYear)
    return sYear

#Obtenir le numéro du fichier MODIS (format string ex: '029')
def IntToStrYday (iModisInteger):
    #Ajouter les zero non significatifs devant le numéro du fichier modis
    (au format string) 18 -> '018'
    from bisect import bisect_left
    sZeroList = ["00", "0", ""]
    iModisBound = [10, 100, 400]
    sZero = sZeroList[bisect_left(iModisBound, iModisInteger)]
    sModisStr = sZero + str(iModisInteger)
    return sModisStr

#obtenir le chemin du raster en fonction du dossier contenant et du numéro
du jour
def RasterFromYday (sNumJour,ListOfRaster,sYear):
    #recherche du raster correspondant:
    for raster in ListOfRaster:
        #récupérer dans le chemin d'un raster modis le numero du jour 1 et le
        comparer à sModis
        if raster[raster.rfind("/")+2:raster.rfind("/")+ 9] == sYear +
sNumJour:
            #récupérer le nom du raster
            sRast_temp = raster
            #...
            break
    else:
        continue

    return sRast_temp

#vérifier l'existence du raster Grid ou Créer un raster au format GRID
(avec 0 = NoData)
def VerifyGridOrCreate(sGridPath, sGridName, sRasterPath):
    if not arcpy.Exists(sGridPath + sGridName):
        try:
            arcpy.CopyRaster_management(sRasterPath,sGridPath +
sGridName,"#", "#", "0", "NONE", "NONE", "#")
            return True
        except:
            print "Error in Create GRID Raster " + sGridPath +
sGridName + " from " + sRasterPath + "
            traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)
            return False
    else:
        return True

```

```

#-----
#-----

# Open a searchcursor / pour lire la table des dates d'enquête
rows = arcpy.SearchCursor(sDateDbt)

# Faire une liste des raster dans un dossier
# Set the current workspace
env.workspace = sTiffFolder
# Get a list of ESRI GRIDS from the workspace
rasterList = arcpy.ListRasters("*","All")
env.workspace = ""
tablelist=""
#Compteur
iNbRow = int(arcpy.GetCount_management(sDateDbt).getOutput(0))
n = 0

# Iterate through the rows in the cursor
for row in rows:
    # Récupérer l'identifiant du village, de l'enquête et la date
    sAbr = row.Village_abr
    sMiss = str(int(row.NumMis))
    # retrancher la durée entre la date d'intérêt des données et la date
de l'enquête
    dDateDbt = row.Date_dbt - dNbJour
    # obtenir l'année du fichier recherché
    sYear = DateToStrYear(dDateDbt)
    # Obtenir le jour 1 du fichier MODIS (au format integer) à partir
d'une date au format datetime.datetime
    iModis = DateToYday(dDateDbt)
    # Obtenir le numéro du fichier MODIS (format string ex: '029')
    sModis = IntToStrYday(iModis)
    # Obtenir le chemin du raster MODIS
    sRasterPath = RasterFromYday(sModis,rasterList,sYear)
    # Définir le nom du GRID après conversion du raster MODIS
    sGridName =
sRasterPath[sRasterPath.rfind("/")+2:sRasterPath.rfind("/")+9]

    # Vérification de l'existence du fichier contenant le Points
selectionné
    if not arcpy.Exists(sTempFolder + sAbr + ".shp"):
        try:
            # Sélection du Point
            arcpy.Select_analysis(sPointsShpFile, sTempFolder + sAbr
+ ".shp", '"Abrege" = \'' + sAbr + '\\'')
            for b in lListBuffer:
                try:
                    # Création des Buffers
                    arcpy.Buffer_analysis(sTempFolder + sAbr +
".shp", sTempFolder + sAbr + b + ".shp", b + " Meters")
                except:
                    print "Error in create Buffer " + sTempFolder +
sAbr + b + ".shp on " + sTempFolder + sAbr + ".shp"
                    traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)
                except:
                    print "Error in Select " + '"Abrege" = \'' + sAbr + '\\'
+ " in " + sPointsShpFile
                    traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)

```

```

# vérifier l'existence du raster Grid ou Créer un raster au format
GRID (avec 0 = NoData)
if VerifyGridOrCreate(sTempFolder, sGridName,
sTiffFolder+"/"+sRasterPath):
    # calculer les statistique zonale pour chaque taille de Buffer
    for b in lListBuffer:
        sB = str(b)
        outTable = sAbr + sMiss + sB
        try:
            ZonalStatisticsAsTable(sTempFolder + sAbr + sB +
".shp", sIdPoint, sTempFolder + sGridName, sTempFolder + outTable, "DATA",
"MEAN")
        except:
            print "Error in ZonalStatisticAsTable when using "
+ sTempFolder + sAbr + sB + ".shp and " + sTempFolder + sGridName
            #print "*** print_exception:"
            #traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)
            # Vérification de la présence d'un valeur dans outTable
(l'absence de valeur signifie qu'il n'y a que des NoData dans le buffer)
            if int(arcpy.GetCount_management(sTempFolder +
outTable).getOutput(0)) == 0:
                # supprimer la table et sortir de la boucle
                arcpy.Delete_management(sTempFolder + outTable)
                break

            # Add a field to this table to be able to know with wich
raster the statistics have been calculated, of type TEXT
            arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable,
"SOURCE" , "TEXT", "", "", "10")
            arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable, "MISS"
, "TEXT", "", "", "2")
            arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable,
"BUFFER" , "LONG")
            arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable, "TempC"
, "DOUBLE")
            arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"SOURCE" ,"\" + sAbr + sMiss + sB + "\", "PYTHON")
            arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"MISS" ,"\" + sMiss + "\", "PYTHON")
            arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"BUFFER" ,"\" + b + "\", "PYTHON")
            arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"TempC", "!MEAN!*0.02-273.15", "PYTHON")

            #create a list of output table for the next operation in
the following format: "table1;table2;table3;..."
            if tablelist == "":
                tablelist = sTempFolder + outTable
            else:
                tablelist = tablelist + ";" + sTempFolder +
outTable

            #Compteur
            n= n + 1
            fProp = n/float(iNbRow)*100
            print "%.2f" %(fProp), "% done, making final table"

```

```
#copy row of the first table of the list to a new table and create this
table (final output table)
arcpy.MakeTableView_management(tablelist[0:tablelist.find(";")],
"temp_table")
arcpy.CopyRows_management(tablelist[0:tablelist.find(";")],final_output,"te
mp_table")
#Append all other tables rows into the final output table
arcpy.Append_management(tablelist[tablelist.find(";")+1:len(tablelist)],
final_output, "NO_TEST")
print "DONE"
```

Annexe 6 : Code pour extraire les NDVI moyens dans le voisinage des villages d'après des images MODIS-NDVI

```
#Script to extract mean NDVI in buffer around points
#from MODIS 16-Days MOD13Q1 raster and a table of date (survey) at each
points
#
#created on: January 2012
#By Nicolas Moiroux
#From Institut de Recherche pour le Développement
#    Montpellier, France

#-----
#-----

# Import system modules
import sys, string, os, arcpy, traceback
from arcpy.sa import *
from arcpy import env
from datetime import timedelta, datetime
# Verification de Spatial analyst
arcpy.CheckOutExtension("spatial")

#-----
#-----

#Settings
#Emplacement de la table contenant les identifiant des points
(Village_abr), les codes d'enquête (NumMis) et les dates d'enquête
(Date_dbt) (sans '/' final)
sDateDbt = "C:/ArcgisWork/MODIS.mdb/DateDbt"
#Emplacement des rasters MODIS (sans '/' final), Les fichier rasters
doivent porter leur nom original
(MOD11A2.Aaaaajjj.h18[.....]LST_Day_1km.tif)
sTiffFolder = "C:/ArcgisWork/TIFF"
#Emplacement du fichier de forme contenant les point des lieux d'enquête
(Villages) avec comme identifiant unique le champs 'Abrege'
sPointsShpFile = "C:/ArcgisWork/XYHameaux_REFS.shp"
#Identifiant des Points
sIdPoint = "Abrege"
#Dossier dans lequel seront créés l'ensemble des fichiers pouvant être
supprimer ensuite (avec '/' final)
sTempFolder = "C:/ArcgisWork/Temp/"
#Table contenant les résultats finaux
final_output = "C:/ArcgisWork/ResultsNDVI.dbf"
#definir le nombre de jour entre la période d'intérêt et l'enquête
dNbJour = timedelta(days = 0)
#Liste des rayons de zone tampon (en metres) qui seront analysées
lListBuffer = ["2000","1000","500"]

#-----
#-----

#FONCTIONS USED IN THE PROGRAM

#Obtenir le jour 1 du fichier MODIS (au format integer) à partir d'une date
au format datetime
def DateToYday (sDate):
    #Obtenir le numero du jour de début de mission dans l'année à partir
d'une date au format datetime
```

```

    dDmis = sDate
    t = dDmis.timetuple()
    iDmis = t.tm_yday
    #obtenir le numéro du jour correspondant au jour 1 du fichier MODIS
    (au format integer)
    iJour1 = int(round(iDmis/16)*16+1)
    return iJour1

#Obtenir l'année (au format string) à partir d'une date au format datetime
def DateToStrYear (sDate):
    dDmis = sDate
    t = dDmis.timetuple()
    iYear = t.tm_year
    sYear = str(iYear)
    return sYear

#Obtenir le numéro du fichier MODIS (format string ex: '029')
def IntToStrYday (iModisInteger):
    #Ajouter les zero non significatifs devant le numéro du fichier modis
    (au format string) 18 -> '018'
    from bisect import bisect_left
    sZeroList = ["00", "0", ""]
    iModisBound = [10, 100, 400]
    sZero = sZeroList[bisect_left(iModisBound, iModisInteger)]
    sModisStr = sZero + str(iModisInteger)
    return sModisStr

#obtenir le chemin du raster en fonction du dossier contenant et du numéro
du jour
def RasterFromYday (sNumJour,ListOfRaster,sYear):
    #recherche du raster correspondant:
    for raster in ListOfRaster:
        #récupérer dans le chemin d'un raster modis le numero du jour 1 et le
        comparer à sModis
        if raster[raster.rfind("/")+2:raster.rfind("/")+ 9] == sYear +
sNumJour:
            #récupérer le nom du raster
            sRast_temp = raster
            #...
            break
    else:
        continue

    return sRast_temp

#vérifier l'existence du raster Grid ou Créer un raster au format GRID
(avec 0 = NoData)
def VerifyGridOrCreate(sGridPath, sGridName, sRasterPath):
    if not arcpy.Exists(sGridPath + sGridName):
        try:
            arcpy.CopyRaster_management(sRasterPath,sGridPath +
sGridName,"#", "#", "-3000", "NONE", "NONE", "#")
            return True
        except:
            print "Error in Create GRID Raster " + sGridPath +
sGridName + " from " + sRasterPath + "
            traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)
            return False
    else:

```

```

        return True

#-----
#-----

# Open a searchcursor / pour lire la table des dates d'enquête
rows = arcpy.SearchCursor(sDateDbt)

# Faire une liste des raster dans un dossier
# Set the current workspace
env.workspace = sTiffFolder
# Get a list of ESRI GRIDS from the workspace
rasterList = arcpy.ListRasters("*","All")
env.workspace = ""
tablelist=""
#Compteur
iNbRow = int(arcpy.GetCount_management(sDateDbt).getOutput(0))
n = 0

# Iterate through the rows in the cursor
for row in rows:
    # Récupérer l'identifiant du village, de l'enquête et la date
    sAbr = row.Village_abr
    sMiss = str(int(row.NumMis))
    # retrancher la durée entre la date d'intérêt des données et la date
de l'enquête
    dDateDbt = row.Date_dbt - dNbJour
    # obtenir l'année du fichier recherché
    sYear = DateToStrYear(dDateDbt)
    # Obtenir le jour 1 du fichier MODIS (au format integer) à partir
d'une date au format datetime.datetime
    iModis = DateToYday(dDateDbt)
    # Obtenir le numéro du fichier MODIS (format string ex: '029')
    sModis = IntToStrYday(iModis)
    # Obtenir le chemin du raster MODIS
    sRasterPath = RasterFromYday(sModis,rasterList,sYear)
    # Définir le nom du GRID après conversion du raster MODIS
    sGridName =
sRasterPath[sRasterPath.rfind("/")+2:sRasterPath.rfind("/")+9]

    # Vérification de l'existence du fichier contenant le Points
selectionné
    if not arcpy.Exists(sTempFolder + sAbr + ".shp"):
        try:
            # Sélection du Point
            arcpy.Select_analysis(sPointsShpFile, sTempFolder + sAbr
+ ".shp", '"Abrege" = \'' + sAbr + '\')
            for b in lListBuffer:
                try:
                    # Création des Buffers
                    arcpy.Buffer_analysis(sTempFolder + sAbr +
".shp", sTempFolder + sAbr + b + ".shp", b + " Meters")
                except:
                    print "Error in create Buffer " + sTempFolder +
sAbr + b + ".shp on " + sTempFolder + sAbr + ".shp"
                    traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)
                except:
                    print "Error in Select " + '"Abrege" = \'' + sAbr + '\'
+ " in " + sPointsShpFile

```

```

        traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)

        # vérifier l'existence du raster Grid ou Créer un raster au format
GRID (avec 0 = NoData)
        if VerifyGridOrCreate(sTempFolder, sGridName,
sTiffFolder+"/"+sRasterPath):
            # calculer les statistique zonale pour chaque taille de Buffer
for b in lListBuffer:
                sB = str(b)
                outTable = sAbr + sMiss + sB
                try:
                    ZonalStatisticsAsTable(sTempFolder + sAbr + sB +
".shp", sIdPoint, sTempFolder + sGridName, sTempFolder + outTable, "DATA",
"MEAN")
                except:
                    print "Error in ZonalStatisticAsTable when using "
+ sTempFolder + sAbr + sB + ".shp and " + sTempFolder + sGridName
                    #print "*** print_exception:"
                    #traceback.print_exception(exc_type, exc_value,
exc_traceback,limit=2, file=sys.stdout)
                    # Vérification de la présence d'un valeur dans outTable
(l'absence de valeur signifie qu'il n'y a que des NoData dans le buffer)
                    if int(arcpy.GetCount_management(sTempFolder +
outTable).getOutput(0)) == 0:
                        # supprimer la table et sortir de la boucle
arcpy.Delete_management(sTempFolder + outTable)
                        break

                    # Add a field to this table to be able to know with wich
raster the statistics have been calculated, of type TEXT
                    arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable,
"SOURCE" , "TEXT", "", "", "10")
                    arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable, "MISS"
, "TEXT", "", "", "2")
                    arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable,
"BUFFER" , "LONG")
                    arcpy.AddField_management(sTempFolder + outTable, "NDVI"
, "DOUBLE")
                    arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"SOURCE" ,"\" + sAbr + sMiss + sB + "\", "PYTHON")
                    arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"MISS" ,"\" + sMiss + "\", "PYTHON")
                    arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"BUFFER" ,"\" + b + "\", "PYTHON")
                    arcpy.CalculateField_management(sTempFolder + outTable,
"NDVI", "!MEAN!*0.0001", "PYTHON")

                    #create a list of output table for the next operation in
the following format: "table1;table2;table3;..."
                    if tablelist == "":
                        tablelist = sTempFolder + outTable
                    else:
                        tablelist = tablelist + ";" + sTempFolder +
outTable

                    #Compteur
                    n= n + 1
                    fProp = n/float(iNbRow)*100
                    print "%.2f" %(fProp), "% done, making final table"

```



```
#copy row of the first table of the list to a new table and create this
table (final output table)
arcpy.MakeTableView_management(tablelist[0:tablelist.find(";")],
"temp_table")
arcpy.CopyRows_management(tablelist[0:tablelist.find(";")],final_output,"te
mp_table")
#Append all other tables rows into the final output table
arcpy.Append_management(tablelist[tablelist.find(";")+1:len(tablelist)],
final_output, "NO_TEST")
print "DONE"
```

Annexe 7 : Code pour extraire des cumuls de précipitations interpolées d'après des stations pluviométriques ou des points TRMM (langage Python)

```
#Script to extract rainfall value in different points
#Daily rainfall data from station are added (between 2 dates, relative to a
survey date)and interpolated using IDW.
#Predicted values of rainfall at the points of the surveys are computed in
a table
#
#created on: June 2011
#By Nicolas Moiroux
#From Institut de Recherche pour le Développement
#    Montpellier, France

#-----
#-----

# Import system modules
import sys, string, os, arcpy, traceback
from arcpy.sa import *
from arcpy import env
from datetime import timedelta, datetime
# Verification de Spatial analyst
arcpy.CheckOutExtension("spatial")

#-----
#-----

#Settings
#Emplacement pour les tables qui vont subir les calculs (obligatoirement
une géodatabase)
sGDBpath = "C:/ArcgisWork/Meteo/DMN.mdb/"
#Emplacement de la table contenant les identifiant des points
(Village_abr), les codes d'enquête (NumMis) et les dates d'enquête
(Date_dbt) (sans '/' final)
sDateDbt = "C:/ArcgisWork/Meteo/DMN.mdb/DateDbt"
#Emplacement du shp contenant les stations de mesure des précipitation
sShpStation = "C:/ArcgisWork/Meteo/DMN.mdb/DMN"
#Emplacement de la table contenant les mesures journalières des
précipitation pour toutes les stations
sTabPrec = "C:/ArcgisWork/Meteo/DMN.mdb/Rain_DMN"

#Emplacement du fichier de forme contenant les point des lieux d'enquête
(Villages) avec comme identifiant unique le champs 'Abrege'
sPointsShpFile = "C:/ArcgisWork/Meteo/XYHameaux_REFS.shp"
#Identifiant des Points
sIdPoint = "Abrege"
#Dossier dans lequel seront créés les raster et shp (avec '/' final)
sTempFolder = "C:/ArcgisWork/Meteo/Temp/"
#Table contenant les résultats finaux
final_output = "C:/ArcgisWork/Meteo/DMN.mdb/Results_Prec"
#définir la période d'intérêt par rapport à la date d'enquête
td1 = timedelta(days = 16)
td2 = timedelta(days = 1)

#-----
#-----

# Open a searchcursor / pour lire la table des dates d'enquête
rows = arcpy.SearchCursor(sDateDbt)
```

```

#Liste des table temporaire de résultat servant à la construction de la
table finale
tablelist=""

#Créer une layer sur le shp des stations de mesure
arcpy.MakeFeatureLayer_management ( sShpStation, "stations")
#Compteur
iNbRow = int(arcpy.GetCount_management(sDateDbt).getOutput(0))
n = 0

# Iterate through the rows in the cursor
for row in rows:
    #Récupérer l'identifiant du village, de l'enquête et la date
    sAbr = row.Village_abr
    sMiss = str(int(row.NumMis))
    #Définir la date 1 et la date 2 pour le cumul des précipitations
    dDate1 = row.Date_dbt - td1
    dDate2 = row.Date_dbt - td2
    sDate1 = dDate1.strftime("%Y/%m/%d")
    sDate2 = dDate2.strftime("%Y/%m/%d")
    #définir le nom et chemin de la table de destination des stats
zonales
    outTable = sTempFolder + sAbr + sMiss
    #définir le nom du raster d'interpolation
    sKriging = sTempFolder + "IDW" + sAbr + sMiss

    #faire une sélection sur la table Rain_ entre les dates 1 et 2
    arcpy.TableSelect_analysis(sTabPrec,sGDBpath + "Sel" + sAbr +
sMiss,"[date] BETWEEN #" + sDate1 + "# AND #" + sDate2 + "#")
    #Requete permettant de faire la somme par stations
    arcpy.Statistics_analysis(sGDBpath + "Sel" + sAbr + sMiss,sGDBpath +
"Sum" + sAbr + sMiss,"Rain SUM","Point")

    #Parcourir les sommes par station, si toutes les stations sont à zero
mm, ne pas faire lm'interpolation.
    rows2 = arcpy.SearchCursor(sGDBpath + "Sum" + sAbr + sMiss)
    iSum = 0
    for row2 in rows2:
        iRain = row2.SUM_Rain
        if iRain != None:
            iSum = int(iSum) + int(iRain)
    if iSum == 0:
        n= n + 1
        continue

    #Lier la table contenant les sommes par station au fichier de forme
des stations
    arcpy.AddJoin_management("stations","Point",sGDBpath + "Sum" + sAbr +
sMiss,"Point","KEEP_ALL")
    #Interpolation
    #arcpy.gp.Kriging_sa("stations", "Sum" + sAbr + sMiss + ".SUM_Rain",
sKriging, "Spherical 250.785943", "250.785942592919", "VARIABLE 12")
    arcpy.gp.Idw_sa("stations","Sum" + sAbr + sMiss +
".SUM_Rain",sKriging,"250.785942592919","2","VARIABLE 12","#")
    #Suppression de la jointure
    arcpy.RemoveJoin_management("stations", "Sum" + sAbr + sMiss)

    #Contrôler l'existence du shp du point d'intérêt, sinon le créer
    if not arcpy.Exists(sTempFolder + sAbr + ".shp"):
        arcpy.Select_analysis(sPointsShpFile, sTempFolder + sAbr +
".shp", "'Abrege" = \'\' + sAbr + '\')

```

```

#Statistique zonales
ZonalStatisticsAsTable(sTempFolder + sAbr +
".shp",sIdPoint,sKriging,outTable,"DATA","MEAN")
#Ajout d'un champs contenant le code l'enquête
arcpy.AddField_management(outTable, "MISS" , "TEXT", "", "", "2")
arcpy.CalculateField_management(outTable, "MISS" ,"\\" + sMiss +
"\\"", "PYTHON")

#create a list of output table for the next operation in the
following format: "table1;table2;table3;..."
if tablelist == "":
    tablelist = outTable
else:
    tablelist = tablelist + ";" + outTable

#Compteur
n= n + 1
fProp = n/float(iNbRow)*100
print "%.2f" %(fProp), "percent done"
#if n == 15: break

#copy row of the first table of the list to a new table and create this
table (final output table)
print "compute final table..."
arcpy.MakeTableView_management(tablelist[0:tablelist.find(";")],
"temp_table")
arcpy.CopyRows_management(tablelist[0:tablelist.find(";")],final_output,"te
mp_table")
#Append all other tables rows into the final output table
arcpy.Append_management(tablelist[tablelist.find(";")+1:len(tablelist)],
final_output, "NO_TEST")
print "DONE !"

```

Articles

Article 1 : 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 in Parasitology* 2011, **27**:91-98.

Article 2 : Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, **Moiroux N**, Banganna S, Corbel V, N'Guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto M: Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malaria Journal* 2010, **9**:83.

Article 3 : Corbel V, Akogbeto M, Damien G, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, **Moiroux N**, Chabi J, Banganna B, Padonou G, Henry M-C: Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomized controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* 2012, **12**:617-626.

Article 4 : Djenontin A, Bio-Bangana S, **Moiroux N**, Henry M.C, Bousari O., Chabi J, Osse R, Koudenoukpo S, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F: Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasites & Vectors* 2010, **3**:83.

Article 5 : **Moiroux N**, Bousari O, Djènontin A, Damien G, Cottrell G, Henry M-C, Guis H, Corbel V: Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. *PLoS One* 2012; **7**(1): e30558.

Article 6 : Bousari O., **Moiroux N.**, Iwaz J., Djenontin A, Bangana ASB, Corbel V, Fonton N, Ecochard R: Use of a mixture statistical modeling in studying malaria vectors density. *Plos One* 2012; **7**(11): e50452.

Article 7 : **Moiroux N.**, Bangana A.S.B., Djènontin A., Chandre F., Corbel V., Guis H., Modeling the risk of being bitten by malaria vectors in a vector control area in south Benin, West Africa. *Parasites & Vectors (Submitted)* 2013

Article 8 :

Moiroux N, Gomez B.M., Pennetier C., Elanga E., Djenontin A., Djegbe I., Chandre F., Guis H., Corbel V., Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *The Journal of Infectious Diseases* 2012; **206** (10), 1622-9

Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control?

Hilary Ranson¹, Raphael N'Guessan^{2,5}, Jonathan Lines³, Nicolas Moiroux^{4,5}, Zinga Nkuni³ and Vincent Corbel^{4,5}

¹ Vector Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, UK, L3 5QA

² London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London, UK, WC1E 7HT, UK

³ Global Malaria Programme (GMP), World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland

⁴ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), RU016 « Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs », 01 BP 4414, Cotonou, Benin

⁵ Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Laboratoire National, Ministère de la Santé, Cotonou 06 BP 2604, Benin

The use of pyrethroid insecticides in malaria vector control has increased dramatically in the past decade through the scale up of insecticide treated net distribution programmes and indoor residual spraying campaigns. Inevitably, the major malaria vectors have developed resistance to these insecticides and the resistance alleles are spreading at an exceptionally rapid rate throughout Africa. Although substantial progress has been made on understanding the causes of pyrethroid resistance, remarkably few studies have focused on the epidemiological impact of resistance on current malaria control activities. As we move into the malaria eradication era, it is vital that the implications of insecticide resistance are understood and strategies to mitigate these effects are implemented.

The importance of pyrethroid insecticides for malaria control

Insecticide treated nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS) are the cornerstone of malaria control programmes, [1] and high coverage with either of these interventions can result in a dramatic reduction in malaria associated morbidity and mortality [2,3]. The success of these tools has contributed towards the optimism that elimination of malaria as a public health problem in the African continent is a feasible objective [4].

Unfortunately the public health pesticide products market has suffered from massive under investment with the result that there have been no new classes of active ingredients available for wide scale public health applications for more than 30 years. Hence the emergence of resistance to the majority of existing insecticides is in danger of undermining the contribution of vector control efforts.

Malaria vector control is currently very dependant on a single class of insecticides, the pyrethroids. These insecticides are the only class approved for use on insecticide treated nettings [5] and are being increasingly deployed in IRS programmes in Africa. Pyrethroids are also widely used in the control of agricultural pests worldwide [6].

There has been a dramatic increase in reports of pyrethroid resistance in malaria vectors over the past decade [7], but few studies have addressed the impact this is having on malaria control; controversy still remains about the epidemiological significance of current levels of resistance in Sub-Saharan Africa. Current understanding of the mechanisms responsible for pyrethroid resistance in malaria vectors are outlined below and alternative methods of resistance monitoring critically appraised. The current distribution of pyrethroid resistance in malaria vectors in Africa and the available evidence on the entomological and epidemiological impact of this resistance are reviewed.

Resistance

Typically two major mechanisms are assumed to be responsible for insecticide resistance (Box 1): changes in the insecticide target site that reduce its binding and increases in the rate of insecticide metabolism that lower the amount of insecticide reaching the target site. Of these, target site resistance is the best understood type of resistance mechanism, and molecular diagnostics to detect this resistance mechanism are now integrated into insecticide resistance monitoring strategies in some malaria control programmes [8,9]. Metabolic resistance is more complex, but recent advances have identified key enzymes responsible for insecticide detoxification, paving the way for the development of molecular markers for this type of resistance mechanism. Although these two mechanisms clearly play a major role in conferring pyrethroid resistance, consideration of other physiological or behavioural changes in the mosquito population that might impact on the efficacy of pyrethroid insecticides is also important. Two potential mechanisms that have been long recognised, but whose importance in malaria vectors has been largely overlooked are cuticular and behavioural resistance (Box 1).

Target site resistance

The pyrethroid insecticides (and the organochlorine insecticide DDT) target the voltage-gated sodium channel on the insects' neurons [10]. Insecticide binding delays the closing of the sodium channel prolonging the action potential and

Corresponding author: Corbel, V. (Vincent.corbel@ird.fr).

Box 1. Definitions of resistance

Insecticide resistance (WHO): defined as the ability of an insect to withstand the effects of an insecticide by becoming resistant to its toxic effects by means of natural selection and mutations.

Operational (field) resistance (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC): defined as a heritable change in the sensitivity of a pest population that is reflected in the repeated failure of a product to achieve the expected level of control when used according to the label recommendation for that pest species.

Multiple resistance: occurs when insects develop resistance to several compounds by expressing multiple resistance mechanisms. The different resistance mechanisms can combine to provide resistance to multiple classes of products.

Cross resistance: occurs when a resistance mechanism, which allows insects to resist one insecticide, also confers resistance to another insecticide. Cross resistance can occur between insecticides from different chemical classes.

Phenotypic resistance: expression of a resistance gene on an insect life history trait (e.g. survival rate, knock down, etc.).

Target site resistance: changes in the sensitivity of insecticide target due to non-silent point mutations.

Metabolic resistance: overexpression of enzymes capable of detoxifying or sequestering insecticides and/or amino acid substitutions within these enzymes which alter the affinity of the enzyme for the insecticide.

Behavioural resistance: describes any modification in insect behaviour that helps to avoid the contact and/or lethal effects of the insecticides.

Cuticular resistance: modifications in the insect cuticle and/or digestive tract linings that prevent or slow down the absorption or penetration of insecticides.

causing repetitive neuron firing, paralysis and eventual death of the insect. Alterations in the target site that cause resistance to insecticides are often referred to as knock-down resistance (*kdr*) in reference to the ability of insects with these alleles to withstand prolonged exposure to insecticides without being 'knocked-down.' Several mutations in the sodium channel have been associated with resistance to pyrethroids in a variety of insects [10]. One of the most common amino acid replacements, and so far the only residue associated with pyrethroid resistance in malaria vectors, is a substitution of the leucine residue found at codon 1014 with either phenylalanine (1014F) or serine (1014S). Interestingly, residue 1014 does not appear to interact directly with the insecticide but is predicted to alter channel activation kinetics [11].

The relationship between the *kdr* genotype and the resistance phenotype in malaria vectors has recently been extensively reviewed and will not be discussed in detail here [12]. In summary, it is clear that *kdr* is associated with resistance to pyrethroids and DDT, but it is not evident that the presence of this resistance allele alone is sufficient to result in control failure.

Metabolic resistance

Metabolic resistance occurs when elevated activities of one or more enzymes results in a sufficient proportion of the insecticide being sequestered or detoxified before it reaches the target site to impair the toxicity of the insecticide. The cytochrome P450s are the primary enzyme family responsible for pyrethroid metabolism in insects [13]. There are 111 P450 enzymes in *Anopheles gambiae* [14] and, as in other insects, only a small number of these enzymes are capable of detoxifying insecticides. Microarray-based

approaches have identified three 'candidate' P450 genes that were found to be repeatedly over expressed in pyrethroid resistant populations of *An. gambiae*: *cyp6m2*, *cyp6p3* and *cyp6z2* [15–17]. All of these genes encode for enzymes that are able to bind to pyrethroid insecticides, but only CYP6P3 and CYP6M2 can metabolise the insecticide [17,18]. Interestingly recent studies in *Anopheles funestus* have identified the putative ortholog of *An. gambiae* *cyp6p3*, *cyp6p9*, as being the prime candidate for conferring pyrethroid resistance in this species [19]. Functional genomics approaches are needed to conclusively demonstrate their role in resistance.

Other enzyme families might also play a secondary role in pyrethroid resistance by, for example, protecting from pyrethroid exposure induced oxidative stress [20], detoxifying secondary products of P450 based metabolism [21], or binding insecticides to lower the total *in vivo* concentration of insecticide [22]. The contribution that these enzymes make towards the pyrethroid resistance phenotype in malaria vectors is yet to be elucidated.

The absence of molecular markers for metabolic resistance makes it difficult to directly assess the impact of this resistance on vector control interventions. The situation is complicated by the co-occurrence of *kdr* and metabolic resistance in many vector populations. However, the population of malaria vectors that has proved most intransigent to control with pyrethroid insecticides is *An. funestus* from Southern Mozambique [23]. Target site resistance is not found in this population, and instead, resistance appears to be caused by the massive overexpression of a small number of P450 enzymes [19]. Extensive efforts are underway to identify the causal mutations associated with metabolic resistance to pyrethroids in the major malaria vectors [24].

Cuticular resistance

Reduced uptake of insecticide, often referred to as cuticular resistance, is frequently described as a minor resistance mechanism. Certainly for pests where the major route of insecticide delivery is via ingestion, this is likely to be the case. However, for malaria control, where insecticides are typically delivered on bed nets or on wall surfaces, uptake of insecticides is primarily through the appendages. Hence an increase in the thickness of the tarsal cuticle, or a reduction in its permeability to lipophilic insecticides, could have a major impact on the bioavailability of insecticide *in vivo*. Intriguingly microarray experiments have identified two genes, *cplcg3* and *cplcg4*, encoding cuticular proteins that are upregulated in pyrethroid resistant strains of *Anopheles* mosquitoes from three populations and two species [25,26]. Clearly much more work is required in order to identify the significance of cuticular resistance.

Behavioural resistance

There have been several anecdotal reports of mosquitoes changing their behaviour as a result of intensive indoor use of insecticides, but there is currently insufficient data to assess whether these behavioural avoidance traits are genetic or adaptive responses [27]. Genetic changes in the malaria vector population that shifted feeding or

Box 2. Methods for detecting insecticide resistance

Currently most resistance monitoring is dependent on bioassays, using fixed insecticide concentrations and exposure times, and the data is reported as percentage mortality. The World Health Organisation (WHO) has defined diagnostic doses for most insecticides used in malaria control and produces susceptibility test kits consisting of exposure chambers and insecticide treated filter papers. Guidelines for test procedures and interpretation of results are available from the WHO (see <http://www.who.int/whopes/resistance/en/>). Although sim-

ple to perform, these diagnostic dose assays provide limited information and several alternative methods for detecting resistance are available (Table 1). These alternative assays generally detect specific resistance mechanisms, and should always be performed as an addition, not a substitute, to bioassays, to avoid the risk that unknown resistance mechanisms go undetected. It should be noted that none of the methods in Table 1 are suitable for detecting behavioural resistance.

Table 1. Alternative methods to detect insecticide resistance in mosquitoes

Method	Advantages	Disadvantages
Bioassays using WHO defined diagnostic doses of insecticide	Standardized, simple to perform, detect resistance regardless of mechanism	Lack sensitivity and provide no information about level and type of resistance (except when using with synergists)
Dose response bioassays	Provides data on level of resistance in population, regardless of mechanism	Require large numbers of live mosquitoes, and data from different groups not readily comparable
Biochemical assays to detect activity of enzymes associated with insecticide resistance	Provides information on specific mechanisms responsible for resistance	Requires material to be kept frozen. Not available for all resistance mechanisms, sensitivity and specificity issues for some assays (e.g. GST)
Molecular assays to detect resistant alleles	Very sensitive. Can detect recessive alleles and therefore provide an 'early warning' of future resistance.	Requires specialized and costly equipment. Only available for a limited number of resistance mechanisms.

resting behaviour to minimise contact with insecticides in the indoor environment could have a very dramatic impact on the efficacy of current malaria vector control interventions, potentially exceeding the impact of physiological resistance. There is a clear need for robust controlled studies to quantify the extent of this behavioural change and to assess whether scale-up of ITNs and/or IRS could increase the importance of outdoor transmission of malaria and necessitate new tools to target malaria vectors that are feeding, and/or resting, outdoors.

Cross-resistance pattern

Understanding patterns of cross resistance caused by alternative mechanisms is vital to the implementation of effective resistance management strategies. It is generally assumed that resistance renders the selecting insecticide, and all others with a similar mode of action, ineffective. For example, the high frequency of *kdr* mutations in malaria vectors is often attributed to extensive past use of DDT to control agricultural pests in Africa [28]. This assumption might hold true for target site resistance, but this is not necessarily the case for metabolic resistance mechanisms. CYP6P3 and CYP6M2 are efficient at detoxifying pyrethroids but current evidence suggests they do not metabolise DDT (Paine, personal communication). Furthermore, some P450 enzymes show specificity for either type I pyrethroids (those lacking a cyano group, such as permethrin) or type II pyrethroids (containing an alpha-cyano group, e.g. deltamethrin) [29]. In the alternative scenario, metabolic resistance might confer resistance to more than one class of insecticides. For example, a pyrethroid resistant strain of *An. funestus* from Mozambique shows cross resistance to carbamate insecticides, and synergist data suggests that cytochrome P450s are responsible for both phenotypes [30]. Whether the same enzyme is capable of metabolising both insecticide classes is currently unknown but this informa-

tion is clearly of key importance if rotations or mixtures with non pyrethroids are employed as part of a resistance management programme.

Detecting and reporting resistance

Regular monitoring for insecticide resistance is essential in order to react proactively to prevent insecticide resistance from compromising control. If the frequency of resistance alleles is allowed to build up unchecked, resistance can eventually become 'fixed' in the population as initial detrimental effects on the insect's fitness are overcome by compensatory mutations. Once resistance reaches very high levels, strategies to restore susceptibility are unlikely to be effective. Some alternative approaches for detecting insecticide resistance are described in Box 2.

In order to incorporate data from resistance monitoring into evidence based decisions on appropriate insecticide based interventions for malaria control, it is clearly essential that the data is both reliable and accessible. Although guidelines for conducting the various assays exist, there is little consensus on the number of sites and frequency with which resistance monitoring should occur [31]. It is clear that resistance is a dynamic trait, and wide fluctuations in resistance levels throughout the malaria transmission season have been reported [32]. Resistance can also be very focal, particularly when vector composition differs between sites [33], hence a minimum number of sampling sites should be established, taking into account patterns of vector distribution and insecticide usage.

The World Health Organisation African Network for Vector Resistance (ANVR) was established in 2000, and amongst its objectives was the important goal of improving the dissemination of resistance data. Accordingly, a database was established to store the results of resistance monitoring activities by ANVR members, but this database was not readily accessible by outside users. The recent

establishment of IRBase [34] as an online centralised resource for collating data on insecticide resistance in disease vectors, and the integration of this with the ANVR database, will hopefully ensure that both published and unpublished data on resistance in malaria vectors is more readily available to all interested parties.

Current status of pyrethroid resistance in African malaria vectors

The maps in Figure 1 summarise the current published literature on the distribution of pyrethroid resistance and their underlying mechanisms in malaria vectors in Africa. Bioassay data was available for 23 out of 49 African

countries investigated, but the distribution of data is not uniform (Figure 1a). Pyrethroid resistance in *An. gambiae* was first reported in Cote d'Ivoire in 1993 and is now widespread throughout the western [35,36] and central regions [7,37] of Africa. In Eastern and Austral Africa, *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* populations are mostly susceptible in Tanzania [38], Mozambique [39] and Madagascar [40], but pyrethroid resistance has been reported in Uganda [41,42], the Gwave region of Zimbabwe [43], Sudan [44,45] and Ethiopia [46,47].

There is a paucity of published data on insecticide resistance in *An. funestus*, but resistant populations have been reported in South Africa [23], Mozambique [30]

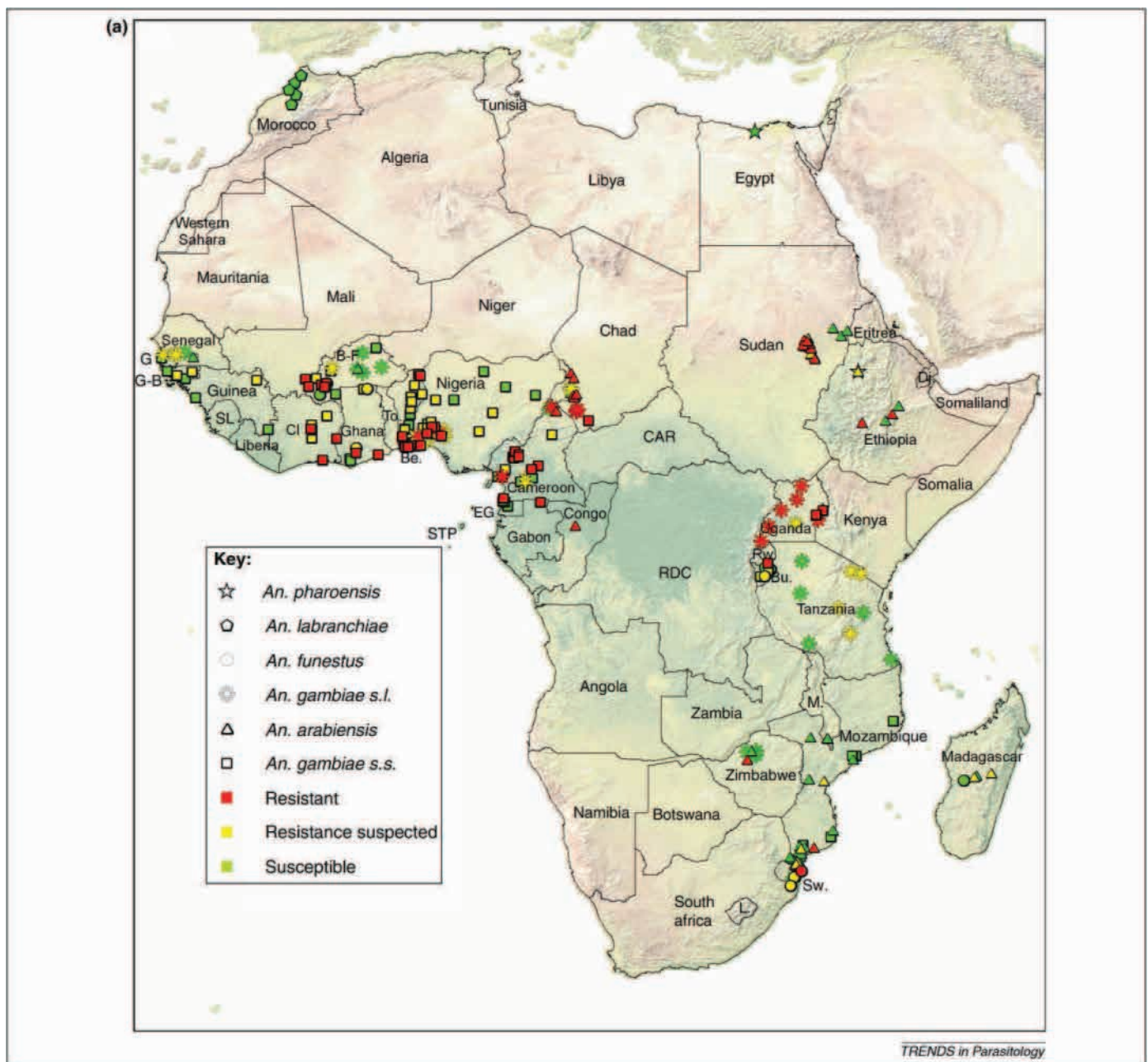


Figure 1. Map of Africa showing the distribution of pyrethroid resistance (a) and their underlying mechanisms (b) in malaria vectors. Maps were built using data collected from 2000 to 2010. Sites were located using publications (see references and references cited therein) and the Geonames database of the National Geospatial-Intelligence Agency, and spatialized using the ESRI ArcGIS Software. Background and boundary data are freely available at www.naturalearthdata.com. Resistance was defined according to standard WHO definitions, as described by the WHO [78]. Metabolic resistance data were incorporated when the field populations showed significantly higher enzyme activity and/or gene expression levels than that of the reference susceptible strain (using biochemical assays and/or detox chip microarrays). Target site resistance is recorded wherever the 1014F and/or 1014S kdr alleles have been reported but the maps do not provide any indication of the frequency of these resistant alleles in each site.

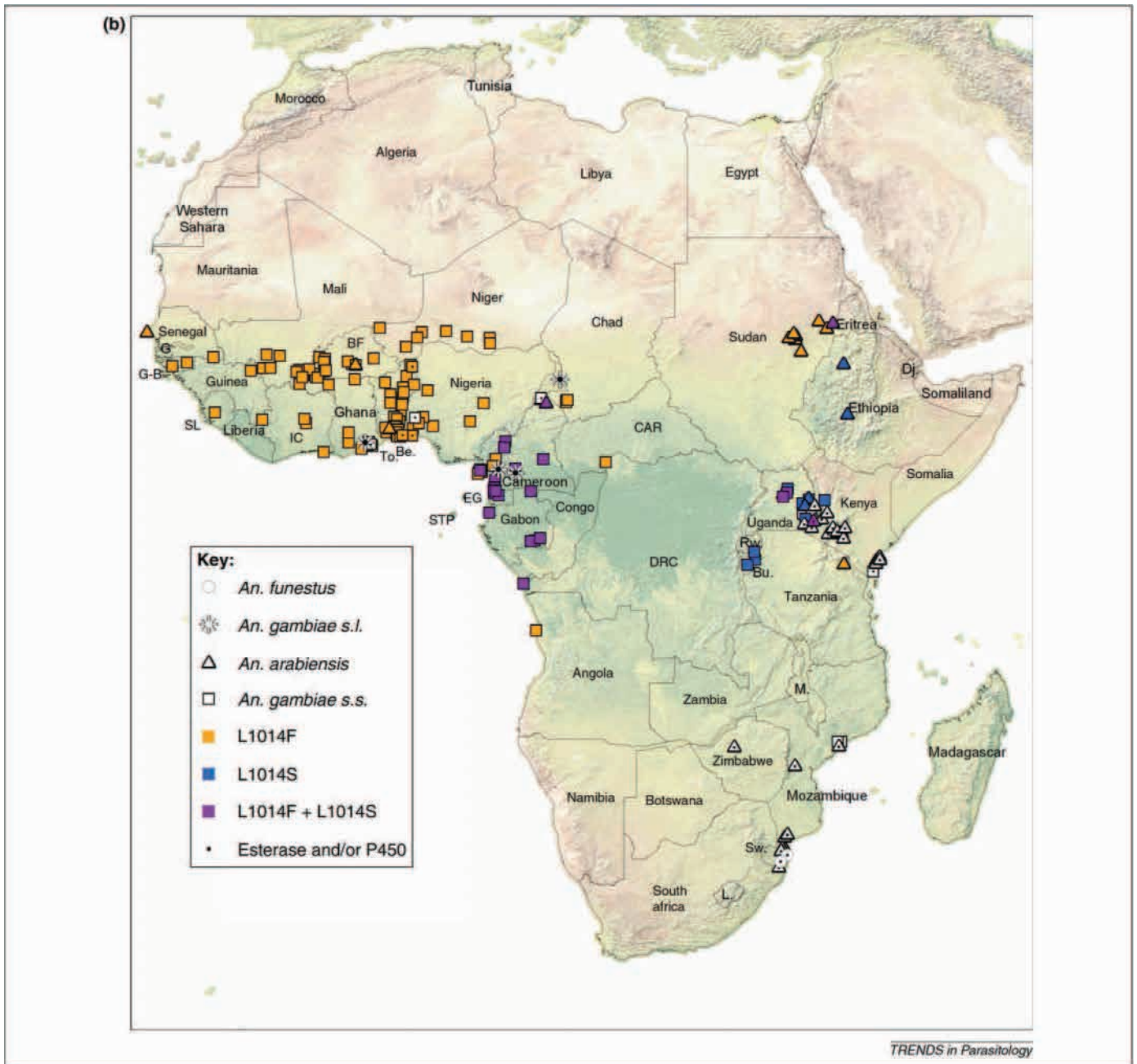


Figure 1. (Continued).

Ghana [48] and Burundi [49]. Full susceptibility to pyrethroids has been reported in *An. labranchiae* in Morocco [50] and in *An. pharoensis* in Egypt [51] and Ethiopia [52], and there have been no reports of resistance in other secondary vectors.

The current understanding of the distribution of *kdr* alleles is shown in Figure 1b. The 1014F mutation was first detected in *An. gambiae* from Cote d'Ivoire [53]. Subsequently 1014S was detected in *An. gambiae* from Kenya [54]. This somewhat misleadingly led to these two mutations being referred to as *kdr*West and *kdr*East. It is now clear, however, that these alleles are not restricted to either side of the continent. In *An. gambiae s.s.* the 1014F mutation has been detected as far East as Uganda [46] and the 1014S mutation has been found in Angola [7] and several countries in central Africa [9,55] (Figure 1b). There

have also been several reports of 1014F/1014S hybrids in *An. gambiae s.s.* [42,56–59].

Both 1014F and 1014S alleles have been detected in the sister taxa, *An. arabiensis* [45,60]. To date *kdr* does not appear to have arisen in *An. funestus* since both genetic mapping and direct sequencing of the sodium channel in pyrethroid resistant populations failed to find any evidence of target site resistance in this species [61]. Outside of Africa, *kdr* has been found in several malaria vectors including *An. stephensi* and *An. culicifacies* [62,63].

The absence of simple genetic markers for metabolic resistance means that far less is known about the distribution of the responsible alleles. Biochemical assays, and in some cases microarray studies, have implicated metabolic resistance in *An. gambiae s.l.* in Kenya [64], Camer-

oun [65], Benin [15], Nigeria [15], Ghana [16], Mozambique [39], South Africa [66] and Zimbabwe [43]. Overexpression of CYP6P3 and/or CYP6M2 has been found in pyrethroid-resistant *An. gambiae* populations from Benin, Nigeria and Ghana [15,16], mainly in co-association with the *kdr* L1014F allele. This co-occurrence of resistance genes might constitute an additional threat to malaria vector control as epistasis between these two types of resistance conferred an extremely high level of pyrethroid resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* [67].

Entomological and epidemiological impact of pyrethroid resistance

Few studies have assessed the epidemiological impact of insecticide resistance, and interpreting data from such studies is complicated by the large number of confounding factors. The clearest example of control failure being directly attributed to pyrethroid resistance was reported from the borders of Mozambique and South Africa. In 1996, the malaria control programme in KwaZulu Natal switched from using DDT to deltamethrin for indoor spraying [30]. Within four years, reported malaria cases had increased approximately four-fold, and *An. funestus*, which had previously been eradicated, had reappeared and was observed emerging alive from pyrethroid sprayed houses. Bioassays showed that this species was resistant to pyrethroids but susceptible to DDT [23]. The decision to revert to IRS with DDT was accompanied by a decline in malaria cases by 91% [68].

On the island of Bioko on the West African coast, an IRS campaign with lambda-cyhalothrin failed to curtail an increase in the population density of pyrethroid resistant *An. gambiae*; although a modest but significant reduction in transmission index and malaria reported cases was observed [9,69]. High frequencies of the L1014F *kdr* allele were observed in the local *An. gambiae* population. Only after pyrethroids were replaced with the carbamate bendiocarb did the mosquito population decline [9]. Nevertheless, in an operational scale programme such as this, the possible contribution of other factors to the failure of pyrethroid IRS to control mosquito population density cannot be overlooked; thus the direct consequence of the high *kdr* frequency is uncertain.

Another programmatic study was conducted in the highland provinces of Burundi, where a vector control programme combining IRS with pyrethroids and ITNs was initiated in 2002 in one of the most malaria affected island provinces, Karuzi. Here the interventions significantly reduced *Anopheles* density by 82% and transmission intensity by 90% and occurrence of clinical episodes by 43% in children despite high frequencies of the L1014S *kdr* allele in the local *An. gambiae* s.s. [49,70,71].

There have been extensive randomized controlled trials (phase III) in Africa aimed at investigating the efficacy of ITNs for malaria prevention [2], but very few have assessed how pyrethroid resistance might affect the effectiveness of such intervention. In the Korhogo area in the north of Côte d'Ivoire where the 1014F *kdr* allele frequency in *An. gambiae* is >80% [53] and malaria is endemic, lambda-cyhalothrin-treated nets had a significant impact on the entomological inoculation rate (55% reduction) and

on malaria incidence in children under 5 years of age (56% reduction of clinical attacks) compared to a control group having no nets [72]. This was the first clear-cut evidence of ITNs continuing to provide effective personal protection against malaria in an area with a high frequency of *kdr* in the vector population. However, the absence of a physical barrier in the control group might have overestimated the impact of pyrethroid treated nets against *kdr* mosquitoes in this study.

In southern Benin, a randomized controlled trial was carried out in a mesoendemic area to assess the impact of long lasting ITN scale-up on malaria morbidity in children under five years of age [73]. In this area, where the *kdr* frequency is around 50 to 60% in *An. gambiae* s.s, transmission increased during the rainy seasons but was not followed by a seasonal variation in parasite infection and clinical incidence. A longitudinal survey conducted among sleepers and nonsleepers under ITNs in that area of Benin showed no significant reduction in parasite density or clinical attacks of malaria (Corbel, unpublished data). Clearly further investigation is needed in this area to assess the impact of pyrethroid-resistance on vector control effectiveness.

Other smaller scale studies have assessed the impact of resistance on entomological parameters, using experimental huts, with variable results. An early experimental hut trial of ITNs in Côte d'Ivoire showed no apparent difference in the effectiveness of ITNs between two adjacent sites with resistant and susceptible populations of *An. gambiae* [75]. By contrast, a comparative study of the efficacy of lambda-cyhalothrin used for IRS or net treatment in southern Benin indicated a major loss of efficacy associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae* compared to the north where this species remains largely susceptible to pyrethroids [76].

One of the problems associated with many of these studies is that, owing to the lack of molecular markers for alternative resistance mechanisms, the frequency of *kdr* alleles is frequently used as a proxy for resistance. This can be misleading if metabolic or other resistance mechanisms are the predominant resistance mechanism. There is an urgent need for properly controlled large-scale trials to assess the impact of pyrethroid resistance on IRS and ITNs, alone or in combination. Such studies should use both entomological and epidemiological indices and should be conducted in areas where alternative resistance mechanisms are known to be responsible for pyrethroid resistance. Furthermore, these studies must consider the possibility of behavioural resistance and monitor for changes in key traits such as location of resting and feeding that can impact on the efficacy of current insecticide based interventions.

Conclusions

Pyrethroid resistance, as measured by conventional bioassays, is clearly widespread in malaria vectors across Africa. Molecular studies tracking the frequency of insecticide resistance alleles have shown dramatic increases in the frequency of these alleles in *An. gambiae* in recent years, presumably reflecting the increased selection pressure on malaria vectors, caused at least in part by the scale up of ITN coverage and pyrethroid use in IRS.

Enthusiasm for resistance management might be hindered by the paucity of reliable data on the impact of resistance on current interventions, and this must clearly be a priority for further research. Nevertheless, the rapid increase in pyrethroid resistance necessitates an immediate proactive response to resistance management to avoid compromising existing effective interventions. Resistance management is challenging when only a single chemical class is recommended for a particular application, as is the case of bed nets. Even for IRS, with only four insecticide classes currently available (having two different modes of action) and resistance reported to all four of these in some populations of *An. gambiae* [32], the options for managing resistance and providing sustainable vector control with existing chemicals are limited.

The future is not completely bleak. The Innovative Vector Control Consortium, established in 2005, is a product-development partnership established to stimulate the search for alternative active ingredients or improved formulations of insecticides for vector control, and several promising leads are now being evaluated in laboratory and field trials [77]. However, given the protracted regulatory procedures, it is likely to be many years before these new chemicals are an option for malaria control programmes. Hence it is vital that policy makers and programme implementers recognise the growing threat posed by insecticide resistance and strive to integrate resistance management into all control programmes. In addition, alternative, non-insecticidal methods should be encouraged, wherever feasible, to help reduce the reliance on pyrethroid insecticides.

Acknowledgements

This review was prepared as a working paper for the WHO Global Malaria Programme, and was supported by funding from USAID and from the Roll Back Malaria Partnership.

References

- WHO (2008) World Malaria Report 2008, WHO
- Lengeler, C. (2004) Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD000363
- Pluess, B. et al. (2010) Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD006657
- Roberts, L. and Enserink, M. (2007) Malaria. Did they really say . . . eradication? *Science* 318, 1544–1545
- Zaim, M. et al. (2000) Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med. Vet. Entomol.* 14, 1–5
- UN (2006) L'amélioration de la durabilité de la production du coton en Afrique de l'ouest et du centre. In Conférence des Nations Unies Sur le Commerce et le Développement: Fonds Commun pour les Produits de Base Consultatif International du Coton, Nations Unies
- Santolamazza, F. et al. (2008) Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar. J.* 7, 74
- Ridl, F.C. et al. (2008) A pre-intervention study of malaria vector abundance in Rio Muni, Equatorial Guinea: their role in malaria transmission and the incidence of insecticide resistance alleles. *Malar. J.* 7, 194
- Sharp, B.L. et al. (2007) Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malar. J.* 6, 52
- Davies, T.G. et al. (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151–162
- O'Reilly, A.O. et al. (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* 396, 255–263
- Donnelly, M.J. et al. (2009) Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? *Trends Parasitol.* 25, 213–219
- Feyereisen, R. et al. (2005) Insect cytochrome P450. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (Vol. 4) (Gilbert, L.I. et al., eds), In pp. 1–77, Elsevier
- Ranson, H. et al. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Sci. Washington* 298, 179–181
- Djouaka, R.F. et al. (2008) Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9, 538
- Muller, P. et al. (2007) Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics* 8, 36
- Muller, P. et al. (2008) Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet.* 4, e1000286
- McLaughlin, L.A. et al. (2008) Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. *Insect. Mol. Biol.* 17, 125–135
- Wondji, C.S. et al. (2009) Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res.* 19, 452–459
- Vontas, J.G. et al. (2001) Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357, 65–72
- Choi, J. et al. (2002) In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74, 117–128
- Kostaropoulos, I. et al. (2001) Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 313–319
- Hargreaves, K. et al. (2000) *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med. Vet. Entomol.* 14, 181–189
- Wilding, C.S. et al. (2009) High, clustered, nucleotide diversity in the genome of *Anopheles gambiae* revealed through pooled-template sequencing: implications for high-throughput genotyping protocols. *BMC Genomics* 10, 320
- Awolola, T.S. et al. (2009) Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1139–1145
- Vontas, J. et al. (2007) Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect. Mol. Biol.* 16, 315–324
- Bogh, C. et al. (1998) Permethrin-impregnated bednet effects on resting and feeding behaviour of lymphatic filariasis vector mosquitoes in Kenya. *Med. Vet. Entomol.* 12, 52–59
- Akogbeto, M.C. et al. (2005) Use of agricultural insecticides in Benin. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 98, 400–405
- Scollon, E.J. et al. (2009) *In vitro* metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab. Dispos.* 37, 221–228
- Brooke, B.D. et al. (2001) Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 91, 265–272
- Kelly-Hope, L. et al. (2008) Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. *Lancet Infect. Dis.* 8, 387–389
- Ranson, H. et al. (2009) Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malar. J.* 8, 299
- Dabire, K.R. et al. (2008) Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar. J.* 7, 188
- Dialynas, E. et al. (2009) MIRO and IRbase: IT Tools for the Epidemiological Monitoring of Insecticide Resistance in Mosquito Disease Vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e465
- Corbel, V. et al. (2007) Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop.* 101, 207–216
- Yawson, A.E. et al. (2004) Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med. Vet. Entomol.* 18, 372–377
- Awolola, T.S. et al. (2002) Resistance of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96, 849–852

- 38 Kulkarni, M.A. *et al.* (2007) Efficacy of pyrethroid-treated nets against malaria vectors and nuisance-biting mosquitoes in Tanzania in areas with long-term insecticide-treated net use. *Trop. Med. Int. Health* 12, 1061–1073
- 39 Coleman, M. *et al.* (2008) Operational impact of DDT reintroduction for malaria control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. *J. Med. Entomol.* 45, 885–890
- 40 Ratovonjato, J. *et al.* (2003) Recent observations on the sensitivity to pyrethroids and DDT of *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus* in the central Highlands of Madagascar; preliminary results on the absence of the kdr mutation in *An. arabiensis*. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar* 69, 63–69
- 41 Verhaeghen, K. *et al.* (2010) Spatio-temporal patterns in kdr frequency in permethrin and DDT resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–573
- 42 Verhaeghen, K. *et al.* (2006) Detection of the East and West African kdr mutation in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* from Uganda using a new assay based on FRET/Melt Curve analysis. *Malar. J.* 5, 16
- 43 Munhenga, G. *et al.* (2008) Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* from Gwave, a malaria-endemic area in Zimbabwe. *Malar. J.* 7, 247
- 44 Abdalla, H. *et al.* (2008) Insecticide susceptibility and vector status of natural populations of *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 263–271
- 45 Himeidan, Y.E. *et al.* (2007) Short report: permethrin and DDT resistance in the malaria vector *Anopheles arabiensis* from eastern Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 1066–1068
- 46 Balkew, M. *et al.* (2003) Insecticide susceptibility level of *Anopheles arabiensis* in two agrodevelopment localities in eastern Ethiopia. *Parassitologia* 45, 1–3
- 47 Balkew, M. *et al.* (2010) Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from villages in central, northern and south west Ethiopia and detection of kdr mutation. *Parasit. Vectors* 3, 40
- 48 Okoye, P.N. *et al.* (2008) Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 591–598
- 49 Protopopoff, N. *et al.* (2008) A significant increase in kdr in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands. *Trop. Med. Int. Health* 13, 1479–1487
- 50 Faraj, C. *et al.* (2008) [Resistance of *Anopheles labranchiae* to DDT in Morocco: identification of the mechanisms and choice of replacement insecticide]. *East. Mediterr. Health J.* 14, 776–783
- 51 Mostafa, A.A. and Allam, K.A. (2001) Studies on the present status of insecticides resistance on mosquitoes using the diagnostic dosages in El-Fayium Governorate, a spot area of malaria in Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 31, 177–186
- 52 Balkew, M. *et al.* (2006) Very high DDT-resistant population of *Anopheles pharoensis* Theobald (Diptera: Culicidae) from Gorgora, northern Ethiopia. *Parasite* 13, 327–329
- 53 Martinez Torres, D. *et al.* (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 7, 179–184
- 54 Ranson, H. *et al.* (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 Mol. Biol.* 9, 491–497
- 55 Ndjemai, H.N. *et al.* (2009) The distribution of insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 11, 1127–1138
- 56 Etang, J. *et al.* (2006) First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 795–797
- 57 Pinto, J. *et al.* (2007) Multiple Origins of Knockdown Resistance Mutations in the Afrotropical Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE* 2, e1243
- 58 Reimer, L. *et al.* (2008) Relationship between kdr mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 45, 260–266
- 59 Pinto, J. *et al.* (2006) Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Med. Vet. Entomol.* 20, 27–32
- 60 Kulkarni, M. *et al.* (2006) Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (kdr) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malar. J.* 5, 56
- 61 Wondji, C.S. *et al.* (2007) Mapping a quantitative trait locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *BMC Genomics* 8, 34
- 62 Enayati, A.A. *et al.* (2003) Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Entomol.* 17, 138–144
- 63 Singh, O.P. *et al.* (2009) PCR-based methods for the detection of L1014 kdr mutation in *Anopheles culicifacies* sensu lato. *Malar. J.* 8, 154
- 64 Chen, H. *et al.* (2008) Monooxygenase Levels and Knockdown Resistance (kdr) Allele Frequencies in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Kenya. *J. Med. Entomol.* 45, 242–250
- 65 Etang, J. *et al.* (2007) Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *J. Vector Ecol.* 32, 123–133
- 66 Hargreaves, K. *et al.* (2003) *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in South Africa. *Med. Vet. Entomol.* 17, 417–422
- 67 Hardstone, M.C. *et al.* (2009) Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *J. Evol. Biol.* 22, 416–423
- 68 Maharaj, R. *et al.* (2005) Impact of DDT re-introduction on malaria transmission in KwaZulu-Natal. *S. Afr. Med. J.* 95, 871–874
- 69 Kleinschmidt, I. *et al.* (2006) Reduction in infection with *Plasmodium falciparum* one year after the introduction of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 972–978
- 70 Protopopoff, N. *et al.* (2008) Spatial targeted vector control is able to reduce malaria prevalence in the highlands of Burundi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 12–18
- 71 Protopopoff, N. *et al.* (2007) Spatial targeted vector control in the highlands of Burundi and its impact on malaria transmission. *Malar. J.* 6, 158
- 72 Henry, M.C. *et al.* (2005) Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 859–864
- 73 Damien, G. *et al.* (2009) Malaria situation in southern Benin after the national ITNs distribution. In *Fifth MIM Pan-African Malaria Conference*.
- 75 Hougard, J.M. *et al.* (2003) Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull. Entomol. Res.* 93, 491–498
- 76 N'Guessan, R. *et al.* (2007) Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 199–206
- 77 Hemingway, J. *et al.* (2006) The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends Parasitol.* 22, 308–312
- 78 WHO (1998) Report of the WHO informal consultation on test procedures for insecticides on treated surfaces. *World Health Organization, Control of Infectious Diseases (CDS), Prevention and Control, WHO document WHO/CDS/CPC/MAL/98.12*

RESEARCH

Open Access

Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin

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

Abstract

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

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

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

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

Background

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

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

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

* Correspondence: anges33@yahoo.fr

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

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

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

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

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

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

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

Methods

Study areas

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

Mosquito collections

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

Insecticide susceptibility test

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

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

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

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

Molecular characterization of Anopheles populations using PCR analysis

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

Data interpretation

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

Following the WHO protocol

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

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

Mapping insecticide resistance in mosquito vectors in southern Benin

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

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

Data analysis

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

Results

Resistance status

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

Identification of molecular forms of Anopheles gambiae s.s

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

Detection of resistance genes

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

Mapping insecticide resistance in mosquito vectors in southern Benin

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

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

Discussion

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

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

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

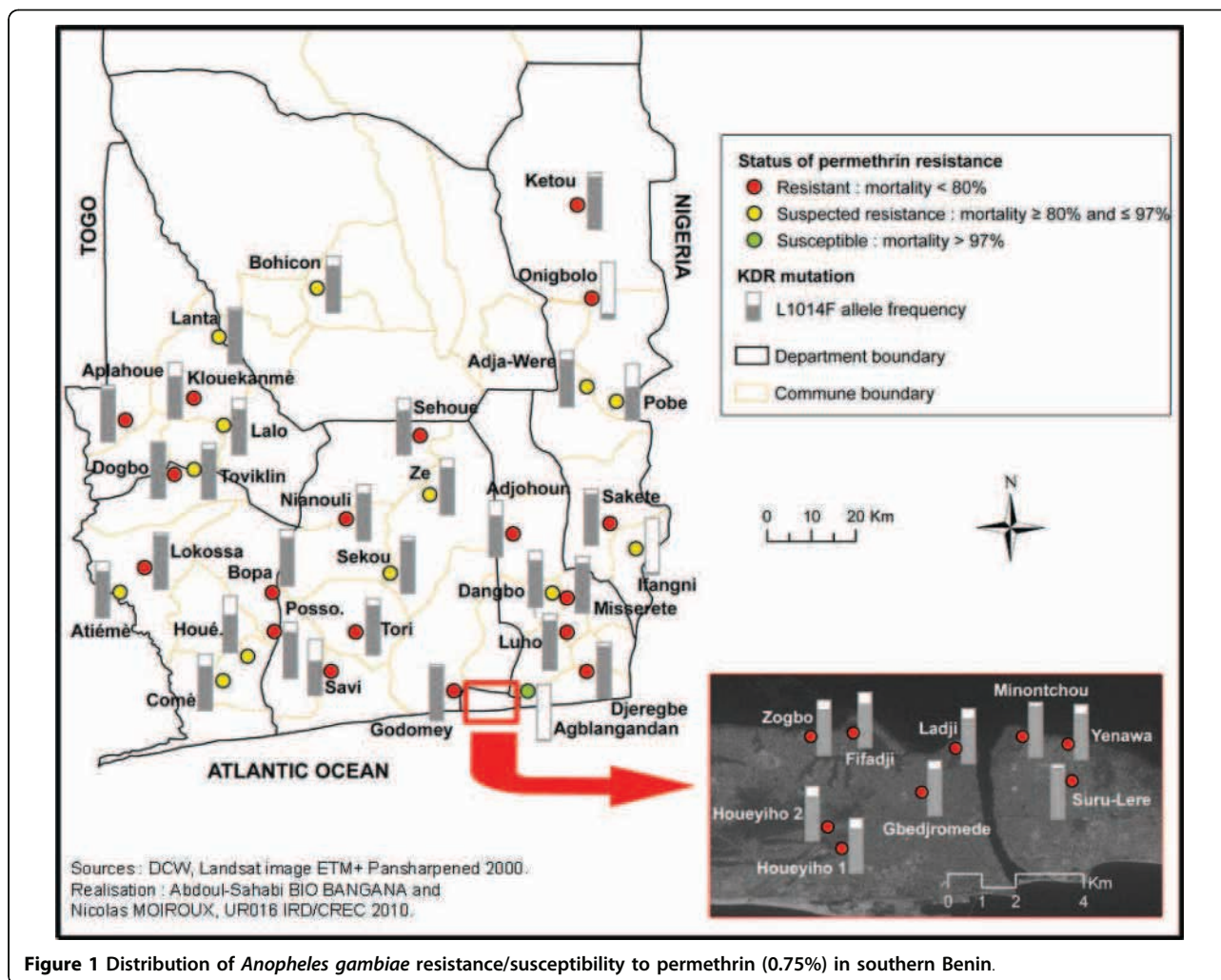


Figure 1 Distribution of *Anopheles gambiae* resistance/susceptibility to permethrin (0.75%) in southern Benin.

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

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

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

Conclusion

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

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

Additional file 2: Species identification, molecular forms and frequency of the *ldr*, and *Ace1* alleles and genotypes in *Anopheles gambiae* s.l.

Acknowledgements

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

Author details

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

Authors' contributions

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

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 September 2009 Accepted: 24 March 2010

Published: 24 March 2010

References

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

14. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbeto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Acta Trop* 2007, **101**:207-216.
15. Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin.** *Malar J* 2009, **8**:103.
16. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB: **Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation.** *Malar J* 2008, **7**:189.
17. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Guiguemde RT, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM: **First report of the *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa.** *Parassitologia* 2002, **44**:157-158.
18. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbéto M, Guiguemde RT, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Graham JS, Hougard JM: **The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:617-622.
19. Fanello C, Petrarca V, Della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, Allouche A, Curtis CG, Toure YT, Coluzzi M: **The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2003, **12**:241-245.
20. Awolola TS, Brooke BD, Koekemoer LL, Coetzee M: **Resistance of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroid insecticides, in south-western Nigeria.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:849-852.
21. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke B, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: ***Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:181-189.
22. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfoundi R, Toto JC, Fontenille D: **Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon.** *J Med Entomol* 2003, **40**:491-497.
23. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P: **Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*.** *Bull World Health Organ* 1999, **77**:230-234.
24. Akogbéto M, Djouaka R, Noukpo H: **Use of agricultural insecticides in Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2005, **98**:400-405.
25. Joncour G: *Lutte anti-palustre au Dahomey* Rapport no 13: Ministère de la Santé Publique 1959.
26. Magesa SM, Wilkest J, Minzawa AEP, Myamba J, Philip MD: **Trial of pyrethroid impregnated bed nets in area of Tanzania hole endemic of malaria. Part II. Effects on vector population.** *Acta Trop* 1990, **49**:97-108.
27. WHO: **Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides.** *Tenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control.* Geneva. WHO Technical Report Series, No: 737 World Health Organization 1986.
28. RTI International: **Indoor Residual Spraying (IRS) Indefinite Quantity Contract (IQC).** PMI, USAID 2008.
29. Scott J, Brogdon W, Collins F: **Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by PCR.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
30. Favia G, Della Torre A, Bagayoko M, Lanfrancotti Sagnon NF, Toure Y, Coluzzi M: **Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation.** *Insect Mol Biol* 1997, **6**:377-383.
31. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: **Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
32. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M: **The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect Mol Biol* 2004, **13**:1-7.
33. Abbott WS: **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** *J Am* 1987, **3**:302-303.
34. Awolola TS, Oyewole IO, Amajoh CN, Idowu ET, Ajayi MB, Oduola A, Manafa OU, Ibrahim K, Koekemoer LL, Coetzee M: **Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria.** *Acta* 2005, **95**:204-209.
35. Toure YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M: **The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa.** *Parassitologia* 1998, **40**:477-511.
36. Wondji C, Simard F, Fontenille D: **Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry.** *Insect Mol Biol* 2002, **11**:11-19.
37. Diabate A, Baldet T, Chandre C, Dabire KR, Kengne P, Guiguemde TR, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM: **KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa.** *J Med Entomol* 2003, **40**:195-198.
38. IFDC: **L'état du marché des intrants agricoles au Bénin.** *Technical Bulletin, IFDC-T70* 2005, **83**.
39. Djogbéno L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM, Chandre F: **Identification and geographic distribution of the *ace-1r* mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:298-302.

doi:10.1186/1475-2875-9-83

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

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial



Vincent Corbel, Martin Akogbeto*, Georgia B Damien*, Armel Djenontin, Fabrice Chandre, Christophe Rogier, Nicolas Moiroux, Joseph Chabi, Bio Banganna, Gil G Padonou, Marie-Claire Henry

Summary

Background Malaria control efforts and elimination in Africa are being challenged by the development of resistance of parasites to antimalarial drugs and vectors to insecticides. We investigated whether the combination of long-lasting insecticidal mosquito nets (LLINs) with indoor residual spraying (IRS) or carbamate-treated plastic sheeting (CTPS) conferred enhanced protection against malaria and better management of pyrethroid-resistance in vectors than did LLINs alone.

Methods We did a cluster randomised controlled trial in 28 villages in southern Benin, west Africa. Inclusion criteria of the villages were moderate level of pyrethroid resistance in malaria vectors and minimum distance between villages of 2 km. We assessed four malaria vector control interventions: LLIN targeted coverage to pregnant women and children younger than 6 years (TLLIN, reference group), LLIN universal coverage of all sleeping units (ULLIN), TLLIN plus full coverage of carbamate-IRS applied every 8 months (TLLIN+IRS), and ULLIN plus full coverage of CTPS lined up to the upper part of the household walls (ULLIN+CTPS). The interventions were allocated to villages by a block randomisation on the basis of preliminary surveys and children of each village were randomly selected to participate with computer-generated numbers. The primary endpoint was the incidence density rate of *Plasmodium falciparum* clinical malaria in children younger than 6 years as was analysed by Poisson regression taking into account the effect of age and the sampling design with a generalised estimating equation approach. Clinical and parasitological information were obtained by active case detection of malaria episodes during 12 periods of 6 consecutive days scheduled at six weekly intervals and by cross-sectional surveys of asymptomatic plasmodial infections. Children or study investigators were not masked to study group. This study is registered with Current Controlled Trials, number ISRCTN07404145.

Findings Of 58 villages assessed, 28 were randomly assigned to intervention groups. 413–429 children were followed up in each intervention group for 18 months. The clinical incidence density of malaria was not reduced in the children from the ULLIN group (incidence density rate 0.95, 95% CI 0.67–1.36, $p=0.79$), nor in those from the TLLIN+IRS group (1.32, 0.90–1.93, $p=0.15$) or from the ULLIN+CTPS group (1.05, 0.75–1.48, $p=0.77$) compared with the reference group (TLLIN). The same trend was observed with the prevalence and parasite density of asymptomatic infections (non significant regression coefficients).

Interpretation No significant benefit for reducing malaria morbidity, infection, and transmission was reported when combining LLIN+IRS or LLIN+CTPS compared with a background of LLIN coverage. These findings are important for national malaria control programmes and should help the design of more cost-effective strategies for malaria control and elimination.

Funding Ministère Français des Affaires Etrangères et Européennes (FSP project 2006-22), Institut de Recherche pour le Développement, President's Malaria Initiative (PMI) of US Government.

Introduction

Despite substantial efforts and increasing international funding dedicated throughout the world to control and eliminate malaria,¹ the disease is still a major public health issue with nearly 216 million cases a year and about 655 000 deaths, 86% of whom are children younger than 5 years.² Recommendations of the World Health Organization (WHO Global Malaria Programme-Roll Back Malaria [RBM] Partnership) to combat malaria include artemisinin-based combination therapy and long-lasting insecticidal nets (LLIN), supported by indoor

residual spraying of insecticide (IRS) and intermittent preventive treatment during pregnancy. Between 2008 and 2010, nearly 289 million insecticide-treated mosquito nets were delivered to sub-Saharan Africa, enough to protect 578 million people. Additionally, about 81 million people, representing 11% of the population at risk, were also protected by IRS.² Deployment of such strategies has shown important reduction in malaria-associated morbidity and mortality in settings with moderate-to-high transmission levels in sub-Saharan Africa,^{3,4} but a recent increase of malaria cases was

Published Online

June 7, 2012

DOI:10.1016/S1473-3099(12)70081-6

See Online/Comment

DOI:10.1016/S1473-3099(12)70139-1

*These authors contributed equally

Institut de Recherche pour le Développement, Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (IRD 224-CNRS 5290 UM1-UM2), Cotonou, Benin, and Montpellier, France (V Corbel PhD, G B Damien MD, A Djenontin PhD, F Chandre PhD, N Moiroux MSc, J Chabi BSc); Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, Cotonou, Benin (V Corbel, Prof M Akogbeto PhD, G B Damien, A Djenontin, N Moiroux, J Chabi, B Banganna MSc, G G Padonou MSc); Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles, Montpellier, France (F Chandre); Institut Pasteur de Madagascar, Madagascar (Prof C Rogier MD); Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Faculté de Médecine La Timone, Université de la Méditerranée, Marseille, France (Prof C Rogier); and Service de Coopération et d'Actions Culturelles, French Embassy, Cotonou, Benin (M-C Henry MD)

Correspondence to:

Dr Vincent Corbel, Institut de Recherche pour le Développement, Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (IRD 224-CNRS 5290 UM1-UM2), et Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, Cotonou, Benin
vincent.corbel@ird.fr

reported in some African countries, hence underlining the fragility of malaria prevention and control in this part of the world.^{2,5}

The overarching goal of malaria vector control is to decrease the vectorial capacity of local vector populations below the critical threshold needed to achieve a malaria reproduction number (R_0 , the expected number of human cases that arise from each human case in a population) of less than one. Unfortunately, current methods (LLIN and IRS) are highly dependent on a single class of insecticides, the pyrethroids, for which malaria vectors have developed various resistance mechanisms.⁶ To ensure the success of vector control efforts and malaria elimination in Africa, the WHO-RBM and Malaria Eradication Research Agenda (malERA) consultative vector control group emphasised the need to search for innovative strategies. These strategies should aim at more effective control of pyrethroid-resistant malaria vectors to strongly decrease and interrupt disease transmission in endemic areas.^{7,8}

In some countries where more resources have become available, malaria control programmes have recently deployed both IRS and LLIN in the same malaria risk areas.² The aims of this combined approach are to reduce transmission—and hence the malaria burden—more rapidly than might be feasible with one method alone and to delay the emergence of insecticide resistance by use of different classes of insecticide for IRS and LLINs. So far, a small number of studies^{9,10} and mathematical modelling exercises^{11,12} suggest that such combination has an added benefit for reduction of the risk of infection because the people not protected by one of the interventions are protected by the other. However, all the available studies were observational (ie, non experimental, without randomised allocation of the interventions), and in none of them could confounding factors be entirely excluded. Despite the great interest in combining methods for malaria control and elimination, no evidence exists for an epidemiological effect of LLIN and IRS, which we define here as the implementation of both interventions at the same time, in the same community, and against the same vector population.

The aim of this study was to investigate whether the use of both interventions in combination (ie, LLIN plus IRS or LLIN plus carbamate-treated plastic sheeting [CTPS]) afforded enhanced protection against clinical malaria at community level and a better management of pyrethroid-resistance in malaria vectors than did a selective coverage of LLIN in children younger than 6 years (reference group according to recommendations by the National Malaria Control Programme [NMCP]). The rationale behind the use of CTPS came from results of preliminary experimental hut studies in west Africa that showed good insecticidal activity of CTPS against pyrethroid-resistant malaria vectors.^{13,14} The trial also aimed at determining whether universal coverage of LLIN could afford better protection against malaria than

would selective coverage by achieving a mass killing effect.¹⁵ The assumption is that much more reduction of transmission is expected with universal coverage of all sleeping units with LLIN (ULLIN) because of a reduction of the infection rate of vectors by poor access to the largest part of the human population that is infected (oldest children and adults) and the shortening of the life expectancy of the vectors.

Methods

Study design

We did a cluster randomised controlled trial in the health district of Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito (OKT), southern Benin, between June 23, 2008, and Dec 24, 2009. The inclusion criteria for villages were moderate level of pyrethroid resistance in malaria vectors (*kdr* allelic frequency <40%), minimum distance of 2 km between villages, population size of 250–500 inhabitants with non-isolated habitations, and absence of a local health centre. Inclusion criteria for children were age (0–71 months) and their effective domiciliation in these villages. A random sample of children of each village was selected to participate. Before the trial, the head of the family (or the guardian) of the selected children gave their written informed consent. Mosquito collectors gave their written informed consent and were treated free of charge for malaria presumed illness throughout the study. All sick children (presenting symptoms such as fever, shiver, asthenia, vomiting, diarrhoea, etc) participating or not in the study were treated according to integrated management of childhood illness.¹⁶ At the end of the study, all villages that participated in the study received universal coverage of LLINs. There was no subsidised or free distribution policy of other vector control methods and artemisinin combination therapy in agreement with the NMCPs. Ethics clearance for the study was obtained from the National Ethical Committee for Medical Research in Benin and Institut de Recherche pour le Développement (IRD)'s ethics committee. Ethics clearance was registered as IRB00006860.

Randomisation and masking

The interventions were allocated to the villages by a block randomisation on the basis of preliminary surveys (appendix). Villages were first ranked (1) for clinical malaria incidence, (2) for densities of *Anopheles gambiae*, (3) for densities of *Anopheles funestus* (secondary vector), and (4) for the size of the population per village; these ranks were multiplied by 5, 2, 1, and 0.5, respectively. The four weighted ranks were summed per village and villages were sorted in seven blocks of four villages having successive ranks. In each block, villages were randomly allocated to one of the four interventions, using computer-generated random numbers. In each village, we randomly selected 60 children younger than 6 years from the census list of the inhabitants to participate using computer-generated random numbers. The

See Online for appendix

allocation sequence and randomisation of the blocks and children were prepared by the study statistician at IRD-CREC. Children and study investigators were not masked to treatment allocation.

Procedures

The four malaria vector control interventions assessed were; (1) LLIN-targeted coverage [TLLIN] to pregnant women and children younger than 6 years that served as a reference group; (2) ULLIN, (3) LLIN-targeted coverage to pregnant women and children younger than 6 years plus full coverage of carbamate-IRS (TLLIN+IRS), and (4) LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of CTPS lined up to the walls of the household (ULLIN+CTPS). Before the study, all existing impregnated nets were replaced by new Permanet 2.0 (Vestergaard Frandsen, Lausanne, Switzerland), a WHO approved LLIN containing 55 mg active ingredient of deltamethrin per m². Before allocation of the intervention, we did a comprehensive census in every village to identify the number of houses and sleeping units to be covered. For LLIN-targeted coverage (ie, TLLIN and TLLIN+IRS), one LLIN was provided per sleeping unit of children younger than 6 years or pregnant women, or both, whereas one net was given to every sleeping unit for LLIN-universal coverage (ie, ULLIN and ULLIN+CTPS). Overall, this corresponds to an average of one LLIN every four people for TLLIN and one net every two people for ULLIN (census showed that the mean number of people per house was four). For IRS, treatment was given every 8 months with bendiocarb (FICAM 80, Bayer, Leverkusen, Germany) at the WHO recommended target dose of 400 mg/m².¹⁷ The CTPS were made of polypropylene (Filtisac SA, Abidjan, Côte d'Ivoire) and were impregnated manually by a qualified staff of the Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (Ministry of Health), Benin, as previously described.¹⁴ CTPS were impregnated with bendiocarb at 200 mg/m² and fixed just to the upper third part of the walls to comply with the human risk assessment done by the manufacturer. The CTPS was reimpregnated every 4 months according to the residual efficacy of bendiocarb on the polypropylene fabric.¹⁴ The residual activity of bendiocarb on walls and polypropylene-treated material was checked regularly with WHO cone bioassays in houses selected at random with a laboratory-susceptible reference strain (Kisumu) of *A gambiae*.

Active case detection for malaria episodes was done on the cohort of children during 12 periods of 6 consecutive days at six weekly intervals. Every day, a nurse assisted by a local villager trained for the study visited participated children and recorded data on each case of sickness detected at home under the supervision of a head physician. A thick blood film was taken from every sick child, and children were treated according to the clinical diagnosis made by the nurse. Cross-sectional surveys were done at each period of clinical monitoring on every

asymptomatic child who showed axillary's temperature of less than 37.5°C. A thick film sample was taken on the fourth day to ensure that asymptomatic children were not sick in preceding days. Detailed methodology of active case detection and cross-sectional surveys is described elsewhere.¹⁸

From Jan 14, to Dec 24, 2009, mosquitoes were collected through eight surveys of 2 consecutive days every 6 weeks. This collection occurred 2 weeks before medical surveys. Adult female mosquitoes were caught using human landing catches technique both indoors and outdoors at four sites per village from 10 pm to 6 am and for two consecutive nights per survey (ie, 16 person-nights per village per survey). Independent staff regularly checked quality of the mosquito collections on a randomly selected sample representing 12% of the total night-collection. Anopheline species were identified with morphological criteria according to the identification keys for anophelinae of sub-Saharan Africa.^{19,20} Ovaries of female mosquitoes belonging to the *A gambiae* complex and *A funestus* were examined to determine the parity rate (percentage of parous female individuals). Then, mosquitoes were stored in the laboratory, as described by Djénontin and colleagues.¹⁴

Plasmodium infections were detected on Giemsa stained thick smears, as described previously.¹⁸ Cross-check quality control was regularly done on a randomly selected sample representing 10% of all thick smears. Clinical malaria was defined by symptoms evoking malaria plus a parasite density above 2000 parasites per μ L.¹⁸

Heads and thoraces of anopheline female mosquitoes were tested by ELISA for detection of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP).²¹ All mosquitoes belonging to *A gambiae* complex and

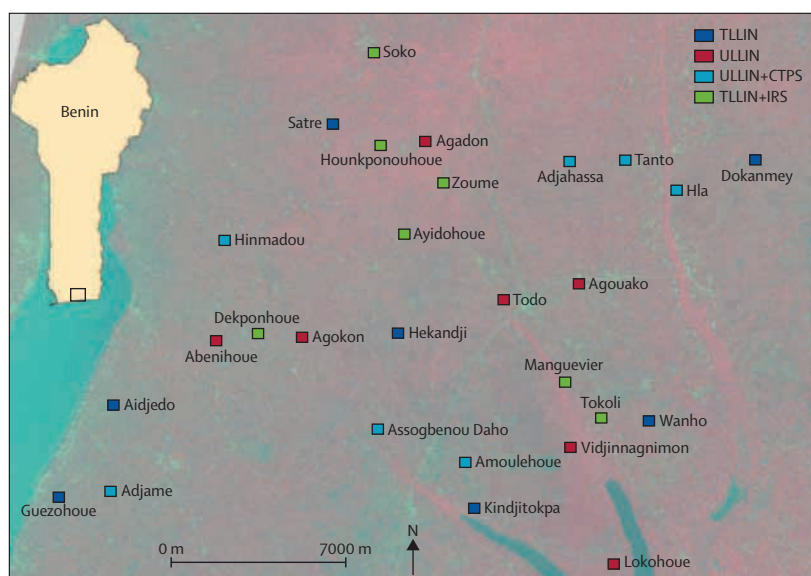


Figure 1: Map of the study area showing the allocation of the study groups

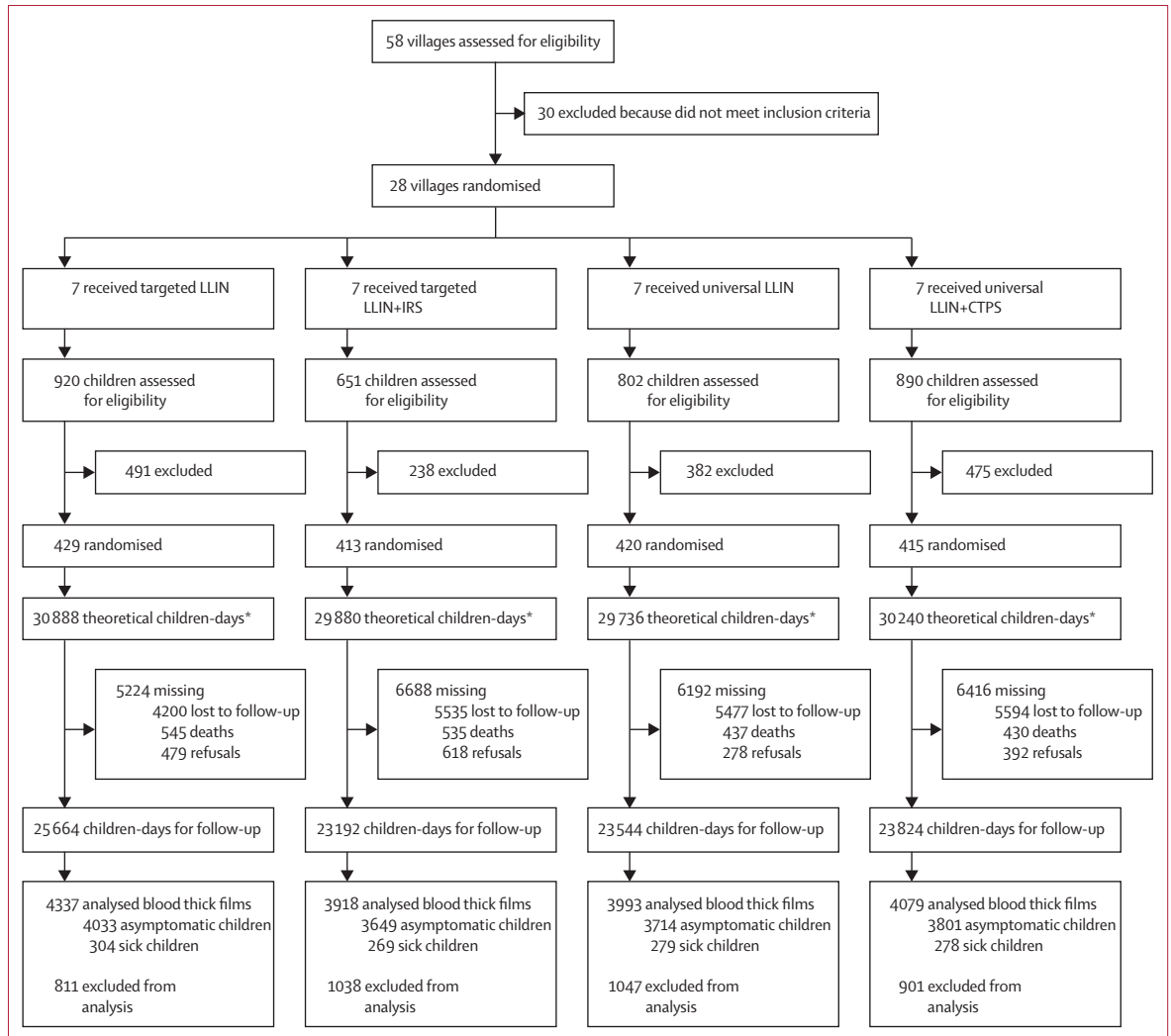


Figure 2: Trial profile
 LLIN=long-lasting insecticidal mosquito nets. IRS= residual spraying of insecticide. CTPS=carbamate-treated plastic sheetings. *Number of children multiplied by number of days of follow-up (12 surveys×6 days).

	TLLIN	ULLIN	ULLIN+CTPS	TLLIN+ IRS	Total
Number of inhabitants	3018	1996	2251	2660	9925
Population density per km ²	449	462	577	579	..
Average number of people per household	3.9	3.4	3.7	3.6	3.7
Proportion of mud houses (%)	96%	88%	92%	89%	92%
Number of registered children	920	651	802	890	3263
Mean age (years, SD)	1.4 (1.1)	1.4 (1.1)	1.4 (1.0)	1.3 (1.1)	1.4 (1.1)
Sex ratio (female/male)	0.98	0.96	1.0	0.85	0.96

LLIN=long-lasting insecticidal mosquito nets. TLLIN=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years (reference group). ULLIN=LLIN-universal coverage of sleeping units. TLLIN+IRS=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years plus full coverage of carbamate-IRS. ULLIN+CTPS=LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of carbamate-treated plastic sheetings (CTPS).

Table 1: Baseline characteristics of villages just before implementation of the interventions

A *funestus* group were identified by PCR at the species levels.^{22,23} Molecular characterisation of the L1014F *kdr* mutation (conferring resistance to pyrethroids) and the *ace.1* G119S substitution (conferring resistance to carbamates) was done on all mosquitoes belonging to *A gambiae* complex as previously described.^{24,25}

We monitored the ownership, coverage, use, and integrity of the different vector control interventions every 3 months during the trial. At every one of five surveys, 40% of the households were checked at random. LLINs were initially labelled with wash-resistant ink to check whether nets initially distributed were still in place in the households at every survey. We defined the ownership as the number of owned LLINs relative to the total number of LLINs distributed. We defined the coverage as the total number of hung nets relative to the total number of sleeping units. LLIN use was the proportion of children younger than 6 years sleeping

	n/N	Value (95% CI)	Incidence density ratio (95% CI)	Multiplicative coefficient (95% CI)	Odds ratio (95% CI)	p value	Overall p value
Clinical incidence density (per 100 children-months)							0.99
TLLIN	..	10.2 (5.8–14.1)	1	
ULLIN	..	9.3 (5.7–14.2)	0.98 (0.65–1.49)	0.94	
TLLIN+IRS	..	8.4 (5.1–13.1)	0.93 (0.57–1.54)	0.78	
ULLIN+CTPS	..	9.1 (5.6–14.0)	0.96 (0.62–1.47)	0.83	
Geometric mean (per μL) of <i>Plasmodium falciparum</i> parasite densities							0.33
TLLIN	..	470 (411–538)	..	1	
ULLIN	..	527 (439–632)	..	1.04 (0.95–1.15)	..	0.37	
TLLIN+IRS	..	576 (482–688)	..	1.09 (0.99–1.20)	..	0.08	
ULLIN+CTPS	..	554 (461–667)	..	1.06 (0.96–1.18)	..	0.21	
Prevalence rates (%) of <i>P falciparum</i> infection							0.05
TLLIN	350/1383	25.3% (22.4–30.2)	1	..	
ULLIN	319/1060	30.1% (24.8–35.3)	1.16 (0.84–1.61)	0.35	
TLLIN+IRS	399/1071	37.3% (32.2–42.3)	1.56 (1.15–2.10)	0.01	
ULLIN+CTPS	304/1030	29.5% (25.2–33.8)	1.12 (0.84–1.48)	0.42	

LLIN=long-lasting insecticidal mosquito nets. TLLIN=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years (reference group). ULLIN=LLIN-universal coverage of sleeping units. TLLIN+IRS=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years plus full coverage of carbamate-IRS. ULLIN+CTPS=LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of carbamate treated plastic sheetings (CTPS).

Table 2: Baseline characteristics of malaria disease in children younger than 6 years before allocation of the interventions

under the net the night preceding the visit according to the WHO.²⁶ We defined the integrity of LLINs according to the proportion of intact nets (ie, no holes) present in the houses at each survey. For IRS and CTPS, coverage corresponded to the number of houses covered by one or the other intervention relative to the total number of houses inspected. The threshold for coverage justifying additional sensitisation for compliance was fixed at 80% for IRS, 80% for CTPS, and 70% for LLIN.

Statistical analysis

The primary endpoint was the incidence density rates of *P falciparum* clinical malaria in children younger than 6 years. Secondary endpoints were the prevalence and parasite density of asymptomatic infections in children younger than 6 years, the entomological inoculation rates (as defined by the number of infected bites per man per year), the human biting rates (as defined by the number of bites per man per year) and the prevalence of pyrethroid resistant 1014F *ldr* allele in malaria vectors.

All data were double entered independently in an Access 2003 database and were analysed using the survey commands of STATA 11.0. We calculated the numbers of communities and children required for epidemiological assessment of the treatments to detect either a 37% protective efficacy conferred by universal LLINs or a 50% protective efficacy conferred by the combinations compared with the reference group (TLLIN), with a power of 80%, significance level of 5%, a design effect of 0.25, an average of 1.5 clinical malaria episodes per child-year in the study area,¹⁸ and 20% of children lost

	Observations		Incidence density (per 100 children-month; 95% CI)	Adjusted* incidence density ratio (95% CI)	p value	
	n	Child-day Malaria fever				
TLLIN (reference group)	304	25 664	43	5.0 (3.6–6.8)	1	..
ULLIN	279	23 544	38	4.8 (3.4–6.6)	0.95 (0.67–1.36)	0.79
TLLIN+IRS	269	23 192	51	6.6 (4.9–8.7)	1.32 (0.90–1.93)	0.15
ULLIN+CTPS	278	23 824	43	5.4 (3.9–7.3)	1.05 (0.75–1.48)	0.77

TLLIN=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years (reference group). ULLIN=LLIN-universal coverage of sleeping units. TLLIN+IRS=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years plus full coverage of carbamate-IRS. ULLIN+CTPS=LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of carbamate-treated plastic sheetings (CTPS). *Adjustment on age. Overall p value=0.35. LLIN=long-lasting insecticidal mosquito nets.

Table 3: Incidence density of *P falciparum* clinical malaria in children aged younger than 6 years in the reference and intervention groups at 18 months follow-up

during the follow-up.²⁷ The estimated number of communities for every intervention was seven (28 villages in total) and the required number of children younger than 6 years per village was 60. We compared incidence density of *P falciparum* clinical malaria, prevalence rate, and log-transformed parasite densities of asymptomatic infections between the treatments (ULLIN, TLLIN+IRS, ULLIN+CTPS) and the reference group (TLLIN) taking into account the effect of age and the sampling design in Poisson, logistic, and linear multivariate regression models using a generalised estimating equations (GEE) approach, as appropriate. We estimated annual human biting and entomological inoculation rates assuming a negative binomial distribution of the number of

	Number	Geometric mean (per μL ; 95% CI)	Adjusted* multiplicative coefficient	p value
TLLIN (reference group)	788	707 (634–788)	1	..
ULLIN	744	647 (600–696)	0.96 (0.91–1.01)	0.14
TLLIN+IRS	935	685 (631–743)	0.99 (0.93–1.05)	0.66
ULLIN+CTPS	630	680 (624–740)	0.98 (0.92–1.04)	0.49

LLIN=long-lasting insecticidal mosquito nets. TLLIN=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years (reference group). ULLIN=LLIN-universal coverage of sleeping units. TLLIN+IRS=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years plus full coverage of carbamate-IRS. ULLIN+CTPS=LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of carbamate-treated plastic sheetings (CTPS). *Adjustment on age. Overall p value=0.46.

Table 4: Parasite densities of *P falciparum* among asymptomatic and infected children younger than 6 years in the reference and intervention groups at 18 months follow-up

	Pos. n/N	Prevalence (%; 95% CI)	Adjusted* odds ratio (95% CI)	p value
TLLIN (reference group)	788/4033	19.5% (16.6–22.5)	1	..
ULLIN	744/3714	20.0% (16.0–24.0)	1.01 (0.74–1.38)	0.95
TLLIN+IRS	935/3649	25.6% (21.0–30.2)	1.43 (1.05–1.93)	0.02
ULLIN+CTPS	630/3801	16.6% (13.7–19.5)	0.81 (0.61–1.07)	0.13
Overall				0.02

TLLIN=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years (reference group). ULLIN=LLIN-universal coverage of sleeping units. TLLIN+IRS=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years plus full coverage of carbamate-IRS. ULLIN+CTPS=LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of carbamate-treated plastic sheetings (CTPS). *Adjustment on age. LLIN=long-lasting insecticidal mosquito nets.

Table 5: Prevalence of asymptomatic infections in children younger than 6 years in the reference and intervention groups at 18 months follow-up

	Person-night catching	Annual mean	Incidence rate ratio	p value
Human biting rate* (number of bites per man per year)				
TLLIN (reference group)	896	331 (218–504)	1	..
ULLIN	896	464 (306–702)	1.40 (0.78–2.52)	0.26
TLLIN+IRS	896	228 (149–348)	0.69 (0.38–1.25)	0.22
ULLIN+CTPS	896	202 (132–309)	0.61 (0.33–1.11)	0.10
Entomological inoculation rate* (number of infected bites per man per year)				
TLLIN (reference group)	896	9.4 (5.1–17.1)	1	..
ULLIN	896	15.5 (9.3–25.8)	1.65 (0.75–3.64)	0.21
TLLIN+IRS	896	7.3 (3.8–14.2)	0.78 (0.32–1.91)	0.59
ULLIN+CTPS	896	5.7 (2.8–11.8)	0.61 (0.24–1.56)	0.30

TLLIN=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years (reference group). ULLIN=LLIN-universal coverage of sleeping units. TLLIN+IRS=LLIN-targeted coverage to pregnant women and children aged <6 years plus full coverage of carbamate-IRS. ULLIN+CTPS=LLIN-universal coverage of sleeping units plus full coverage of carbamate-treated plastic sheetings (CTPS). *Includes all malaria vectors (*A gambiae* and *A funestus*).

Table 6: Annual human biting rate and entomological inoculation rate in the reference and intervention groups at 12 months follow-up

anopheline vectors caught and infected anopheline vectors, taking into account the two-stage sampling design. We compared human biting and entomological inoculation rates between the reference and intervention groups by fitting negative binomial regression models using a GEE approach that took into account the sampling design—ie, the interdependence of

observations made in the same village. We analysed differences in *kdr* allelic frequency between groups using the exact test of Fisher with the GENESOP's software (Montpellier, France). This study is registered with Current Controlled Trials, number ISRCTN07404145.

Role of the funding source

The sponsor of the study and manufacturers had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Of the 58 villages screened, 28 were enrolled and randomly assigned to vector control intervention (TLLIN, ULLIN, TLLIN+IRS, and ULLIN+CTPS; figure 1). Between 651 and 920 children were assessed for eligibility in every group and 40–60% of them were randomised (figure 2). A total of 16 327 blood thick films were analysed (about 4000 in each group). In every group, about 20% of the recordings were not taken into account because of loss to follow-up (17%), death of children (1.5%), and refusal (1.5%; figure 2). Table 1 describes the demographic and environmental characteristics of the different groups. The four groups of children were similar in age, and the sex ratios (female vs male) varied from 0.85 to 1.0. Children's participation in clinical monitoring was high; 47% (429/920) for TLLIN, 52% (420/802) for ULLIN, 63% (413/651) for TLLIN+IRS, and 47% (415/890) for ULLIN+CTPS.

Overall, baseline epidemiological data obtained between Oct 10, 2007, and May 19, 2008, showed no difference in clinical and parasitological endpoints in the four groups of villages before allocation of the treatments (table 2), except that a higher prevalence of infections was observed in the group that received TLLIN+IRS relative to the reference group (table 2). 18 months after allocation of the interventions, malaria morbidity did not differ between the reference and the interventions groups; multivariate analysis taking into account the effect of age showed that the monthly incidence density of clinical malaria for 100 children was not significantly lower in the group receiving an ULLIN and those receiving either TLLIN+IRS or ULLIN+CTPS, relative to the reference group (table 3). Also, the mean parasite densities of infection did not differ significantly between groups (table 4). However, the prevalence of asymptomatic infection differed significantly between groups when adjusted on age; it was higher in the group of children that received the combination of TLLIN+IRS than in the reference group (table 5).

Entomological indicators did not differ significantly between groups (table 6). The mean number of bites of anopheline vectors (*A gambiae* and *A funestus*) per man per year did not differ significantly between the reference

group and the other groups (table 6). Sporozoite rates were 2.83% (95% CI 1.69–3.97) for TLLIN, 3.34% (2.30–4.38) for ULLIN, 3.22% (1.76–4.68) for TLLIN+IRS, and 2.83% (1.37–4.29) for ULLIN+CTPS ($p>0.05$). The annual entomological inoculation rates were neither significantly reduced by the universal coverage of LLIN nor by the combinations of TLLIN+IRS or ULLIN+CTPS (table 6). Parity rates were similar between the reference group (86%, 95% CI 83–88, 610 of 711) and the ULLIN (85%, 82–88, 634 of 746; $p=0.93$) or TLLIN+IRS (86%, 83–89, 458 of 534; $p=1$) groups, but a greater proportion of parous female mosquitoes was noted with ULLIN+CTPS (91%, 88–94, 401 of 441; $p=0.01$). Moreover, the proportion of malaria vectors (*A gambiae* and *A funestus*) collected outside the houses was higher with TLLIN+IRS (57%, 95% CI 53–61, 320 of 560; OR 1.27, 1.03–1.58; $p=0.0279$) and ULLIN+CTPS (59%, 55–64, 293 of 495; OR 1.39, 1.10–1.74; $p=0.0051$) relative to the reference (51%, 48–55, 417 of 816; $p<0.05$); the group that received ULLIN did not differ in exophagy rates from the reference group (OR 1.07, 0.90–1.28; $p=0.46$).

Before the intervention, the mean *kdr* allelic frequency in *A gambiae* was 29% (95% CI 26–32, $n=317$). 18 months after allocation of the interventions (figure 3), the prevalence of the *kdr* allele significantly increased in both the reference (86%, 95% CI 80–92, $n=65$) and the intervention groups (91%, 84–98, $n=33$ for ULLIN; 86% 79–93, $n=49$ for TLLIN+IRS; and 74%, 64–84, $n=38$ for ULLIN+CTPS, $p<0.0001$ for all). Prevalence of *ace.1^r* (119S) allele that confers resistance to carbamates was almost absent in the anopheline populations in the OKT district (frequency of *ace.1^r* $<5%$, $n=2123$).

Results of the quality control showed that mean ownership rate was 93% (95% CI 91–94, 970 of 1046) with the reference group (TLLIN), 87% (85–89, 1219 of 1405) with ULLIN, 94% (93–95, 1409 of 1493) with ULLIN+CTPS, and 90% (88–92, 868 of 968) with TLLIN+IRS. Mean LLIN coverage was 38% (95% CI 36–41, 662 of 1730) with TLLIN, 65% (62–67, 985 of 1524) with ULLIN, 70% (68–73, 1104 of 1569) with ULLIN+CTPS, and 45% (43–48, 611 of 1349) with TLLIN+IRS. The mean rates of LLIN use in children younger than 6 years was 43% (40–45, 517 of 1213) with TLLIN, 58% (54–61, 429 of 743) with ULLIN, 60% (57–64, 526 of 872) with ULLIN+CTPS, and 43% (40–46, 380 of 882) with TLLIN+IRS. Proportion of nets in good state (without holes) was 62% (59–65, 602 of 975) with TLLIN, 71% (68–73, 924 of 1308) with ULLIN, 75% (72–77, 1054 of 1413) with ULLIN+CTPS, and 69% (66–72, 602 of 873) with TLLIN+IRS.

Mean coverage of IRS and CTPS in the households was 92% (95% CI 86–96, 654 of 709) and 94% (85–98, 11592 of 12357), respectively. WHO cone bioassays initially done on random samples of 42 LLINs, eight sprayed walls, and six CTPS showed a mean mortality rate of 97% ($n=1633$), 100% ($n=200$), and 99% ($n=198$) against susceptible mosquitoes, respectively. At the end of the trial, 50 LLINs

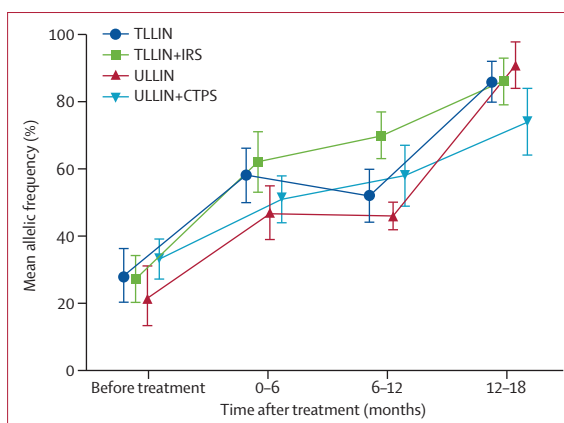


Figure 3: Changes in the frequency of the pyrethroid-resistant *kdr* (1014F) allele in *Anopheles gambiae* (with 95% CI) according to the intervention

taken at random from villages showed a good long-lasting insecticide activity (84% mean efficacy, with 19 bednets with mortality of less than 80%). The efficacy of CTPS against susceptible mosquitoes was excellent after 4 months (100% mortality, $n=99$) whereas that of IRS was rather low after 8 months (31%, $n=88$; ie, intervals of time corresponding to the retreatment of CTPS and IRS, respectively).

Discussion

We investigated the efficacy of new vector control strategies for malaria control and whether the use of combined interventions (ie, LLIN+IRS or LLIN+CTPS) would reduce malaria morbidity and transmission and allow better management of pyrethroid-resistance in malaria vectors relative to a background of LLIN coverage. Overall, however, neither clinical malaria nor the prevalence of infection and parasite density of asymptomatic infection in children younger than 6 years were reduced in southern Benin characterised by a malaria mesoendemic area.¹⁸ Additionally, transmission intensity and human biting rates did not significantly differ between the interventions and the reference group, and the insecticide combinations did not slow down the evolution of the *kdr* allele in *A gambiae* *ss* compared with LLIN. Despite the fact that the results reported in the manuscript are rather inconclusive, almost all the variables (clinical, parasitological, and entomological) showed the same trend. The consistency of these results is then in favour of the validity of the conclusion—ie, similar effect of the vector control measures in the reference group and in the three intervention groups.

The rationale behind expecting benefits from the combinations of LLINs and IRS was that more effective reduction of malaria-related morbidity would be expected by deploying the two interventions concurrently, with a non-pyrethroid insecticide for IRS, to maximise chances to interrupt fully the transmission.¹¹ Furthermore, since full coverage of either LLIN or IRS is usually difficult to

Panel: Research in context**Systematic review**

We searched Medline and Pubmed with the terms "malaria", "vector control", "combined interventions", "IRS and LLIN", or "pyrethroid resistance" for published reports, with no date restriction. Relevant original or review references were selected on the basis of the aims of the article. Limited number of observational studies^{9,10,28} or mathematical modelling exercises^{11,12} investigated the benefit of combinations of long-lasting insecticidal nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS) for malaria control in Africa. Results were sometimes contradictories and in none of them could confounding factors be entirely excluded.

Interpretation

Our cluster randomised controlled trial showed no significant benefit of using LLIN combined with carbamate-IRS or with CTPS for reducing malaria morbidity and for managing pyrethroid-resistance relative to a background of LLIN coverage. The rapid increase in *kdr* resistance in malaria vectors, the short-lived activity of the carbamate deployed for the IRS treatment, and the behavioural change in malaria vector populations in response to the insecticide treated materials may have accounted for the absence of effect of the combinations on malaria transmission and subsequently on malaria disease. Cost-effectiveness of combined vector control interventions need to be carefully considered in Africa to ensure that increased efforts and international funding dedicated to malaria control effectively contribute to reduce the disease burden. Alternative chemicals and improved vector control strategies are urgently needed to achieve malaria control and elimination in this part of the world.

achieve, a combination of the two interventions might offer a way of reaching and maintaining high coverage of malaria vector control. To our knowledge, a limited number of field trials have investigated the efficacy of LLIN and IRS for malaria control in Africa (panel). In Bioko (Equatorial Guinea) and in Mozambique, significant reduction of the prevalence of *P falciparum* infection in children aged from 2 to younger than 15 years was reported with IRS combined with insecticide-treated mosquito nets compared with IRS alone (OR 0.71, 95% CI 0.59–0.86 for Bioko and OR 0.63, 0.50–0.79 for Mozambique).⁹ In Burundi, however, pyrethroid-IRS and LLINs did not confer additional protection against *P falciparum* infection in children aged 1–9 years compared with those who slept under a net in the IRS-treated area (OR 0.88, 95% CI 0.60–1.31).²⁸ In these observational studies, which aimed to assess the effectiveness of vector control methods under real field conditions, several confounding factors might have influenced the outcomes such as access to diagnosis and treatment as well as coverage and effective use of vector control intervention. In the present study, we implemented an experimental approach with randomised allocation of the interventions to allow a robust analysis of the combined effect of LLINs and IRS (or CTPS) on malaria disease (ie, by controlling confounding factors related to secular trends in yearly vector density or malaria transmission, or both).

The results of this study indicated that TLLIN+IRS and ULLIN+CTPS did not sufficiently affect the vector population to decrease the malaria burden, despite the

high coverage of all interventions. The fact that ULLINs did not reduce malaria transmission compared with TLLIN indicate that ULLIN did not induce a mass killing effect on vector populations. Several assumptions can explain this trend. First, the additional LLIN use and coverage reported with ULLIN might not have been sufficient to strongly affect vector density, infectivity, and life expectancy of the vectors. Although several authors reported limited flight range of malaria vectors during host seeking,²⁹ one cannot totally exclude the fact that mixing of mosquito populations (ie, contamination) occurred between villages. Indeed, studies of the dispersal of malaria vectors done in Africa agree that mosquitoes are able to fly 4–5 km but, in most cases, more than 50% of vectors are recaptured within 1 km from the release point.³⁰ Moreover, we recently showed that the density of malaria vectors in the study area was strongly associated with the house's immediate surroundings and the proximity of a watercourse, hence confirming the preference for *A gambiae* mosquitoes to bite locally.³¹ Finally, the rapid increase of *kdr* frequency in malaria vectors might have accounted for the reduction of efficacy of LLIN at a community level. In the OKT district, Damien and colleagues¹⁸ have previously reported a poor protective effect against malaria infection (26%) in LLIN users (*vs* non users) without any effect on malaria morbidity. In Niger and Senegal, increased *kdr* frequency was also reported after nationwide distribution of LLINs by NMCPs.^{5,32} In this study,⁵ a rebound of clinical malaria attacks was noted in adults and children aged 10 years or older and that rebound was attributed to the rise in pyrethroid-resistance in malaria vectors. Clearly, further investigation is needed to assess whether pyrethroid-resistance can account for reduced efficiency of LLINs for malaria prevention in Africa.

In the past decade, carbamates have been increasingly used for malaria control in Africa as they represent promising alternatives to pyrethroids for IRS. On the island of Bioko, an IRS campaign with bendiocarb (two spray rounds per year) was associated with modest but significant reduction in transmission index and malaria reported cases.^{9,33} In Benin, a before-and-after comparison trial done in the Ouémé district showed significant effect of bendiocarb-IRS (400 mg/m²) on vector density and malaria transmission in areas where *A gambiae* has developed high resistance to pyrethroids.³⁴ In the present study, however, we did not observe additional effect of carbamate-based treatments on mosquito density relative to LLIN alone. This is surprising given that malaria vectors in the area are susceptible to these chemicals.³⁵ Bendiocarb-IRS was sprayed at the same rate (400 mg/m²) and at the same interval of time (ie, 8 months) as the Ouémé study in agreement with the policy of PMI in Benin.³⁴ However, only 34% efficacy was recorded 8 months post treatment against susceptible mosquitoes, hence suggesting a rapid decay of bendiocarb on the walls of the houses. The fact

that around 90% of the huts of the villages were made of mud could partly explain this trend since more porous substrates are known to absorb the insecticide and then limit the duration of the treatment.

Generally, one spray round per year of bendiocarb is done in African countries because of poor human and financial resources.³⁶ According to the WHO-Pesticide Evaluation Scheme,¹⁷ the expected residual activity of bendiocarb is 2–6 months, suggesting that more frequent spray rounds would be needed to maintain good effectiveness in areas of perennial malaria transmission. With the present policy, we think that IRS campaigns with the available insecticidal products might not be a cost-effective strategy for malaria control in highly endemic malaria settings. More information on the life expectancy of the insecticides used for IRS is needed to guide national authorities on the interval of time to adopt for effective control of malaria vectors in different settings. Regarding the CTPS, the lower dosage than that used for IRS and the possibility that mosquitoes rest on the untreated part of the wall might have had a role in the absence of effect on malaria disease and transmission. The development of long-lasting IRS formulations or durable residual wall lining (DL), or both, could overcome these limitations.³⁷

Finally, fewer mosquitoes entered the houses containing both IRS and LLINs than houses containing LLINs alone. The greater exophagy rates recorded with the combinations might portray a behavioural change in the malaria vector populations in response to the combined deterrent-repellent effects of carbamates and pyrethroids. In Tanzania, *A. gambiae* has changed from being endophagic to exophagic and endophilic to exophilic as coverage of pyrethroid impregnated nets increases.³⁸ Whether these changes show phenotypic plasticity or selection of inherited characteristics in the mosquito population remains unclear, the consequence could be an increase of outdoor residual transmission of malaria. Similar trends were reported elsewhere,^{10,39,40} suggesting that intradomiciliary treatments (ie, LLIN and IRS) that exclusively target endophagic or endophilic populations, or both, could not be sufficient to reduce the vectorial capacity of malaria vectors even with high coverage. As suggested by mathematical models,¹² combinations of interventions that target different stages in the mosquito's lifecycle—eg, the aquatic stages with larvicides in areas with high insecticide-treated mosquito nets or IRS coverage, could be more efficient to reduce mosquito density and hence achieve a mass killing effect.

To conclude, this study showed that in areas with low malaria vector density (about one anopheline bite per man per night) and with low but perennial malaria transmission (0.5 to one infective bite per man per month), the combination of LLINs and carbamate-IRS applied every 8 months (or CTPS impregnated with bendiocarb fixed to the upper part of the walls) was not

sufficiently powerful to decrease the incidence of clinical malaria compared with a background of LLIN coverage. This finding could be an obstacle to the malaria pre-elimination phases in Africa if the current vector control interventions cannot reduce malaria transmission under a critical threshold. As pointed out by the malERA consultative group on vector control,⁸ an urgent need exists for improved strategies to effectively reduce the vectorial capacity of mosquitoes, especially as we move into the malaria elimination and eradication era.

Contributors

M-CH, FC, MA, and VC conceived the study. GBD, AD, NM, JC, BB, and GGP acquired the lab and field data, and CR did the statistical analysis and contributed to the study design. VC drafted the paper and all co-authors contributed to the critical revision and development of intellectual content. VC, FC, MA, and M-CH were the study supervisors.

Conflicts of interest

We declare that we have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was done in the context of the Project FSP/REFS N° 2006–22 supported by the Ministère Français des Affaires Étrangères et Européennes (MAEE). A financial contribution was also provided by the President's Malaria Initiative (PMI) of the US Government for indoor residual spraying. Bayer provided free of charge the bendiocarb (FICAM 80 WP) and binding agent to the investigators. We thank populations and authorities of the OKT district for their kind support and collaboration. We also thank all the staff of CREC (Sandra Yamadjako, Razack Ossé, Sébastien Koudenoukpo) for their commitment and motivation during the trial. Thanks to Raphael N'Guessan (LSHTM) for helpful comment and discussion. We thank France Agid, Xavier Garde, Jean-Paul Moulia-Pelat, and Patrice Leroy for their continuous support during the preparation and follow up of the project. We thank Bayer for providing the insecticide products free of charge.

References

- 1 Feachem RG, Phillips AA. Malaria: 2 years in the fast lane. *Lancet* 2009; **373**: 1409–11.
- 2 WHO. World Malaria Report 2011. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ (accessed May 21, 2012)
- 3 Pluess B, Tanser FC, Lengeler C, Sharp BL. Indoor residual spraying for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; **4**: CD006657.
- 4 Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; **2**: CD000363.
- 5 Trape J-F, Tall A, Diagne N, et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 925–32.
- 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**: 91–98.
- 7 WHO. Global Malaria Action Plan World Health Organization; 2009. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009.
- 8 The malERA consultative group on vector control. A research agenda for malaria eradication: vector control. *PLoS Med* 2011; **8**: e1000401.
- 9 Kleinschmidt I, Schwabe C, Shiva M, et al. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **81**: 519–24.
- 10 Okumu FO, Moore SJ. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malar J* 2011; **10**: 208.
- 11 Chitnis N, Schapira A, Smith T, Steketee R. Comparing the effectiveness of malaria vector-control interventions through a mathematical model. *Am J Trop Med Hyg* 2010; **83**: 230–40.
- 12 White MT, Griffin JT, Churcher TS, Ferguson NM, Basanez MG, Ghani AC. Modelling the impact of vector control interventions on *Anopheles gambiae* population dynamics. *Parasit Vectors* 2011; **4**: 153.

- 13 Djenontin A, Chabi J, Baldet T, et al. Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets. *Malar J* 2009; **8**: 233.
- 14 Djenontin A, Chandre F, Dabire KR, et al. Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long-lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg* 2010; **83**: 266–70.
- 15 Hawley WA, Phillips-Howard PA, ter Kuile FO, et al. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2003; **68**: 121–27.
- 16 WHO. Technical updates of the guidelines on the Integrated Management of Childhood illness (IMCI). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2005.
- 17 WHO. Guidelines for testing mosquito adulticides intended for indoor residual spraying (IRS) and insecticide treated nets (ITNs). Geneva, Switzerland: WHO, 2006.
- 18 Damien G, Djenontin A, Rogier C, et al. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malar J* 2011; **9**: 380.
- 19 Gillies M, De Meillon B. The *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). 2nd edn. Johannesburg: South African Institute for Medical Research, 1968: 343.
- 20 Gillies M, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Johannesburg: South African Institute for Medical Research, 1987: 143.
- 21 Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ* 1987; **65**: 39–45.
- 22 Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **49**: 520–29.
- 23 Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**: 804–11.
- 24 Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, 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.
- 25 Weill M, Malcolm C, Chandre F, et al. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 2004; **13**: 1–7.
- 26 Anonymous. Monitoring and evaluation toolkit, HIV/AIDS, tuberculosis and malaria. WHO/World Bank/UNICEF, 2004. http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/me_toolkit_en.pdf (accessed May 21, 2012).
- 27 Hayes RJ, Bennett S. Simple sample size calculation for cluster-randomized trials. *Int J Epidemiol* 1999; **28**: 319–26.
- 28 Protopopoff N, Van Bortel W, Marcotty T, et al. Spatial targeted vector control is able to reduce malaria prevalence in the highlands of Burundi. *Am J Trop Med Hyg* 2008; **79**: 12–18.
- 29 Service MW. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal—the long and short of it. *J Med Entomol* 1997; **34**: 579–88.
- 30 Silver JB. Measuring adult dispersal. In: Silver JB, ed. Mosquito ecology: field sampling methods. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008: 1377–424.
- 31 Cottrell G, Kouwaye B, Pierrat C, et al. Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in Benin and its implications for cohort study. *PLoS One* 2012; **7**: e28812.
- 32 Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J* 2008; **7**: 189.
- 33 Sharp BL, Ridl FC, Govender D, Kuklinski J, Kleinschmidt I. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malar J* 2007; **6**: 52.
- 34 Akogbeto M, Padonou GG, Bankole HS, Gazard DK, Gbedjissi GL. Dramatic decrease in malaria transmission after large-scale indoor residual spraying with bendiocarb in Benin, an area of high resistance of *Anopheles gambiae* to pyrethroids. *Am J Trop Med Hyg* 2011; **85**: 586–93.
- 35 Djegbe I, Boussari O, Sidick A, 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.
- 36 USAID. The President's Malaria initiative: fourth annual report. Washington: US Agency for International Development, 2010.
- 37 Corbel V, Henry MC. Prevention and control of malaria and sleeping sickness in Africa: where are we and where are we going? *Parasit Vectors* 2011; **4**: 37.
- 38 Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J* 2011; **10**: 80.
- 39 Nyarango PM, Gebremeskel T, Mebrahtu G, et al. A steep decline of malaria morbidity and mortality trends in Eritrea between 2000 and 2004: the effect of combination of control methods. *Malar J* 2006; **5**: 33.
- 40 Moiroux N, Boussari O, Djènontin A, et al. Dry season determinants of malaria disease and net use in Benin, west Africa. *PLoS One* 2012; **7**: e30558.

RESEARCH

Open Access

Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study

Armél Djènontin^{1,2*}, Sahabi Bio-Bangana¹, Nicolas Moiroux², Marie-Claire Henry^{2,4}, Olayidé Bousari², Joseph Chabi², Razaki Ossè¹, Sébastien Koudénoukpo¹, Vincent Corbel², Martin Akogbéto¹, Fabrice Chandre³

Abstract

Background: To implement an Insecticide Resistance Management (IRM) strategy through a randomized controlled trial (phase III), 28 villages were selected in southern Benin. No recent entomological data being available in these villages, entomological surveys were performed between October 2007 and May 2008, before vector control strategies implementation, to establish baseline data.

Methods: Mosquitoes were sampled by human landing collection (16 person-nights per village per survey per village) during 5 surveys. Mosquitoes were identified morphologically and by molecular methods. The *Plasmodium falciparum* circumsporozoite indexes were measured by ELISA, and the entomological inoculation rates (EIRs) were calculated. Molecular detection of pyrethroid knock down resistance (*Kdr*) and of insensitive acetylcholinesterase were performed.

Results: 44,693 mosquitoes belonging to 28 different species were caught from October 2007 to May 2008. Among mosquitoes caught, 318 were *An. gambiae s.s.*, 2 were *An. nili*, 568 were *An. funestus s.s.*, and one individual was *An. lesoni*. EIR was 2.05 ± 1.28 infective bites per human per 100 nights on average, of which 0.67 ± 0.60 were from *An. funestus* and 1.38 ± 0.94 infective bites were from *An. gambiae*. Important variations were noted between villages considering mosquito density and malaria transmission indicating a spatial heterogeneity in the study area. The *kdr* allelic frequency was 28.86% in *An. gambiae s.s.* on average and significantly increases from October 2007 (10.26%) to May 2008 (33.87%) in M molecular form of *An. gambiae s.s.* *Ace 1* mutation was found in S molecular of *An. gambiae s.s.* at a low frequency (< 1%).

Conclusion: This study updates information on mosquito diversity and malaria risk in rural villages from south Benin. It showed a high spatial heterogeneity in mosquito distribution and malaria transmission and underlines the need of further investigations of biological, ecological, and behavioral traits of malaria vectors species and forms. This study is a necessary prerequisite to cartography malaria risk and to improve vector control operations in southern Benin.

Background

Malaria remains a major cause of morbidity and mortality in sub-Saharan Africa and represents one of the most critical public health challenges for Africa. In 2008, 243 million cases of malaria was estimated worldwide leading to 863 000 deaths of which 89% were in the African

Region [1]. Treatment with Artemisinin Combination Therapy (ACT), the use of Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) represent the main approaches of malaria control [1]. Household ITNs ownership reached more than 50% in several high burden African countries [1]. Pyrethroids are the only insecticides used for net impregnation because of their strong efficacy, their fast acting effect at low doses and their low toxicity for mammals [2]. Unfortunately, pyrethroids resistance in malaria vectors has spread across Africa and

* Correspondence: armeldj@yahoo.fr

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

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

is now present in most of countries where national malaria control programmes (NMCP) are implementing large scale distribution of Long Lasting Nets to populations at risk, i.e. children under five and pregnant women [3]. Up to now, there is no evidence that pyrethroids resistance reduce the effectiveness of ITNs for malaria control at operational scale [4]. However, a small scale field trial carried out in an area of resistance in southern Benin (Ladji) and Burkina Faso (Kou Valley) showed a reduction of personal protection and overall insecticidal effect of ITNs in experimental huts [5-7].

It is then urgent to find ways to manage this resistance in malaria vectors. In this context, malaria vectors control and insecticide resistance management tools based on the use (alone or in combination with pyrethroid-treated mosquito nets) of alternative classes of insecticides with different mode of action than pyrethroids were developed and have already been evaluated in experimental huts, with good results against wild populations of strongly resistant *An. gambiae* [6,7].

To validate these strategies, their impact on malaria transmission and insecticide resistance dynamic in malaria vectors must be assessed through randomized controlled trials under phase III. For that purpose, 28 villages were selected in Ouidah-Kpomasse-Tori (OKT) health district in southern Benin. No entomological data from OKT health district was available. Recent data relative to *Culicidae* fauna of Benin go back up to 1950s [8,9]. Thus, in order to collect baseline data relative to mosquito's diversity and abundance, malaria transmission and the prevalence of insecticide resistance alleles in malaria vectors, entomological surveys were performed between October 2007 and May 2008 in the study area before implementing the vector control strategies. This paper reports these baseline data.

Methods

Study area

The study was carried out in OKT health district. Twenty eight villages were selected considering a size between 250-500 inhabitants, a distance between two villages higher than two kilometers and the absence of a local health center. The OKT health district is one of 36 health districts in Benin. This district has essentially a sub-equatorial climate, with two dry seasons (August-September and December-March), and two rainy seasons (April-July and October-November). The average annual rainfall is around 1200 mm, of which 700-800 mm come in the first rainy season and 400-500 mm come in the second rainy season. The average monthly temperatures vary between 27 and 31°C. The northern part of the health district is made of a plateau that drops into the Couffo

valley and the Allada depression. The southern is watered by several ramification arms of Toho Lake (Fig 1). The study zone is totally cleared of the original equatorial forest. Currently, the vegetation is characterized by bushes and isolated trees, associated with areas with more or less densely populated areas with oil palm trees.

Mosquito's collection and identification

Sampling of mosquitoes was done in 28 villages by human landing catches using tubes that were plugged with cotton. Mosquitoes collection was carried out during 5 surveys from October 2007 to May 2008 (2 in the beginning of rainy periods and 3 in dry periods) every 6 weeks both indoors and outdoors at 4 sites per village from 10 p.m. to 6 a.m. and for two consecutive nights per survey (i.e. 16 person-nights per village per survey). Teams of collectors were rotated among the collection points on different collection nights to minimize sampling bias. Ethical clearance was given for the study by the National Ethical Committee in Benin (Comité National Provisoire d'Ethique pour la Recherche en Santé) and IRD ethical committee (Comité Consultatif de Déontologie et d'Ethique). Collectors gave prior informed consent and they were vaccinated against yellow fever. Since study was done in area where malaria is endemic, adult collectors that already acquired immunity against malaria parasites, did not received chemoprophylaxis, but were medically supervised by local physicians in case of illness.

Mosquitoes were identified on the field to species level using morphological criteria according to the identification keys [10-12]. All mosquitoes belonging to the *An. gambiae* complex or *An. funestus* group were stored in individual tubes with silica gel and preserved at -20°C in the laboratory.

Determination of EIRs

Heads and thoraces of anopheline females were tested by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of *P. falciparum* circumsporozoite protein (CSP), as previously described [13]. Samples having an optical density higher than 3 times the average of the optical density of negative control were considered as positive. Those having an optical density between 2 and 3 times this average were considered as doubtful and were retested.

The CSP index was calculated as the proportion of mosquitoes found to be positive for CSP. Entomological inoculation rates (EIRs) were estimated as the number of infective bites per human per 100 nights.

Molecular analysis

All mosquitoes belonging to *An. gambiae* complex and *Anopheles funestus* group were identified by polymerase chain reaction (PCR) at the species levels [14,15].

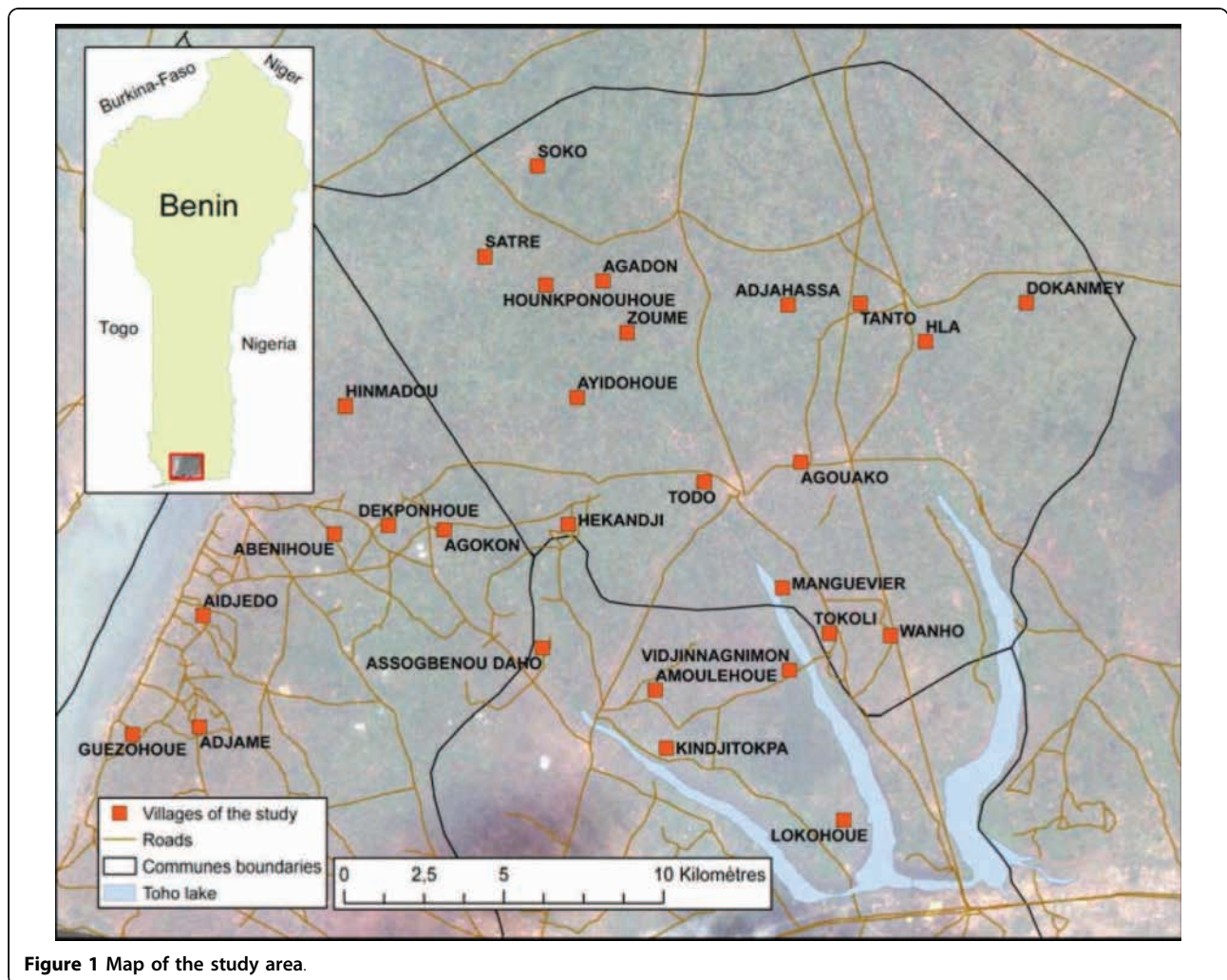


Figure 1 Map of the study area.

Molecular forms in *Anopheles gambiae s.s.* were also identified [16].

Molecular characterizations of the *Kdr* (west-African Leu-Phe mutation) and *Ace1* mutations were carried out on all mosquitoes belonging to *An. gambiae* complex as previously described [17,18]

Statistical analysis

Chi-square tests were done to determine the odds of association of the CSP index with malaria vectors *An. gambiae* and *An. funestus*.

Data relative to mosquito's density and EIRs according to villages were analyzed using a Linear Mixed Effects (LME) model implemented in R software and written as follow:

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

x = means of mosquitoes number (or EIRs) per village per survey

β_0 = estimated value of coefficient associated to the reference village

β_{1i} = estimated value of coefficient associated to a village i

a_i = intra-village variance

i = village index

Villages were grouped according to their homogeneity for the entomological indicator considered taking into account β_i and its P value. In each group, the average of the number of mosquitoes caught per village per survey (or the number of infective bites per human per 100 nights) was calculated with its 95% confidence interval.

The genotypic differentiation of *kdr* and *Ace1* loci was tested using the Fischer exact test implemented in GenPop software [19].

Results

Species diversity and density

A total of 44,693 mosquitoes belonging to 28 species were caught (table 1). *Mansonia Africana* (44.84%), *Culex gr. decens* (29.91%), *Culex quinquefasciatus* (9.81%), and *Culex nebulosis* (6.22%) were the most

Table 1 Mosquitoes species caught from October 2007 to May 2008 in the study area

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

abundant species caught. The proportion of malaria vectors (*Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*) was very low (~2%).

All mosquitoes belonging to *Anopheles gambiae s.l.*, were *An. gambiae s.s.* (217 from S molecular form and 101 from M form). Concerning *Anopheles funestus* group all mosquitoes were identified by PCR as *Anopheles funestus s.s.* except one individual which was *An. leesoni*, caught in Tokoli-Vidjinangnimon village.

Large variations were observed between villages considering mosquito's density. An average of 212 ± 46 *Culicidae* per village per survey and 531 ± 139 *Culicidae* per village per survey were caught in two different homogenous villages groups (Table 2). Concerning *An. gambiae s.l.* on average 0.4 ± 0.2 ; 1.8 ± 0.6 and 7.4 ± 3.5 individuals were caught per village per survey in three different homogenous villages groups (Table 3). In villages close to a arm of the Toho Lake, 13.48 ± 5.9 *An. funestus s.l.* were caught on average per village per

Table 2 Average of *Culicidae* number caught per survey per village from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals

Villages groups	Average <i>Culicidae</i> number per survey per village with 95% confidence intervals
Group 1: Agouako; Assogbenoudaho; Guezohoue; Hla; Todo; Zoume; Adjahassa; Satre; Agadon; Aidjedo; Ayidohoue; Dokanme; Tokoli Vidjinangnimon; Hekandji; Hounkponouhou; Dekponhoue; Soko; Wanho; Tokoli; Tanto	212 ± 46
Group 2 : Lokohoue; Tokoli Vidjinangnimon; Manguevier; Adjame-Allagbede; Amoulehoue; Kindjitokpa; Abenihoue; Hinmandou	531 ± 139

survey, in contrast with 0.29 ± 0.1 in the others villages (Table 4).

Vectors infection to CSP and malaria transmission risk

The CSP positivity rate was $9.63 \pm 3.2\%$ in *An. gambiae s.s.* ($5.94 \pm 0.4\%$ in M molecular form and $11.52 \pm 0.2\%$ in S form) and $2.64 \pm 1.3\%$ in *An. funestus s.l.*. *An. gambiae s.s.* was more infected than *An. funestus s.l.* (OR = 4.00 (95%IC 2.13-7.54), $P < 0.001$). The average of EIR from October 2007 to May 2008 was 2.05 ± 1.28 infective bites per human per 100 nights of which 0.67 ± 0.60 infective bites of *An. funestus* per human per 100 nights and 1.38 ± 0.94 infective bites of *An. gambiae* per human per 100 nights. EIR was very variable according to villages. Two homogenous villages groups with respectively 0.7 ± 0.4 and 6.1 ± 3.4 infective bites per human per 100 nights were observed (Table 5).

Table 3 Average of *An. gambiae s.l.* number caught per survey per village from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals

Villages groups	Average <i>An. gambiae s.l.</i> number per survey per village with 95% confidence intervals
Group 1: Adjame-Allagbede; Agouako; Assogbenoudaho; Kindjitokpa; Guezohoue; Hinmandou; Hla; Abenihoue; Todo; Zoume	0.4 ± 0.2
Group 2: Adjahassa; Satre; Lokohoue; Agadon; Aidjedo; Ayidohoue; Dokanme; Tokoli Vidjinangnimon; Hekandji; Agokon; Hounkponouhou; Dekponhoue; Manguevier	1.8 ± 0.6
Group 3: Amoulehoue; Soko; Tokoli; Tanto; Wanho	7.4 ± 3.5

Table 4 Average of *An. funestus s.l.* number caught per survey per village from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals

Villages groups	Average <i>An. funestus s.l.</i> number per survey per village with 95% confidence intervals
Group 1: Adjame-Allagbede; Agouako; Assogbenoudaho; Guezohoue; Hinmandou; Hla; Abenihoue; Todo; Zoume; Adjahassa; Satre; Agadon; Agokon; Aidjedo; Ayidohoue; Dokanme; Hekandji; Hounkponouhoue; Dekponhoue; Soko	0.29 ± 0.1
Group 2: Amoulehoue; Tokoli; Tanto; Lokohoue; Manguevier; Kindjitokpa; Tokoli Vidjinangnimon; Wanho	13.48 ± 5.9

Kdr resistance gene status in *An. gambiae*.

The average of *kdr* allelic frequency from October 2007 to May 2008 was 28.86% in *An. gambiae s.s.* At the beginning of the study (From October to December 2007), *kdr* allelic frequency was significantly higher in S molecular form of *An. gambiae s.s.* (28.08%) compared to the M molecular form (10.26%) ($P = 0.001$). This allelic frequency significantly increased in the M molecular form and has reached 33.87% ($P < 0.001$) from January to May 2008 (Table 6).

Insensitive acetylcholinesterase gene status in *An. gambiae s.l.*

The allelic frequency of this gene was less than 1%. Only two heterozygous individuals was found in the S molecular form of *An. gambiae s.s.* at Tanto and Hekandji during October 2007.

Discussion

The present study provides entomological baseline data on OKT health district. Twenty eight different species

Table 5 Number of infective bites per human per 100 nights from October 2007 to May 2008 with 95% confidence intervals

Villages groups	Number of infective bites per human per 100 nights with 95% confidence intervals
Group 1 : Adjame; Agouako; Aidjedo; Asogbenoudaho; Ayidohoue; Adjahassa; Dokanme; Kindjitokpa; Guezohoue; Hinmandou; Hla; Hounkponouhoue; Abenihoue; Dekponhoue; Manguevier; Satre; Todo; Tokoli; Wanho; Agadon; Zoume	0.7 ± 0.4
Group 2 : Amoulehoue; Tokoli Vidjinangnimon; Hekandji; Agokon; Soko; Lokohoue; Tanto	6.1 ± 3.4

Table 6 *kdr* in M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* from October 2007 to May 2008 in the study area

	October-December 2007		January-May 2008	
	M form	S form	M form	S form
RR	0	10	13	16
RS	8	62	16	20
SS	31	74	33	35
Total	39	146	62	71
Allelic frequency (%)	10.26^a	28.08^b	33.87^b	36.62^b

Kdr allelic frequency values carrying the same letter was not significantly different ($P > 0.05$)

were caught during surveys whereas Huttel (1950) and Hamon (1954) had collected respectively 13 species (adult's collection in the dwellings) and 45 species (adult and larval collection) in the south-east of Benin (Cotonou and Porto-Novo) [8,9]. If the *Culicidae* diversity is lower in our study, we have identified 3 *Anopheles* species that was not mentioned in Hamon study: *An. brohieri*, *An. coustani* and *An. nili*. These 3 species were present at very low densities, explaining why they were not reported previously. More unexpected is the predominance in our study of *Mansonia africana* and the presence of *Cx. quinquefasciatus* that were not reported by Hamon. The relative abundance of *Cx. quinquefasciatus* is particularly surprising for a species which is adapted to polluted larval breeding sites and usually more familiar with urban environment than traditional villages from this study. Results showed a high heterogeneity of the study area in terms of *Culicidae* and especially malaria vectors abundance. It could be due to the geographic pattern of this area that is characterized by a northern part made of a plateau and the southern watered by several ramification arms of Toho Lake. *An. funestus* density was higher in villages close to arms of Toho Lake (< 2 km), since some of its larval breeding sites are the bank of lake or river with vegetation. In most villages of the study area, the soil is made of a thick bed of a mixture of sand and clay allowing a rapid water infiltration after rain. This impedes the formation of *An. gambiae* larval breeding sites that could explain the low density of malaria vectors. However, on the 5 surveys conducted in each village, only two were conducted during a rainy period (in the beginning of the rainy periods). This could explain the very low number of anopheles vectors caught during the study. Further studies conducted on a long period and taking into account environmental factors are required to better understand mosquito's distribution determinants in this area.

Anopheles gambiae s.s. and *An. funestus s.s.* were shown to be the main vectors in the study area, confirming previous studies in West Africa [20-22]. The

relative abundance of *An. funestus* in the study area and its CSP positivity rate (2.64 ± 1.3) indicate that this mosquito is involved in malaria transmission in southern Benin. No data relative to resistance status and mechanisms of this vector being available in Benin, further studies about *An. funestus* populations and their resistance mechanisms are required. The EIR, 2.05 ± 1.28 infective bites per human per 100 nights on average, indicates that in the study area, malaria is mesoendemic. These data agree with parasitological and clinical data collected in the same way in these villages indicating an annual prevalence rate of 21.8% (19.1-24.4) in young asymptomatic children and a clinical incidence of *Plasmodium falciparum* malaria of 1.5 (1.2-1.9) per child per year (Damien *et al.* 2010, unpublished data).

The *kdr-w* resistance allele was identified in *An. gambiae* populations examined in this study and have significantly increased from October 2007 to May 2008 in M molecular form in contrast with S form, indicating probably that M and S molecular forms of this vector undergo different selection pressures in the study area and underlines the need of further studies taking into account ecological and others factors. The presence of the *kdr-w* allele in *An. gambiae s.s.* and the increase of its frequency are worrying because this gene and metabolic resistance mechanisms in southern Benin appears to have a significant impact on LLIN efficacy as demonstrated by recent experimental hut trial [23]. Many other studies have showed a strong decrease of Pyrethroid-Treated Nets performance against pyrethroid-resistant malaria vectors in Benin [5,6], Burkina Faso [7], and Côte d'Ivoire [24].

Regarding carbamate resistance, we confirmed the low allelic frequency of the *ace-1^R* allele (< 1%) in *An. gambiae s.s.* in West Africa [25], showing that there is no (or very low) selection pressure on this allele in the study area. However, a monitoring of this resistance gene is required considering the large scale implementation of Indoor Residual Spraying using bendiocarb by President's Malaria Initiative program in south Benin that will inevitably increase the selection pressure on vectors populations.

Conclusion

This study updates information on mosquito's distribution and their role in malaria transmission in southern Benin. It showed a high spatial heterogeneity in mosquitoes distribution and malaria transmission and then underlines the need of further investigations of biological, ecological, and behavioral traits of malaria vectors species and forms. That will allow to cartography

malaria risk and then to improve vector control interventions in Benin.

Acknowledgements

We thank the Ministère Français des Affaires Etrangères for project REFS N° 2006-22 and the Institut de Recherche pour le Développement, which financially and materially supported the work. We thank populations of the study area, OKT health district, for their collaboration. We also thank Seth Irish for his linguistic assistance while drafting this manuscript.

Author details

¹Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, Bénin. ²Institut de Recherche pour le Développement (IRD/UR016), 01 BP 4414 Cotonou, Bénin. ³Laboratoire de lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN/IRD), 911 Ave Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. ⁴Service de Coopération française, Ambassade de France, Cotonou, Bénin.

Authors' contributions

FC and M-CH conceived of the study. AD, JC and FC have participated in the design of the study. Entomologic data was collected by AD, JC, RO, SK, AD, SK and RO carried laboratory analysis. AD, FC, OB and VC have participated in the analysis and interpretation of data. Maps were provided by SBB and NM. The manuscript has been drafted by AD, AD, SBB, NM, M-CH, OB, JC, RO, SK, VC, MA and FC have been involved in manuscript revising. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 14 July 2010 Accepted: 6 September 2010

Published: 6 September 2010

References

1. WHO: **World Malaria Report 2009**. World Health Organization, Geneva 2009.
2. Zaim M, Aitio A, Nakashima N: **Safety of pyrethroid-treated mosquito nets**. *Med Vet Entomol* 2000, **14**:1-5.
3. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, Donnelly MJ, Petrarca V, Simard F, Pinto J, della Torre A: **Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa**. *Malar J* 2008, **7**:74.
4. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevale P: **Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire**. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:859-864.
5. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M: **Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin**. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:199-206.
6. Djènontin A, Chabi J, Baldet T, Irish S, Penetier C, Hougard JM, Corbel V, Akogbeto M, Chandre F: **Managing insecticide resistance in malaria vectors by combining carbamate-treated plastic wall sheeting and pyrethroid-treated bed nets**. *Malar J* 2009, **8**:233.
7. Djènontin A, Chandre F, Dabiré KR, Chabi J, N'Guessan R, Baldet T, Akogbeto M, Corbel V: **The Indoor Use of Plastic Sheetting Impregnated with Carbamate in Combination with Long Lasting Insecticidal Mosquito Nets for the Control of Pyrethroid-resistant Malaria**. *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83**:266-270.
8. Huttel J: **Note sur la répartition des moustiques dans le Bas-Dahomey**. *Bull Soc Path Exot* 1950, **43**:563-566.
9. Hamon J: **Contribution à l'étude des Culicidés de la région de Porto-Novo (Bas-Dahomey)**. *Ann parasitologie* 1954, **29**:588-594.
10. Edwards F: **Mosquitoes of the Ethiopian Region III. Culicine adults and pupae**. *British Museum (Nat Hist), London* 1941.
11. Gillies MT, De Meillon BL: **The Anophelinae of Africa south of the Sahara** Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg 1968, 54.

12. Gillies MT, Coetzee M: *A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region)* Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg 1987, 55.
13. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, Campbell GH, Burkot T, Schneider I, Esser KM, Beaudoin RL, Andre RG: **Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development.** *Bull World Health Organ* 1987, **65**:39-45.
14. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH: **Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:520-529.
15. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M: **A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:804-811.
16. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C: **Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 2001, **10**:19-23.
17. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: **Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*knr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
18. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M: **The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect Mol Biol* 2004, **13**:1-7.
19. Raymond M, Rousset F: **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** *J Heredity* 1995, **86**:248-249.
20. Akogbeto M: **Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake.** *Ann Soc Belg Med Trop* 1995, **75**:219-227.
21. Fontenille D, Simard F: **Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, **27**:357-375.
22. Louise A, Kelly-Hope L, Ellis McKenzie F: **The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa.** *Malar J* 2009, **8**:19.
23. WHO: **Report of the twelfth WHOPEP Working group meeting.** *WHO/HTM/NTD/WHOPEP* 2009, **1**.
24. N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P: **Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire.** *Med Vet Entomol* 2001, **15**:97-104.
25. Djogbénou L, Dabire R, Diabate A, Kengne P, Akogbeto M, Hougard JM, Chandre F: **Identification and geographic distribution of the ACE-1R mutation in the malaria vector *Anopheles gambiae* in south-western Burkina Faso, West Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:298-302.

doi:10.1186/1756-3305-3-83

Cite this article as: Djènontin *et al.*: *Culicidae* diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasites & Vectors* 2010 **3**:83.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa

Nicolas Moiroux^{1,2}, Olayidé Boussari², Armel Djènontin^{1,2}, Georgia Damien¹, Gilles Cottrell^{3,4}, Marie-Claire Henry^{2,5}, Hélène Guis⁶, Vincent Corbel^{1,2*}

1 MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cotonou, Bénin, **2** Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou (CREC), Ministère de la Santé, Cotonou, Bénin, **3** UMR216 Mère et Enfant Face aux Infections Tropicales, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cotonou, Bénin, **4** Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Bénin, **5** Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC), Ambassade de France, Cotonou, B  nin, **6** UMR CMAEE, CIRAD, Montpellier, France

Abstract

Background: To achieve malaria eradication, control efforts have to be sustained even when the incidence of malaria cases becomes low during the dry season. In this work, malaria incidence and its determinants including bed net use were investigated in children of under 5 years of age in 28 villages in southern Benin during the dry season.

Methods and Findings: Mean malaria clinical incidence was measured in children aged 0–5 years by active case detection in 28 villages of the Ouidah-Kpomasse-Tori Bossito sanitary district between November 2007 and March 2008. Using Poisson mixed-effect models, malaria incidence was assessed according to the level of transmission by different vector species, and Long-Lasting Insecticide-treated mosquito Nets (LLIN) use and ownership. Then, a Binomial mixed-effect model was developed to assess whether nighttime temperature (derived from MODIS remote sensing data), biting nuisance and LLIN ownership are good predictors of LLIN use >60%. Results suggested that *Anopheles funestus* (Incidence Rates Ratio (IRR) = 3.38 [IC95 1.91–6]) rather than *An. gambiae* s.s. is responsible for malaria transmission. A rate of LLIN use >60% was associated with a lower risk of malaria (IRR = 0.6 [IC95 0.37–0.99]). Low nocturnal temperature and high biting nuisance were good predictors of LLIN use >60%.

Conclusions: As recommended by the Malaria Eradication (MalERA) Consultative Group on Modelling, there is a need to understand better the effects of seasonality on malaria morbidity. This study highlights the need to take into account the specificity of malaria epidemiology during the dry-hot season and get a better understanding of the factors that influence malaria incidence and net use. These findings should help National Malaria Control Programmes to implement more effective and sustainable malaria control strategies in Africa.

Citation: Moiroux N, Boussari O, Dj  nontin A, Damien G, Cottrell G, et al. (2012) Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. PLoS ONE 7(1): e30558. doi:10.1371/journal.pone.0030558

Editor: João Pinto, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Portugal

Received: September 14, 2011; **Accepted:** December 19, 2011; **Published:** January 23, 2012

Copyright:    2012 Moiroux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Ministry of Foreign Affairs and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD)[FSP project REFS N  2006-22]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vincent.corbel@ird.fr

Introduction

Increased international funding of malaria control has resulted in a global decrease of the number of cases and deaths since 2000 [1]. In particular, the scaling up of Long-Lasting Insecticide-treated mosquito Nets (LLIN) and Indoor Residual Spraying (IRS) programmes has contributed to the idea that malaria eradication may be feasible [2]. Unfortunately, recent increases in malaria cases were recorded in some African countries indicating the tenuousness of malaria control in this part of the world [1,3].

Moreover, seasonal climatic change is known to be an important determinant of malaria incidence [4] since climate conditions both mosquito vector dynamics and parasite development rates [5]. Malaria incidence is usually low during the dry-hot season when vector populations are reduced and spatially confined. In consequence, most studies focus on the peak transmission season (i.e., the rainy season) and the epidemiological picture during the dry-hot season is often neglected. However, if

malaria is to be eradicated, it will be essential to sustain vector control efforts through the dry-hot season when vector density is low. Moreover, the dry-hot season is important because the vector profile may change and influence the pattern of transmission. In Benin, comparison of entomological data from two studies [6,7] carried out in the mesoendemic Ouidah-Kpomass  -Tori Bossito (OKT) region suggests that *An. funestus* partially replaces the main malaria vector *An. gambiae* s.s. during the dry-hot season. The switch from *An. gambiae* s.s. to other anopheline species such as *An. funestus*, *An. moucheti* and *An. melas* has been previously documented in Africa [8,9] and this is particularly worrying because our understanding of the behaviour, ecology and insecticide resistance of these species is limited [3,10].

Furthermore, some studies have shown that mosquito nets are less likely to be used during the dry-hot season [6,11,12] because of the discomfort of having to sleep under a net on a hot night [12,13] and when the mosquito biting nuisance is low [12,14,15]. In Southern Benin, a longitudinal survey conducted in 7 villages of

the OKT district reported an average decrease of 31% in net use during the dry season even though most families (over 80%) had nets available throughout the study [6]. Major disparities were observed in both the density and diversity of culicidae [7] and this could have influenced LLIN use and the risk of malaria attacks in people from different villages.

In this context, we investigated the factors that determine the likelihood of malaria attacks in children of under 5 years of age in the OKT district during the dry season. A poisson mixed-effect model was used to assess relationships between malaria incidence and transmission by different vector species, LLIN use and net ownership. A binomial mixed-effect model was then developed to assess whether night-time temperature (derived from MODIS remote sensing data), biting nuisance and LLIN ownership predict LLIN use >60%. Better understanding of the factors that determine malaria incidence and net use during the dry-hot season would help National Malaria Control Programs (NMCPs) to implement more effective and sustainable malaria control strategies in Africa.

Methods

Ethics Statement

The IRD (Institut de Recherche pour le Développement) Ethics Committee and the National Research Ethics Committee of Benin approved the study (CNPERS, reference number IRB00006860). All necessary permits were obtained for the described field studies. No mosquito collection was done without the approval of the village chief, the owner and occupants of the collection house. Mosquito collectors gave their written informed consent and were treated free of charge for malaria presumed illness throughout the study. They were also vaccinated against yellow fever. Before the study, the head of the family (or the guardian) of the selected child

gave their written informed consent. During the monitoring periods, all children of villages, whether participating or not in the study, were treated free of charge by the medical staff.

Study area

This study was carried out in the OKT health administrative region in southern Benin (on the Atlantic coast) following the nationwide distribution of LLINs to children of under 5 years of age by the NMCP [6,7]. The local climate is coastal-guinean with four seasons including a long dry season (between November and March) which is the hottest of the year (with average monthly temperatures close to 28°C). Average annual rainfall was 1,100 mm in 2007–2008 with less than 10% falling during the long dry season. Of the 58 villages screened at the baseline, 28 were enrolled. 30 were excluded because they did not fulfil inclusion criteria i.e. distance between two villages of more than 2 km, population size between 250 and 500 inhabitants with non-isolated habitations and absence of any local health care centre. Investigations were conducted in 28 villages selected on the basis of a population size between 250 and 500 inhabitants, a distance between two villages of more than 2 km and the absence of any local health care center [6,7].

Entomological data

Mosquitoes were collected by human landing catches for three surveys conducted every six weeks between November 2007 and March 2008. Mosquitoes were collected from 10 p.m. to 6 a.m. both indoors and outdoors at four sites in each village on two successive nights for each survey (i.e., 16 person-nights per village per survey). Malaria vectors belonging to the *Anopheles gambiae* complex and the *Anopheles funestus* group were identified to species by PCR and processed for circumsporozoite protein (CSP) ELISA

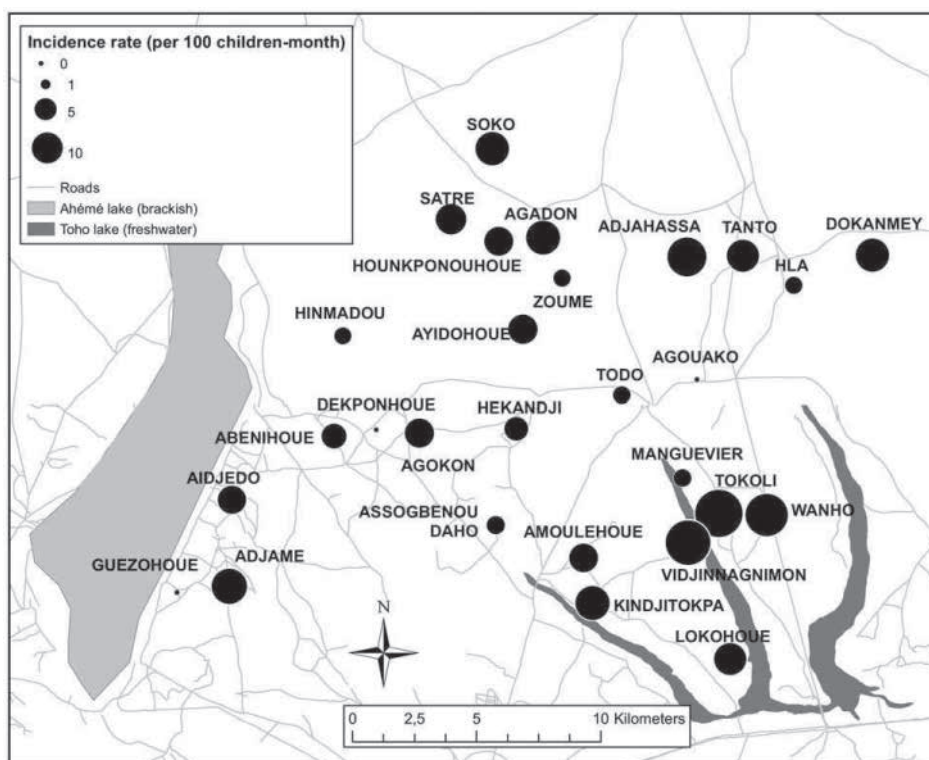


Figure 1. Map showing malaria incidence in children of under 5 years of age in 28 villages in Southern Benin during the dry season.
doi:10.1371/journal.pone.0030558.g001

detection of *Plasmodium falciparum* sporozoites [7]. Human Biting Rates (HBR) and Entomological Inoculation Rates (EIR) were calculated for each vector species and HBR was also calculated for all culicidae to estimate the overall mosquito-biting nuisance in this area.

Clinical malaria, LLIN use and LLIN ownership data

In each of the 28 villages, a cohort of 60 children of between zero and five years of age was randomly selected (on the basis of a comprehensive census carried out in 2007 to identify the number of houses, beds and sleeping mats). Active Case Detection (ACD) for malaria attacks was carried out over three six-day periods six weeks apart, 14 days after mosquito collection.

A malaria attack was defined by a high axillary temperature ($\geq 37.5^{\circ}\text{C}$), fever in the 48 hours preceding the first day of ACD, or any sign suggestive of malaria associated with a parasitaemia of over 1,999 asexual forms of *P. falciparum* per microlitre of blood [6].

The incidence of clinical malaria was calculated by dividing the number of pathological episodes attributed to malaria by the number of child-days surveyed. The ownership and use of LLINs

(Permanet[®] 2.0) which had been distributed in October 2007 by the NMCP, were evaluated among the children of the cohort at the same time as ACD. Unannounced visits were done by a nurse around 9 p.m. (when children were expected to be asleep) to control whether the LLIN is present (ownership) and whether children are sleeping under it (use). Rates of LLIN ownership and use were both calculated with respect to the total number of observations. Details on the methods used for sampling, data collection and clinical measurements have been published [6].

Temperature data

We used the Land-Surface Temperature (LST) at a spatial resolution of one kilometer measured by the Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) sensors on the Terra satellite (<https://lpdaac.usgs.gov/>). The average 8-day nocturnal temperature at the coordinates of each village (georeferenced using the Global Positioning System) was extracted using ArcGis ArcInfo 9.3 software (ESRI, Redlands, CA). The data were then converted into Celsius. Nocturnal LST data are known to provide

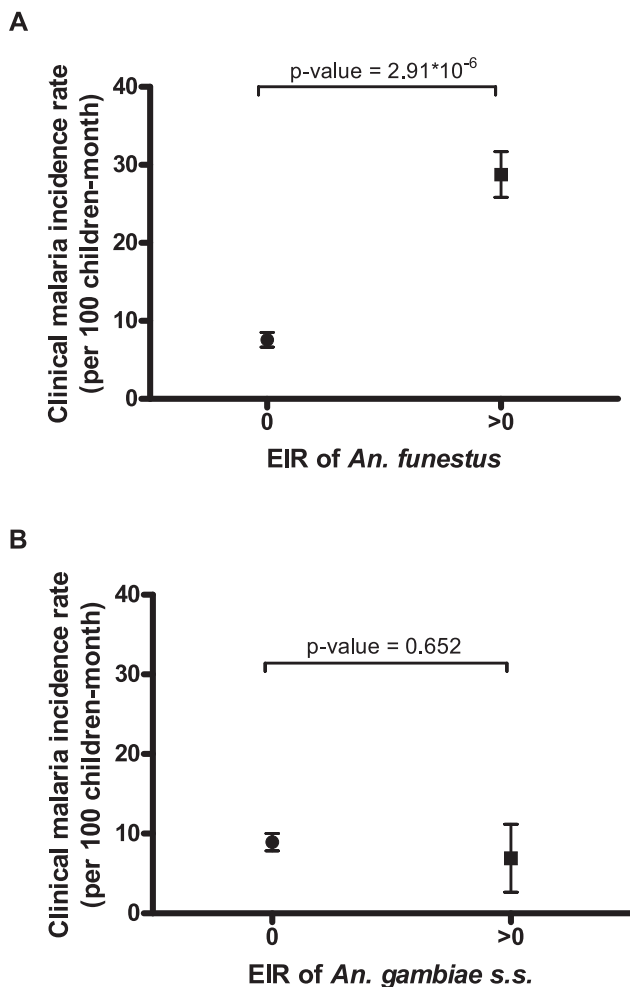


Figure 2. Mean village-survey malaria incidence in children of under 5 years of age for zero and positive EIRs of (a) *An. funestus* and (b) *An. gambiae s.s.* Error bars represent standard error. EIR: Entomological Inoculation Rate. P-value given according to Poisson Mixed-Effect models taking into account repeated measurements. doi:10.1371/journal.pone.0030558.g002

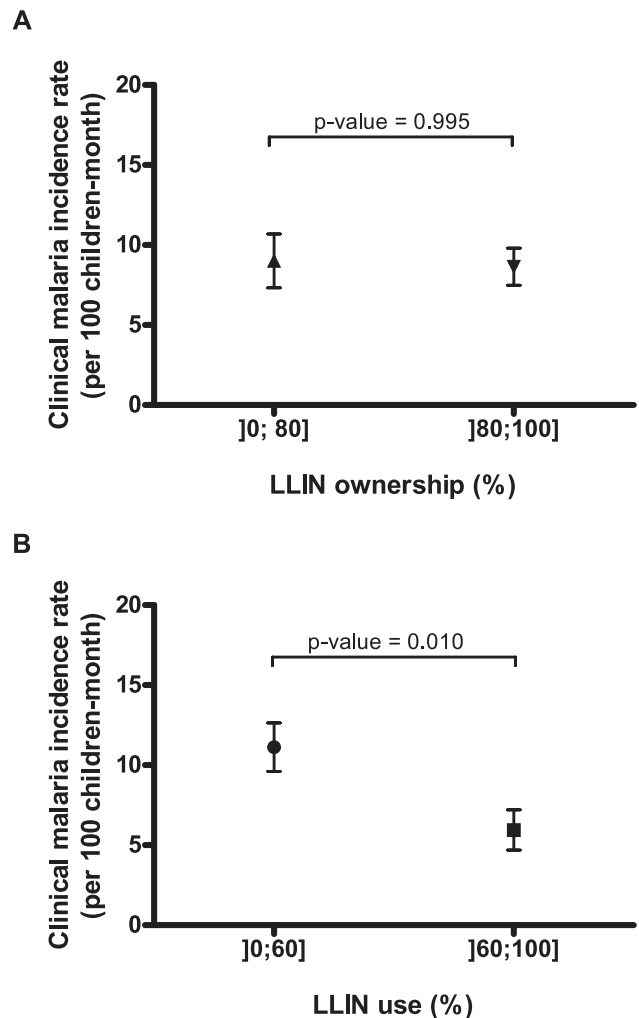


Figure 3. Mean village-survey malaria incidence in children of under 5 years of age for (a) >80% LLIN ownership and (b) >60% LLIN use. Error bars represent standard error. LLIN: Long Lasting Insecticidal Net. P-value given according to Poisson Mixed-Effect models taking into account repeated measurements. doi:10.1371/journal.pone.0030558.g003

good estimates of minimum temperatures in Africa in all ecosystems [16].

Incidence of clinical malaria

The dependent variable was mean clinical malaria incidence and the explanatory variables were the EIR of each vector species (categorized in two classes: null and positive), LLIN use and LLIN ownership (both categorized in two classes using respective thresholds of 60% and 80%). The threshold of 80% for LLIN ownership was adopted because it is considered by the World Health Organization (WHO) as the minimum objective for effective community protection against malaria [1]. For LLIN use, the threshold of 60% was selected because this level was approved in the Abuja declaration as a feasible objective to prevent malaria infection and suffering [17]. Relationships between the dependent variable and each explanatory variable were assessed using an univariate Poisson Mixed Effect (PME) model with a random intercept (taking into account possible correlations associated with repeated measurements in each village). We then investigated the combined effects of the explanatory variables on the occurrence of malaria attacks using a multivariate PME.

LLIN use

Relationships between the dependant variable, LLIN use rate (categorized in two classes), and biting nuisance, nocturnal temperature (both categorized in four quartiles), and LLIN ownership were assessed by univariate analysis using a Binomial Mixed Effect (BME) model with a random intercept. A multivariate BME model was then developed to assess the combined effects of the three covariates on the probability of a rate of LLIN use of over 60%.

Statistical analyses were conducted using R-software [18] with additional functions from the 'lme4' [19] package.

Results

Incidence of clinical malaria and transmission

During the three surveys, 27,265 children-day were followed up and a total of 79 malaria attacks were recorded. This represents an

average of 8.8 (95% CI 6.7–10.9) malaria cases per 100 child-months. Figure 1 shows the distribution of clinical malaria in the 28 villages. Great disparities were observed between different villages with no cases at all detected in Agouako, Guezohoue or Dekponhoue compared with 23 cases per 100 children-month in Tokoli alone. 13,822 culicidae mosquitoes were caught during 1,344 human-nights corresponding to an average HBR of 1,028 (95% CI 736–1320) bites per human per 100 nights. Two malaria vector species were found coexisting, namely *Anopheles gambiae s.s.* (n = 94) and *Anopheles funestus* (n = 381). The average HBR was 7.0 (95% CI 3.4–10.6) per human per 100 nights for *An. gambiae s.s.*, and 28.4 (95% CI 10.6–42.6) for *An. funestus*. Only ten *An. funestus* individuals and five *An. gambiae s.s.* were found to be positive for CSP, corresponding to an average EIR of 1.12 (95% CI 0.29–1.95) infected bites per human per 100 nights. Mean percentages of LLIN ownership and use were 77.7% (95% CI 75.2–80.2) and 51.9% (95% CI 46.9–55.9) respectively. The average nocturnal temperature was 20.6°C (95% CI 20.2–21).

Factors influencing the incidence of clinical malaria during the dry season

Malaria incidence (MI) correlated closely ($p < 0.0001$, according to PME) with positive EIR of *An. funestus* but not *An. gambiae s.s.* (Figure 2a, 2b). Moreover, univariate analysis showed that MI was not significantly reduced for >80% LLIN ownership ($p = 0.995$; figure 3a) whereas it was significantly lower for >60% LLIN use ($p = 0.010$; Figure 3b).

Multivariate PME analysis first confirmed that the component of transmission due to *An. funestus* significantly correlated with malaria incidence (Table 1) and that a rate of LLIN use of over 60% provided significant protection against malaria attacks in children of under 5 years of age.

Factors influencing LLIN use

At high levels of nuisance (quartile 4; HBR >1,456 bites per human per 100 nights), the probability of LLIN use >60% was significantly higher (BME p-values < 0.05) than in the two lower quartiles (Figure 4a). On the other hand, no correlation (BME p-value = 0.281) was found between the probability of LLIN use >60% and the HBR for all vectors (i.e. the part of the nuisance due to malaria vectors).

Table 1. Poisson Mixed-Effects model to study malaria incidence in children of under 5 years of age (N = 84; number of groups = 28), according to vector transmission and LLIN use rate.

Effects	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Incidence Rates Ratio	95% Confidence interval	P-value	Incidence Rates Ratio	95% Confidence interval	P-value
EIR of <i>An. funestus</i> ‡ §						
0 (79)	1			1		
>0 (5)	3.83	2.18	6.71	2.91e-6	1.91	6.00
EIR of <i>An. gambiae</i> ‡ §						
0 (80)	1			1		
>0 (4)	0.77	0.24	2.43	0.652	1.067	0.33
LLIN use § §						
≤60% (47)	1			1		
>60% (37)	0.53	0.33	0.86	0.010	0.37	0.99

‡EIR: Entomological Inoculation Rate.

§LLIN: Long Lasting Insecticidal Net.

§the size of each category is indicated in parentheses.

doi:10.1371/journal.pone.0030558.t001

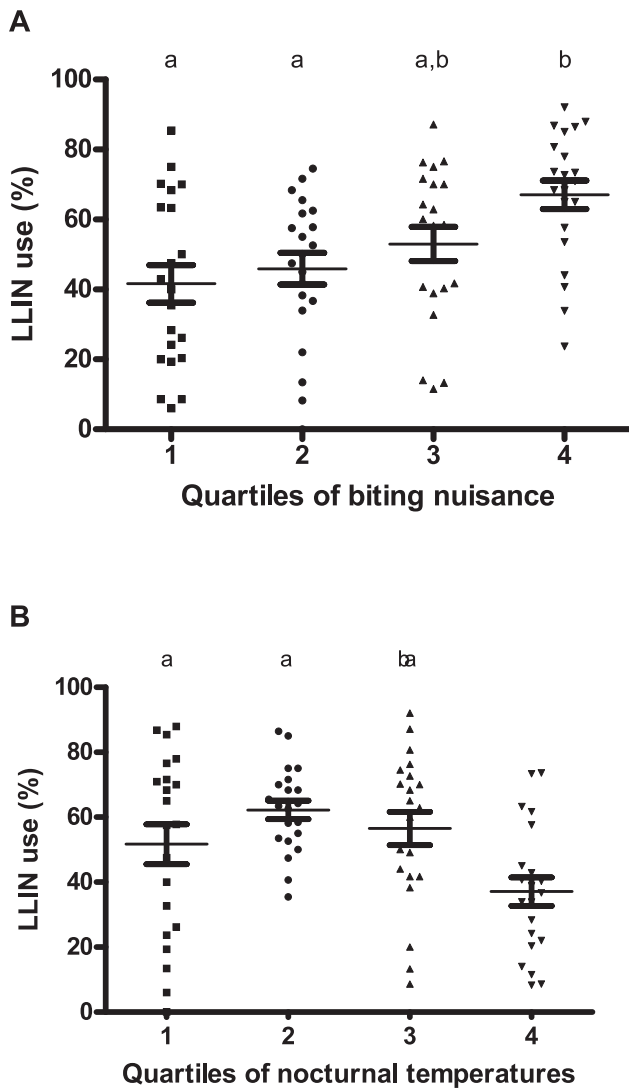


Figure 4. Mean village-survey LLIN use rates in children of under 5 years of age according to the quartiles of (a) biting nuisance and (b) nocturnal temperature. Quartiles of biting nuisance are 1: [6;56], 2: [56;447], 3: [447;1456], 4: [1456;6419] in bites of mosquitoes per human per 100 nights. Quartiles of temperature are 1: [14.1;19.5], 2: [19.5;20.5], 3: [20.5;22], 4: [22;23.7] in Celsius degrees. Error bars represent standard error. Quartiles carrying the same letter are not significantly different (p-value<0.05) analysing the probability of LLIN use >60% (binomial mixed-effect model taking into account repeated measurements). LLIN: Long Lasting Insecticidal Net. doi:10.1371/journal.pone.0030558.g004

Probability of LLIN use >60% was negatively associated with nocturnal temperature (BME p-values<0.05) showing that, as the temperature increases, LLIN use decreases. The figure 4b shows that LLIN use decreased to 37.1% [95% CI 27.9–46.3] for temperatures above 22°C (the fourth quartile).

A multivariate BME model was then developed to assess the combined effects of the explanatory variables on the probability of a LLIN use rate of over 60%. For the sake of consistency, only the surveys for which LLIN ownership was >60% (n = 79 over 84) were input (a non-null probability of LLIN use >60% was then always possible). The BME showed that the higher the level of biting nuisance (>1,456 bites per human per 100 nights, p=0.056), the higher the probability of LLIN use >60%

(Table 2). On the other hand, for the highest nocturnal temperatures (>22°C), this probability decreased significantly (p=0.045). No relationship emerged between high LLIN ownership and the probability of LLIN use >60% (p=0.236) confirming univariate analysis (Figure 5, p=0.219).

Discussion

Malaria in Southern Benin during the dry season

The first part of this work aimed at investigating determinants of malaria disease in children of under 5 years of age during the dry season, after the nationwide distribution of LLINs in Benin. Malaria incidence varied between different villages in the OKT district from 0 to 23 malaria cases per 100 child-months: marked differences were even observed between neighbouring villages under three kilometres apart. This finding corroborates those of Djènontin et al. [7] who described marked spatial heterogeneity in the distribution and density of malaria vectors in this area.

These results show that the EIR of *An. funestus* correlate with the number of malaria attacks. This confirms previous works in Africa suggesting that *An. funestus* may play an important role in malaria transmission during the dry-hot season [20,21,22,23]. In the OKT district, the highest malaria incidences were found in villages close to the types of permanent freshwater deposit (lakes and marshes in southeast and east) with vegetation, that provide ideal breeding sites for this species. In contrast, the component of transmission due to *An. gambiae s.s.* did not correlate with malaria incidence whatever the analysis method used (univariate or multivariate). It is important to note that the HBR for this species was low and its persistence through the dry season was dependent on occasional rain showers and the existence of permanent, domestic breeding sites [6,24]. Because of the low number of *An. gambiae* caught, the precision of the values of EIR were low and therefore, the absence of correlation does not allow to rule out the role of *An. gambiae s.s.* in malaria incidence during the dry season.

LLIN ownership and use

According to the WHO, a LLIN ownership rate of at least 80% is the minimum for good community protection against malaria [1]. In this study, we were not able to show any influence of high LLIN ownership on malaria incidence even when other thresholds were applied (N. Moiroux, unpublished data). This could be explained by the fact that LLIN ownership was not a good predictor of LLIN use. Conversely, our model showed that substantial LLIN use (>60%) had a significant impact on malaria incidence in the targeted population hence confirming previous observations [25]. Therefore, these results indicate that LLIN use should be preferred to ownership as indicator of malaria risk. Despite the hundreds of millions nets distributed in Africa since 2000, the estimated proportion of children of under 5 years of age sleeping under an effective net in sub-Saharan Africa is still low (35%) [1]. It will be a priority to improve this rate if the Millennium Development Goals for malaria control are to be achieved by 2015 [26]. Consciousness-raising campaigns should be maintained during the dry-hot season to promote LLIN use which remains the main means of community-based prevention in Africa.

This study also showed that mosquito-biting nuisance positively correlated with widespread LLIN use (>60%). This in agreement with Thomson et al. [27] who showed a strong association between net use and mosquito nuisance in Gambia where, as well as in other African countries [28,29], anopheline species accounted for a large part of overall mosquito-biting nuisance and net use increased with the risk of being bitten by a malaria

Table 2. Binomial mixed-effect model to study the probability of achieving a LLIN use rate of over 60% in children of under 5 years of age, according to biting nuisance, nocturnal temperature and LLIN ownership (N = 79; number of groups = 27).

Effects	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Odds-ratio	95% Confidence interval	P-value	Odds-ratio	95% Confidence interval	P-value
Biting nuisance (bites of mosquitoes per human per 100 nights) ‡ §						
0–56 (21)	1			1		
57–447 (18)	1.0	0.26–3.80	1.000	0.78	0.18–3.46	0.747
448–1,456 (19)	1.8	0.50–6.46	0.368	1.76	0.43–7.19	0.428
1,457–6,419 (21)	5.0	1.35–18.55	0.016	4.08	0.97–17.23	0.056
Nocturnal temperature (°C) §						
14.5–19.5 (18)	1			1		
19.6–20.5 (19)	1.37	0.37–5.12	0.638	2.26	0.51–10.09	0.286
20.6–22 (22)	0.8	0.23–2.79	0.737	0.65	0.15–2.78	0.558
22.1–23.7 (20)	0.2	0.05–0.84	0.028	0.20	0.04–0.97	0.045
LLIN Ownership § §						
>60% and ≤80% (39)	1			1		
>80% (40)	1.75	0.72–4.27	0.219	2.06	0.62–6.85	0.236

‡Biting nuisance is the human biting rate of all culicidae.
 §LLIN: Long Lasting Insecticidal Net.
 §the size of each category is indicated in parentheses.
 doi:10.1371/journal.pone.0030558.t002

vector. In Southern Benin, malaria vectors are not the main mosquito nuisance and this explains why HBR for vectors does not correlate with LLIN use.

Furthermore, the highest nocturnal temperatures were found to be associated with low rates of LLIN use. This finding confirms results from interviews with populations in Burkina-Faso and Ghana [12,13] who said they had trouble sleeping under a net on hot nights.

This study gives the first indications of the associations between the intensity of nuisance, nocturnal temperature and LLIN use,

and confirms certain assumptions about seasonal variations in net use in Africa [6,11,12,13,14,15].

Implications for vector control and malaria modelling

In the OKT district (Southern Benin), *An. funestus* becomes the primary vector of malaria during the dry-hot season replacing *An. gambiae s.s.* Unfortunately, little is known about this species’ biting behaviour, ecology and insecticide resistance status [10]. Some recent surveys in West Africa suggested that *An. funestus* may be resistant to pyrethroids, DDT and carbamates in Ghana [30,31] but fully susceptible to pyrethroids in Burkina-Faso [32] and Benin (Corbel, unpub. data). Clearly more work is needed to characterize insecticide resistance mechanisms in *An. funestus* in West African countries.

According to the literature, when it is present, *An. funestus* can account for a significant component of malaria transmission [20,21,23,33] and incidence in Africa. For efficient malaria control, it is therefore important to identify areas where this vector is present and abundant. Questions on its nocturnal biting habits should also be addressed, e.g. a study in Ghana [34] reported that its aggressiveness peaks in the last hours of mosquito collection (between 4 and 6 a.m.) which is consistent with our data (N. Moiroux, unpub. data). It is therefore likely that *An. funestus* continues to bite at dawn when people are no longer sleeping under mosquito nets. This could be an issue since current vector control strategies, relying on the use of residual insecticides (LLIN, IRS) target nocturnal, endophilic malaria vectors [12]. More knowledge on biting preferences, abundance, spatial distribution and resistance is needed so that *An. funestus* can be included in future models of malaria transmission. These models will have to integrate LLIN use but perhaps this could be replaced with proxy markers such as minimum temperature (which is easily ascertained) and nuisance. However, temperature should be used with care in transmission or disease models because of this parameter has disparate, poorly understood—and sometimes antagonistic—effects on LLIN use, vectors densities and transmission [35,36,37].

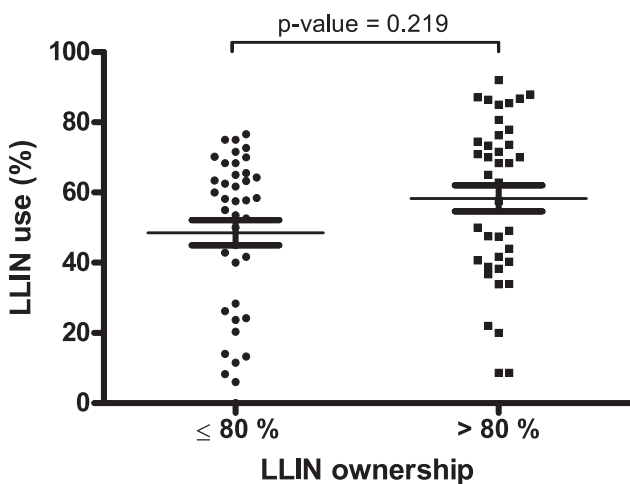


Figure 5. Mean village-survey LLIN use rates in children of under 5 years of age for ≤ and >80% LLIN ownership. LLIN: Long Lasting Insecticidal Net. P-value given according to binomial mixed-effect models analysing the probability of LLIN use >60% and taking into account repeated measurements.
 doi:10.1371/journal.pone.0030558.g005

As recommended by the Malaria Eradication (MalERA) Consultative Group on Modelling, there is a need to understand better the effects of seasonality on malaria morbidity [38]. This study highlights the need to take into account the specificity of malaria epidemiology during the dry-hot season and get a better understanding of the factors that influence malaria incidence and net use. This will be important when it comes to developing more effective malaria modelling and mapping programmes. These findings should help National Malaria Control Programmes to implement more effective and sustainable malaria control strategies in Africa.

References

- World Health Organization (2010) World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization.
- Roberts L, Enserink M (2007) Malaria. Did they really say ... eradication? *Science* 318: 1544–1545.
- The malERA Consultative Group on Vector Control (2011) A Research Agenda for Malaria Eradication: Vector Control. *PLoS Med* 8: e1000401.
- Hay SI, Snow RW, Rogers DJ (1998) From predicting mosquito habitat to malaria seasons using remotely sensed data: practice, problems and perspectives. *Parasitol Today* 14: 306–313.
- Najera JA, Kouznetsov RL, Delacollette C (1998) Malaria Epidemics: Detection And Control, Forecasting And Prevention. Geneva: World Health Organization, WHO/MAL/98.1084 WHO/MAL/98.1084. pp 1–81.
- Damien G, Djenontin A, Rogier C, Corbel V, Bangana S, et al. (2011) Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malaria J* 9: 380.
- Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, et al. (2010) Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* 3: 83.
- Awolola TS, Okwa, Hunt RH, Ogunrinde AF, Coetzee M (2002) Dynamics of the malaria-vector populations in coastal Lagos, south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 75–82.
- Adja AM, N'Goran EK, Koudou BG, Dia I, Kengne P, et al. (2011) Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* 105: 13–24.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, et al. (2011) Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27: 91–98.
- Korenromp EL, Miller J, Cibulskis RE, Kabir Cham M, Alnwick D, et al. (2003) Monitoring mosquito net coverage for malaria control in Africa: possession vs. use by children under 5 years. *Trop Med Int Health* 8: 693–703.
- Frey C, Traore C, De Allegri M, Kouyate B, Muller O (2006) Compliance of young children with ITN protection in rural Burkina Faso. *Malaria J* 5: 70.
- Binka FN, Adongo P (1997) Acceptability and use of insecticide impregnated bednets in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 2: 499–507.
- Ahorlu CK, Dunyo SK, Afari EA, Koram KA, Nkrumah FK (1997) Malaria-related beliefs and behaviour in southern Ghana: implications for treatment, prevention and control. *Trop Med Int Health* 2: 488–499.
- Toe LP, Skovmand O, Dabire KR, Diabate A, Diallo Y, et al. (2009) Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. *Malar J* 8: 175.
- Vancutsem C, Ceccato P, Dinku T, Connor SJ (2010) Evaluation of MODIS land surface temperature data to estimate air temperature in different ecosystems over Africa. *Remote Sensing of Environment* 114: 449–465.
- WHO, RBM (2000) The Abuja Declaration and the Plan of Action; 2000; Abuja. World Health Organization/Roll Back Malaria; WHO/CDS/RBM/2003.46.
- R Development Core Team (2010) R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2.12 ed. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Bates D, Maechler M (2009) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and Eigen. R package version 0.999375-32 ed.
- Fontenille D, Lochouart L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, et al. (1997) High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 56: 247–253.
- Fontenille D, Lochouart L, Diatta M, Sokhna C, Dia I, et al. (1997) Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 647–652.
- Gillies M, De Meillon B (1968) The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Publication of the South Afr Inst Med Res. pp 343.
- Kelly-Hope LA, McKenzie FE (2009) The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J* 8: 19.
- Bangana ASB, Chandre F, Corbel V, Djenontin A, Chabi J, et al. (2009) Characterization of mosquito fauna in Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito Sanitary Zone in Benin (West Africa) [MIM16671490]. 5th MIM Pan-African Malaria Conference. Nairobi, Kenya.
- Lengeler C (2004) Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. pp CD000363.
- United Nations (2010) The Millennium Development Goals Report 2010. New York, USA: United Nations.
- Thomson MC, D'Alessandro U, Bennett S, Connor SJ, Langerock P, et al. (1994) Malaria prevalence is inversely related to vector density in The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 638–643.
- Doannio J, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibe M, Chauvancy G, et al. (2006) Comparaison de la composition spécifique et de la dynamique des populations de moustiques dans deux villages du centre de la Côte-d'Ivoire, avec et sans périmètre de riziculture irriguée. *Bull Soc Pathol Exot* 99: 204–206.
- Kweka E, Nkya W, Mahande A, Assenga C, Moshia F, et al. (2008) Mosquito abundance, bed net coverage and other factors associated with variations in sporozoite infectivity rates in four villages of rural Tanzania. *Malaria J* 7: 59.
- Coetzee M, van Wyk P, Booman M, Koekemoer LL, Hunt RH (2006) Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes in a gold mining town in Ghana and implications for malaria control. *Bull Soc Pathol Exot* 99: 400–403.
- Okoye PN, Brooke BD, Koekemoer LL, Hunt RH, Coetzee M (2008) Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 591–598.
- Dabire KR, Baldet T, Diabate A, Dia I, Costantini C, et al. (2007) *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *J Med Entomol* 44: 990–997.
- Cohuet A, Simard F, Wondji CS, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, et al. (2004) High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of savannah-forest transition area in Cameroon. *J Med Entomol* 41: 901–905.
- Appawu M, Owusu-Agyei S, Dadzie S, Asoala V, Anto F, et al. (2004) Malaria transmission dynamics at a site in northern Ghana proposed for testing malaria vaccines. *Trop Med Int Health* 9: 164–170.
- Kelly-Hope LA, Hemingway J, McKenzie FE (2009) Environmental factors associated with the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in Kenya. *Malar J* 8: 268.
- Patz JA, Strzepek K, Lele S, Hedden M, Greene S, et al. (1998) Predicting key malaria transmission factors, biting and entomological inoculation rates, using modelled soil moisture in Kenya. *Trop Med Int Health* 3: 818–827.
- Depinay JM, Mbogo CM, Killeen G, Knols B, Beier J, et al. (2004) A simulation model of African *Anopheles* ecology and population dynamics for the analysis of malaria transmission. *Malar J* 3: 29.
- The malERA Consultative Group on Modeling (2011) A Research Agenda for Malaria Eradication: Modeling. *PLoS Med* 8: e1000403.

Acknowledgments

We thank populations of the OKT district for their kind support and collaboration. We also thank all the field and laboratory staff for their strong commitment to this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VC M-CH NM. Performed the experiments: AD GD NM. Analyzed the data: NM OB GC HG. Wrote the paper: NM HG VC.

Use of a Mixture Statistical Model in Studying Malaria Vectors Density

Olayidé Boussari^{1,2,3,4,5*}, Nicolas Moiroux^{6,7,8}, Jean Iwaz^{2,3,4,5}, Armel Djènontin^{9,10}, Sahabi Bio-Bangana¹⁰, Vincent Corbel^{7,8,9}, Noël Fonton¹, René Ecochard^{2,3,4,5}

1 International Chair in Mathematical Physics and Applications, Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Bénin, **2** Service de Biostatistique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, **3** Université de Lyon, Lyon, France, **4** Université Lyon 1, Villeurbanne, France, **5** Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Centre National de la Recherche Scientifique – Unité Mixte de Recherche 5558, Villeurbanne, France, **6** Maladies Infectieuses et Vecteurs Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France, **7** Université Montpellier 1, Montpellier, France, **8** Université Montpellier 2, Montpellier, France, **9** Maladies Infectieuses et Vecteurs Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle, Institut de Recherche pour le Développement, Cotonou, Bénin, **10** Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou, Ministère de la Santé, Cotonou, Bénin

Abstract

Vector control is a major step in the process of malaria control and elimination. This requires vector counts and appropriate statistical analyses of these counts. However, vector counts are often overdispersed. A non-parametric mixture of Poisson model (NPMP) is proposed to allow for overdispersion and better describe vector distribution. Mosquito collections using the Human Landing Catches as well as collection of environmental and climatic data were carried out from January to December 2009 in 28 villages in Southern Benin. A NPMP regression model with “village” as random effect is used to test statistical correlations between malaria vectors density and environmental and climatic factors. Furthermore, the villages were ranked using the latent classes derived from the NPMP model. Based on this classification of the villages, the impacts of four vector control strategies implemented in the villages were compared. Vector counts were highly variable and overdispersed with important proportion of zeros (75%). The NPMP model had a good aptitude to predict the observed values and showed that: i) proximity to freshwater body, market gardening, and high levels of rain were associated with high vector density; ii) water conveyance, cattle breeding, vegetation index were associated with low vector density. The 28 villages could then be ranked according to the mean vector number as estimated by the random part of the model after adjustment on all covariates. The NPMP model made it possible to describe the distribution of the vector across the study area. The villages were ranked according to the mean vector density after taking into account the most important covariates. This study demonstrates the necessity and possibility of adapting methods of vector counting and sampling to each setting.

Citation: Boussari O, Moiroux N, Iwaz J, Djènontin A, Bio-Bangana S, et al. (2012) Use of a Mixture Statistical Model in Studying Malaria Vectors Density. PLoS ONE 7(11): e50452. doi:10.1371/journal.pone.0050452

Editor: Luciano A. Moreira, Centro de Pesquisas René Rachou, Brazil

Received: August 7, 2012; **Accepted:** October 22, 2012; **Published:** November 21, 2012

Copyright: © 2012 Boussari et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The Ministère Français des Affaires Étrangères (MAEE) supported the project FSP/REFS N°2006-22 that generated the data analyzed in this paper. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: olayide.boussari@chu-lyon.fr

Introduction

Malaria is still a major public health issue in Sub-Saharan Africa. In 2010, this region bore 91% of the global disease death burden estimated to 655,000 deaths [1]. Studying the risk of vector transmission is at the basis of every survey about the importance of malaria in a given zone. The overarching goal of vector control is to decrease the transmission of the malaria parasite *Plasmodium spp* to humans by mosquito vectors of the genus *Anopheles*. Among the recommendation of the World Health Organization (WHO) to fight malaria, the deployment of long-lasting insecticidal mosquito nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS) at national scale has shown important reductions of malaria burden although evidences of malaria resurgence have been recorded in several African countries [1,2].

The most common indicator to evaluate vector control interventions such as LLIN and IRS relies on malaria transmission through estimation of the Entomological Inoculation Rate (EIR). EIR is the product of the Human Biting Rate (HBR; number of

bites of malaria vectors per human per unit time) and the prevalence of *Plasmodium* infection in mosquitoes. HBR is usually measured using the Human Landing Catches (HLC) counting technique that is the method of reference to quantify the human-vector contact [3].

In 28 villages of Southern Benin, a recent cluster randomized controlled trial (RCT) aiming at comparing the efficacy of combined LLIN and carbamate IRS or carbamate-treated plastic sheeting (CTPS) with a background of LLIN coverage did not show benefits of the combination for reducing HBR and EIR [4]. In the study area, high variations in the density of malaria vectors were observed in time and space [5] and there were many localities with zero mosquitoes collected during several nights.

The most ancient and popular statistical distribution used to describe count data is the Poisson distribution that assumes equidispersion of the counts. However, in real datasets, these counts are often overdispersed [6–8] and there are various means to demonstrate it [9–11]. Among the causes of overdispersion is

the excess of zeros. Within the context of malaria vectors counts, the excess of zeros may result from the absence of mosquitoes at some locations (houses, village...) or during some period of time (dry season, cold temperatures...).

To deal with such overdispersed data with excess zeros, Johnson and Kotz [12] introduced the zero-inflated Poisson model (ZIP); i.e., a Poisson mixture model that combines a point mass at zero with a Poisson count distribution. Later, Lambert [13] extended this model to allow for covariates. Another way to deal with count overdispersion is the use of the negative binomial (NB) model or, better, the zero-inflated negative binomial (ZINB) model constructed on the same principle as that of the ZIP.

Besides these well-known models, other finite mixture distribution models have been proposed (e.g., McLachlan and Peel [14]) and have been the object of numerous applications. In fact, these models extend the previous ones; instead of considering a mixture of two distributions as with the ZIP or the ZINB, they consider a mixture of three or more Poisson or NB distributions. In addition, a non-parametric approach of the maximum likelihood introduced by Aitkin [15] has shown to be an excellent tool to allow for overdispersion. An extension of this approach by the same author [16] allowed its application to repeated measurements. Thus, a non-parametric mixture of Poisson model (NPMP) seems adapted to take into account the frequent changes in vector counts in various sites of a study zone.

In the present work, we assessed the ability of Poisson, NB, ZIP, ZINB and NPMP to fit the distribution of counts of malaria vectors measured in 28 villages in southern Benin where a clinical trial was implemented to evaluate the efficacy of vector control interventions for malaria prevention [4]. Using a multivariate NPMP, we introduced a classification of the villages based on the mean vector density after adjustment for a set of environmental and climatic covariates. Then, we assessed the relationship between this classification and the vector interventions implemented in the villages. The results of this work will help design site-specific malaria vectors sampling.

Methods

Mosquito collection

The data analyzed in the present study stem from mosquito collections carried out every 6 weeks between January and December 2009 (i.e. 8 surveys) in 28 villages of the sanitary region of Ouidah-Kpomassè-Tori (OKT) in South Benin. Of the 58 villages screened at the baseline, 28 were enrolled. The other villages were excluded because they did not fulfill inclusion criteria i.e. distance between two villages >2 km, population size between 250 and 500 inhabitants with non-isolated habitations and absence of any local health care centre.

Entomological surveys were performed using the HLC technique, on two successive nights (22:00 to 06:00) at four sites (both indoor and outdoor) per village. Collectors were hourly rotated along collection sites and/or position (indoor/outdoor). Malaria vectors collected on humans were identified using morphological keys [17]. Only *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* mosquito counts were considered in the present work because these are the main malaria vectors in West Africa [18–20] and practically the only present in the study area [5].

These villages were divided into four groups (seven villages per group) where four different vector control measures were implemented (see Corbel et al. [4] for details): i) targeted-coverage LLIN (TLLINs) destined to protect pregnant women and children <6 years old (the reference group); ii) universal-coverage LLIN destined to protect sleeping units (ULLINs), iii) TLLINs plus full

IRS of carbamate every eight months (TLLIN+IRS), and ULLIN plus full CTPS taped to the upper part of the walls (ULLIN+CTPS).

Ethics statement

The IRD (Institut de Recherche pour le Développement) Ethics Committee and the National Research Ethics Committee of Benin approved the study (CNPERS, reference number IRB00006860). The study was also registered with Current Controlled Trials, number ISRCTN07404145. All necessary permits were obtained for the described field studies. No mosquito collection was done without the approval of the village chief, the owner and occupants of the collection house. Mosquito collectors gave their written informed consent and were treated free of charge for malaria presumed illness throughout the study.

Demographic, geographic and environmental data

The following data were collected: the average distance (in km) from each village to the nearest freshwater body (Toho lake), the presence of market gardening 2 km around each village, the presence of cattle farms inside the village, the presence of water conveyance in the village, and the population density. The layout (or structure) of each village was described by the distribution of its clusters of houses, these clusters being separated by vegetated strips. Two modalities were then considered: single-cluster vs. multi-cluster villages. Daily rainfall data from 8 weather stations were spatially interpolated to compute the cumulated rainfall (in mm) and the number of rainy days in each village during the 15 days preceding each survey. The Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) was derived from a “Satellite pour l’Observation de la Terre (SPOT-5)” satellite image acquired on 12/28/2003. The mean NDVI was computed in a buffer area of 50 m diameter around each mosquito collection site (house).

Checking overdispersion and excess of zero in the data

The mean-variance relationship regarding the number of collected malaria vectors was analyzed graphically to explore data dispersion. A linear relationship of slope 1 (variances equal to means) indicated a Poisson distribution without overdispersion whereas a linear relationship with slope >1 or a quadratic relationship indicated overdispersion. We also assess the “excess of zero” through a graphical representation of the distribution of vector counts.

Approximation of the distribution of the data

The approximations of the distribution of the number of collected malaria vectors by the Poisson, ZIP, NB, ZINB and NPMP distributions were compared using the maximum likelihood (ML) estimation. Poisson, ZIP, NB and ZINB models were fitted using the function *nlm* [21,22] in the ‘R’ software version 2.14.0. Parameters of the NPMP model were estimated with the function *alldist* [15,23] which used an EM algorithm [24]. In this approach, the dispersion of the data is described by a probability law that does not take into account the hierarchical structure of the data. This is thus a “marginal” model. A graphical representation of comparison results is used to show the counts as well as the predictions given by each of the above-cited distributions.

Multivariate Analysis

Given the hierarchical structure of the data collection system, another NPMP model was considered to allow for various components of the variance of the counts. In this model, the counts of malaria vectors were assessed according to environmen-

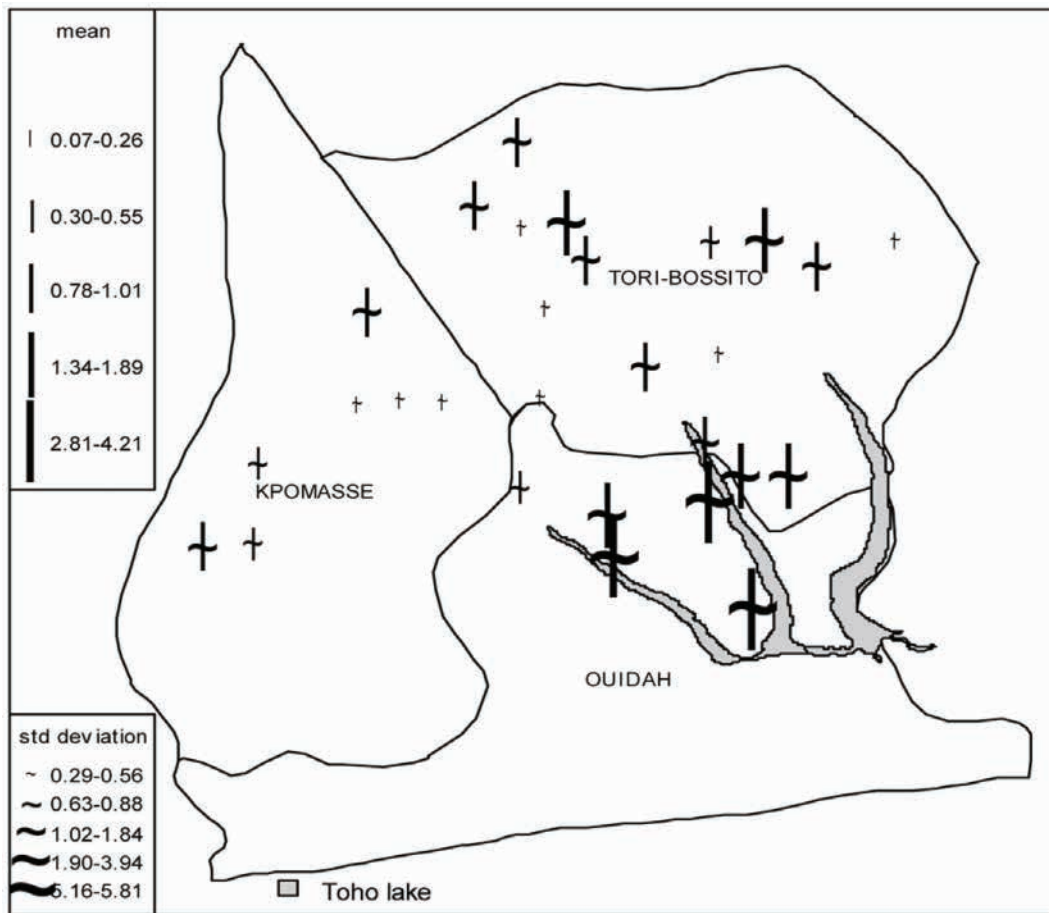


Figure 1. Means and standard deviations of the number of mosquitoes collected per site and per night at each of the 28 villages of the study.

doi:10.1371/journal.pone.0050452.g001

tal and climatic covariates with the “village” as a random effect. It is thus a “conditional” model (on “village”). The latter model allows for the following variables: average distance to Toho lake (in km), water conveyance (0 = absence, 1 = presence), market gardening (0 = absence, 1 = presence), cattle farms inside the village (0 = absence, 1 = presence), the layout of the village (0 = multi-cluster, 1 = single-cluster), population density (inhabitants per 100 m²), both the mean cumulated rainfall over the 8 surveys (in mm) and the deviation from this mean at each survey, both the mean cumulated number of rainy days over the 8 surveys and the deviation from this mean at each survey, both the averaged NDVI over the 4 collection houses per village and the deviation from this average for each house and, finally, the specific collection site (0 = inside of the house, 1 = outside of the house).

According to the current recommendation for the use of hierarchical models, each covariate was centered on its mean before introduction into the model [25]. Variable “survey” was introduced into the model as a fixed effect. Mosquito collections made inside or outside each house of each village were considered as repeated measurements within that village.

In the NPMP conditional model, the number of malaria vectors y_{ig} collected at a given site of a given village g during a given night i is supposed, conditionally to “the village”, to follow a mixture of four Poisson distribution. Each Poisson distribution has a mean μ_{ig} so that $\log(\mu_{ig}) = \eta_{ig} = x_{ig}\beta + \zeta_{ig}$. Note that x_{ig} is the vector of values taken by the covariates, β the corresponding

fixed effects, ζ_{ig} the random intercept specific to each village so that $\zeta_{ig} = ac$, with probabilities π_c [25]. The values taken by ac are called “latent variables”; c indicating each latent class, here fixed to four $c \in \{1, 2, 3, 4\}$. Hence, the density function of the model can be expressed as $f(y_{ig}) = \sum_{c=1}^4 \pi_c f_c(y_{ig})$ where f_c is the density

function of a Poisson distribution with mean μ_{ig} . Thus, a non-parametric mixture model may also be called “latent class model”. The four values $\exp(ac)$ (one value for each latent class) are the predicted mean numbers of malaria vectors collected whenever all the model covariates, centered on their means, are equal to zero.

Function *allvc* [16,23], a variant of *alldist* adapted for hierarchical data, was used for the latter model implementation in R software.

Assessing the impact of vector control strategies

For each village, a posteriori probability of belonging to each class after adjustment on all the covariates is estimated by the NPMP conditional model. Here, “a posteriori probability” means the conditional probability for a village to belong to a given class, given the data. For a village g and a latent class k , this probability

can be expressed: $p_{kg} = \frac{\pi_k P(y_g|k)}{\sum_{c=1}^4 \pi_c P(y_g|c)}$. In this expression, y_g is the

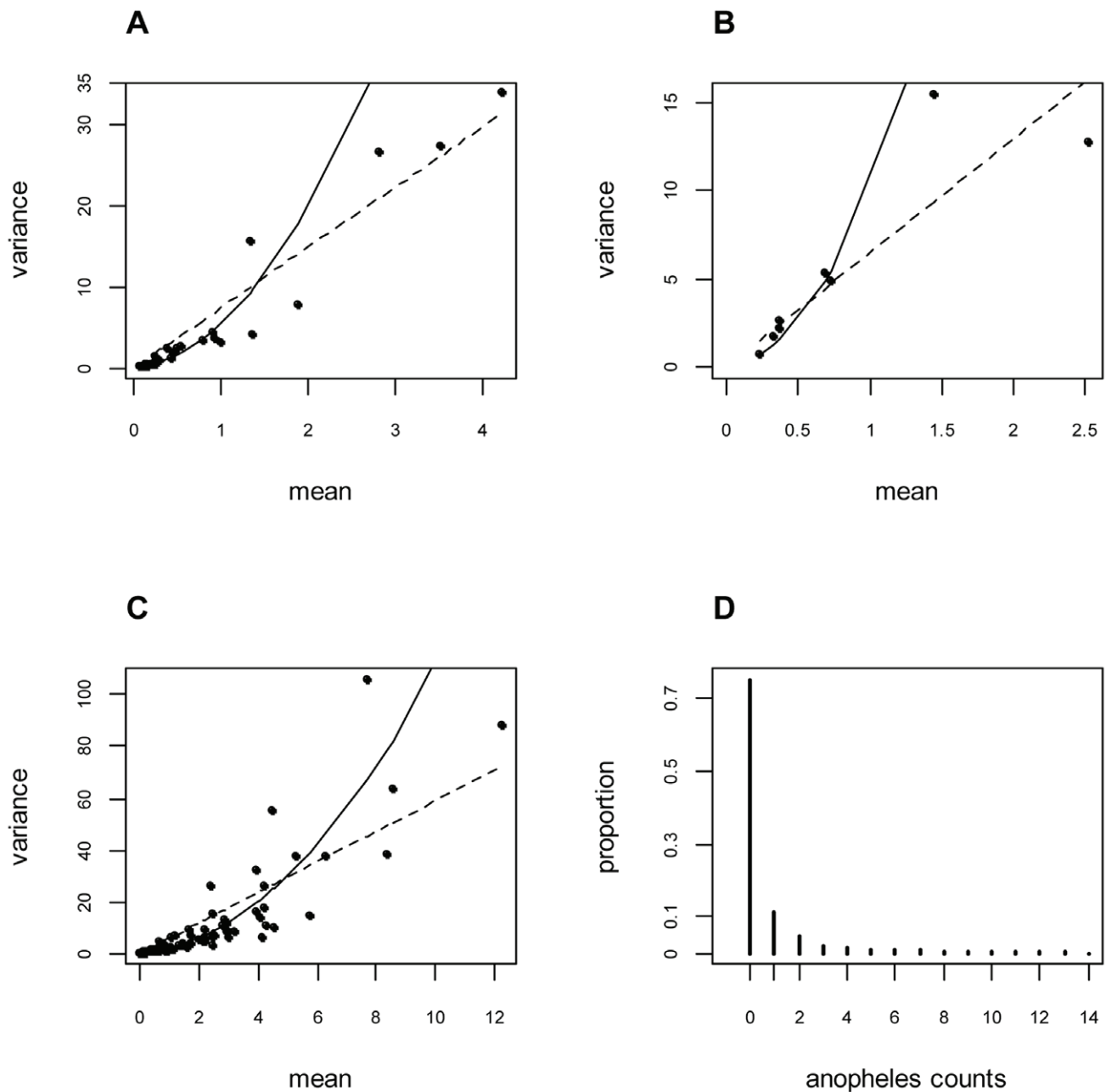


Figure 2. Mean-variance diagrams of the number of malaria vectors collected per village (Panel A), per mission (Panel B), and per village-mission (Panel C). Panel D shows a bar diagram of the distribution of mosquito counts at each collection site (the scale of the X-axis was limited to 14). On panels A, B and C: the dotted lines represent a linear link between the means and the variance ($\text{variance} = \alpha \times \text{mean}$ with $\alpha = 7.4, 6.48$ and 5.9 respectively); the curves represent a quadratic link between mean and variance ($\text{variance} = \text{mean} + \beta \times \text{mean}^2$ with $\beta = 4.4, 8.9$ and 1.1 respectively).

doi:10.1371/journal.pone.0050452.g002

vector of observations in the village g and $P(yg|c)$ the probability of yg assuming membership in class c .

Hence, each village is assigned to one of the classes based on the maximum of the a posteriori probabilities (MAP). This provides a classification of the villages according to the average number of malaria vectors collected at a given site over a given night after adjustment on all the covariates.

In order to assess the impact of TLLIN, ULLIN, UL-LIN+CTPS and TLLIN+IRS vector control strategies, the village grouping for implementation of these vector control strategies and

the classification resulting from the NPMP conditional model were compared using a Kruskal-Wallis test.

About the number of the latent classes

The relevance of a NPMP model also called Poisson latent classes model, be it marginal or conditional, depends jointly on its ability to provide a close distribution to that of the observed counts and on its ability to assign each count one of the classes. Essentially, two criteria contributed to the choice of the number of classes: the closeness of the predicted values to the observed ones,

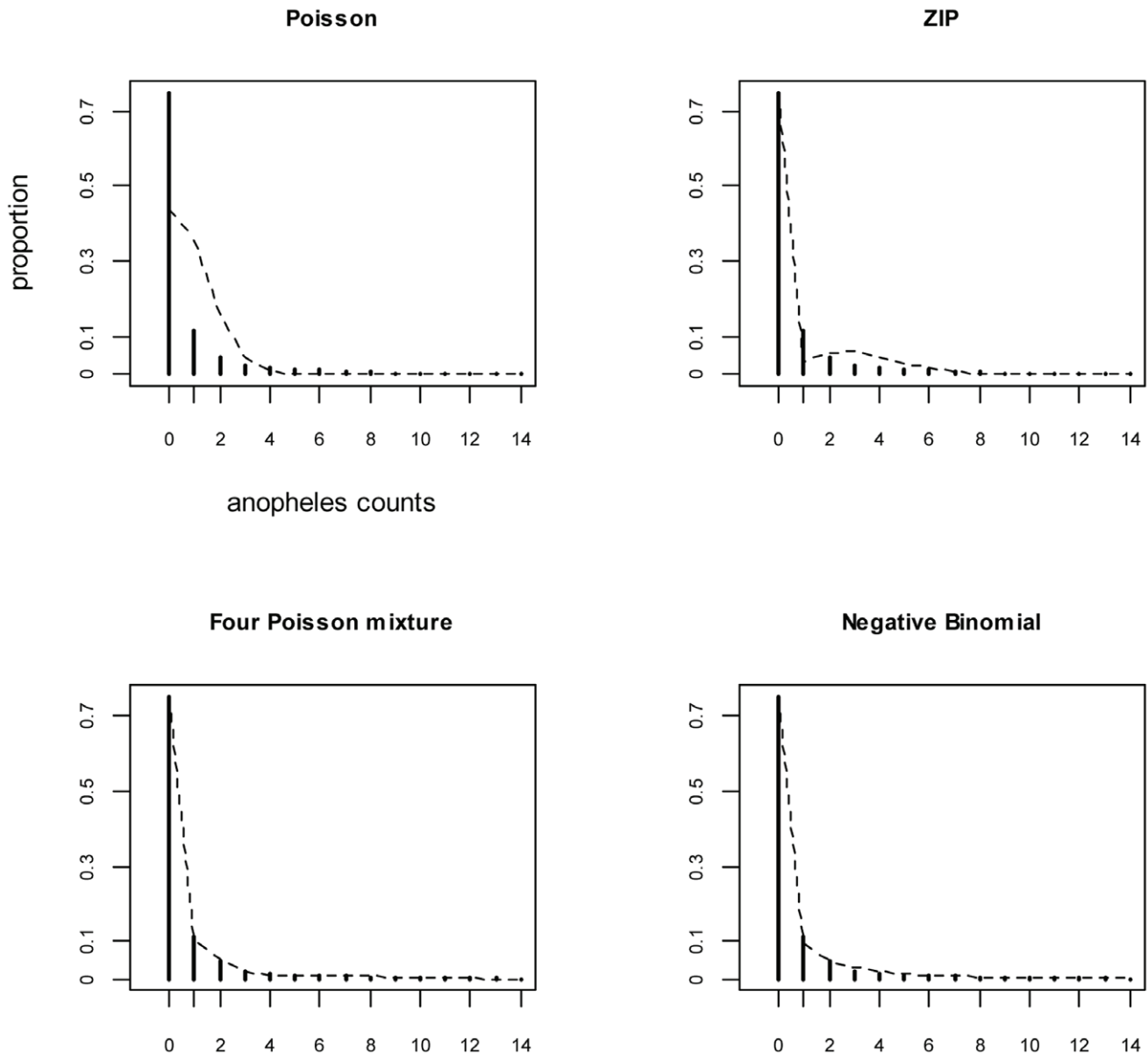


Figure 3. Observed and expected proportions of mosquito counts according to Poisson, ZIP, NPMP and NB distributions.
doi:10.1371/journal.pone.0050452.g003

which is the deviance expressed under the form of a Bayesian Information Criterion [26]; and, the ability of the model to assign each count one of the classes, which is expressed by the Entropy [27]. The Integrated Complete-data Likelihood (ICL-BIC) [28] is a combination of these two criteria; precisely, the BIC plus two times the entropy. Hence, the number of classes chosen for a latent class model is the one that maximizes the likelihood with low entropy equivalent to a minimum ICL-BIC.

Results

Entomological Data

Total of 2,994 malaria vectors were collected during 3,584 human-nights of mosquito collection. This corresponded to an average HBR of 0.835 bites per human per night. Among these vectors, 1,872 belonged to the *An. gambiae* complex and 1,122 belonged to the *funestus* Group. The density of anopheline collected

changed over space and time (Figure 1). Indeed, the mean HBR in OKT ranged from 0.070 to 4.219 bites per human per night when the standard deviation ranged from 0.286 to 5.812. In most villages, high standard deviations corresponded to high means and between surveys the number of malaria vectors collected varied.

Study of the dispersion

Village, survey, and village-survey mean numbers of malaria vector collected per night on humans were plotted with their corresponding variances in Figures 2A, 2B and 2C respectively. The assumption of mean-variance equality of the Poisson distribution was not met. Indeed, the variances were much higher than the means and the slopes of the linear relationships were >1 showing even quadratic relationships. This indicates overdispersion of the data.

Table 1. Parameters and deviance as estimated by the Poisson, ZIP, NPMP, NB and ZINB models.

Distribution	Parameters			-2logL
	Mean (SE)	Proportion (SE)	Dispersion parameter	
Standard Poisson	0.835 (0.015)	1 (-)		13492.470
Zero-inflated Poisson (ZIP)				9229.370
Zero-class	0 (-)	0.736 (0.008)		
Poisson	3.169 (0.062)	0.264 (0.008)		
Poisson mixture model with 4 latent classes (NPMP)				7591.700
Low	0 (7×10^{-6})	0.630 (-)		
Median-low	0.923 (0.029)	0.296 (-)		
Median-high	6.555 (0.161)	0.070 (-)		
High class	24.480 (1.281)	0.004 (-)		
Negative Binomial (NB)	0.835 (0.038)	1 (-)	0.156 (0.007)	7581.856
Zero-inflated negative binomial (ZINB)				7581.856
Zero-class	0 (-)	3.6×10^{-6} (1.7×10^{-5})		
NB	0.835 (0.038)	0.999 (1.7×10^{-5})	0.156 (0.007)	

-2logL: -2 times the log-likelihood
doi:10.1371/journal.pone.0050452.t001

Distribution analysis

Frequency plot of the collected malaria vectors is shown in Figure 2D. The cases for which zero malaria vectors were

collected represented 74.7% of the total. Table 1 shows the parameters for Poisson, ZIP, NPMP (the marginal model), NB and ZINB distributions. Based on the Poisson distribution with a mean

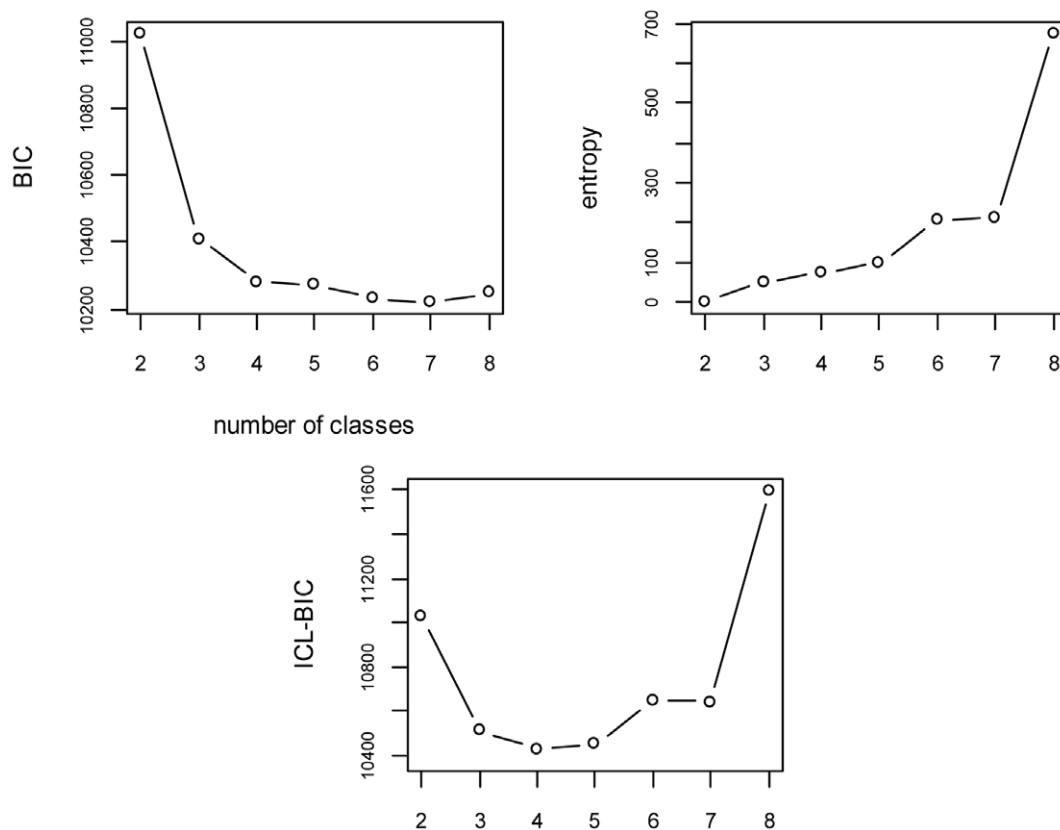


Figure 4. Changes in the values of the Bayesian Information Criterion (BIC), the entropy, and the Integrated Complete-data Likelihood (ICL-BIC) according to the number of latent classes.

doi:10.1371/journal.pone.0050452.g004

Table 2. Estimations of the relationships between mosquito density and various geographical and environmental factors in OKT region according to the conditional NPMP model.

Level and covariate	Relative Risk (95% CI)
<i>Village</i>	
Distance to a freshwater body (per additional km)	0.885 (0.871–0.899)
Presence of water conveyance (Yes vs. No)	0.411 (0.348–0.485)
Presence of market gardening (Yes vs. No)	1.146 (1.016–1.292)
Presence of cattle (Yes vs. No)	0.817 (0.700–0.954)
Layout of the village (single- vs. multi-cluster)	0.466 (0.377–0.574)
Population density (per additional inhabitant/100 m ²)	1.335 (1.079–1.651)
Mean rain quantity over all surveys (per additional mm)	1.325 (1.292–1.359)
Mean number of rainy days over all surveys (per additional day)	2.148 (1.675–2.754)
Mean NDVI (per additional grade)	0.849 (0.827–0.872)
<i>House</i>	
Deviation from the mean NDVI of the village (per additional grade)	0.990 (0.978–1.003)
Collection site (outside vs. inside)	1.182 (1.100–1.270)
<i>Mission</i>	
Deviation* from the mean rain quantity (per additional mm)	0.993 (0.989–0.997)
Deviation* from the mean number of rainy days (per additional day)	0.902 (0.827–0.984)

*Difference between the mean value over all surveys and the value at a given survey
doi:10.1371/journal.pone.0050452.t002

of 0.835, we would expect 43.4% of zero (Figure 3A) which is significantly lower than that observed in the dataset. In contrast, ZIP, NB and NPMP models well predicted the proportion of zero (respectively 74.7%, 74.9%, and 74.7%; Figure 3). Excluding the sites where no anopheline were collected, the ZIP model estimated the mean number of collected anopheline per site per night at 3 but this does not solve the problem of data overdispersion. The NPMP model suggested that, in the study area, the sites where the anopheline counts over a single night would be generally high (mean 24.48) were rather rare (nearly 0.4%). However, the model estimated at 63% and 30%, respectively, the proportions of counts with 0 and 1 as the mean number of collected anopheline per night. The dispersion parameter estimated by the NB model was 0.156 indicating high overdispersion. Since the NB model allows for the excess of zeros, the proportion of zeros estimated by the ZINB model is nearly null. The NB and the ZINB models are therefore equivalent.

There were a significant decrease of the model deviance when a ZIP model was used instead of the standard Poisson model and also when the NPMP was used instead of the ZIP model (Table 1). The NB and ZINB fitted the data as well as the NPMP (deviance were not significantly different). Figure 3 shows the bar diagrams and the expected density probability curves of the counts with the Poisson, ZIP, NPMP and NB models. The curves relative to the NB and to the NPMP models are very similar and fit well the observed data distribution. Conversely, the curve relative to the standard Poisson model does not fit the observed frequency of counts between 0 and 10. Aside from the proportion of zeros, the ZIP model was not able to reproduce the observed proportions of counts ranging from 1 to 10.

Choosing the number of latent classes

Figure 4 shows for the NPMP model conditional on “village”, the progress of the BIC, the entropy, and the ICL-BIC according to the number of classes. Starting from 4 classes, the BIC became very low. The entropy augmented together with the number of

classes. Their combination ICL-BIC was at its minimum with 4 classes. Therefore, the model with 4 latent classes was used to assess the number of malaria vector caught on humans according to climatic and environmental factors.

Multivariate Poisson mixture analysis

Table 2 shows the relative risk of the fixed effects as estimated by the model. Presence of market gardening, population density, mean cumulated rainfall over the 8 surveys, mean cumulated number of rainy days over the 8 surveys and outdoor position were positively associated with the number of malaria vectors caught on human. On the other hand, distance to a freshwater body, presence of water conveyance, presence of cattle, single-cluster village houses, mean NDVI and deviation at each survey from mean cumulated number of rainy days over the 8 surveys were negatively associated with the number of malaria vectors caught on human.

Table 3 shows the random effects of the model. These are the predicted mean number of collected malaria vectors per night for each of the four latent classes when all the covariates are at their mean values. This table shows also the final classification of the villages according to their respective MAP. The mean number of malaria vectors collected ranged from 0.050 vectors per human per night in the 1st class (with only one village: Hekandji) to 0.713 in the 4th class (with 8 villages).

A Kruskal-Wallis test did not show a significant association between villages classification obtained from the model and the villages grouping for vector control strategies (Chi² = 2.029, p-value = 0.566). Thus, according to HBR, a significant difference in term of impact of vector control strategies (TLLIN, ULLIN, ULLIN+CTPS and TLLIN+IRS) is not showed.

Discussion

Knowledge of malaria vector density in a given area is often needed for implementing and evaluating vector control interven-

Table 3. Classification of the 28 villages according to the maximum a posteriori probability (MAP) of belonging to each class after adjustment on all other covariates.

Village	Latent class	Mean number of mosquitoes	Proportion of villages	MAP
Hekandji	1	0.050	0.036	0.992
Aidjedo	2	0.137	0.218	0.997
Assogbenou				1
Ayidohoue				0.990
Dokanmey				0.998
Hounkponouhoue				1
Abenihoue				1
Adjame	3	0.324	0.466	1
Amoulehoue				1
Adjahassa				0.924
Kindjitokpa				1
Vidjinnagnimon				1
Guezohoue				1
Hla				1
Agokon				0.968
Dekponhoue				0.998
Lokohoue				1
Todo				1
Wanho				1
Zoume				0.994
Agouako	4	0.713	0.280	0.775
Hinmadou				0.925
Manguevie				0.925
Satre				0.925
Soko				0.925
Tanto				0.925
Tokoli				0.925
Agadon				0.925

doi:10.1371/journal.pone.0050452.t003

tions. This requires vector counts at several sites of the area and statistical analyses of these counts.

McCullagh and Nelder [29] asserted that whenever the variable of interest is a count, its distribution is often an overdispersed Poisson distribution. The present data are another illustration of this assertion. The first part of this work aimed at comparing which distribution among Poisson, NB, ZIP, ZINB and NPMP better fit on counts of malaria vectors recorded using the HLC technique. Both NB and NPMP models dealt with the excess of zero, with overdispersion and provided the best predictions of the distribution of the observed data. However, unlike NB model, the NPMP does not do any further assumption about the distribution of the means of malaria vectors counts. Besides, the hierarchical structure of the observed data was taken into account by a NPMP model conditional on “village”. Based on a posterior probability criterion, the NPMP model allowed ranking the villages in four latent classes according to the mean of vector density after adjustment on environmental and climatic covariates. The optimal number of latent classes was established on conventional criteria. Furthermore, the part each covariate played in the variability of malaria vector density in the area was estimated by the fixed effects of the model. However, the present study could not take

into account all the possible hierarchical levels of the data because of the limits of software R in dealing with latent classes. Indeed, function *allvc* of package “npmlreg” cannot deal with more than two levels. We considered thus the catches at all sites of the same village as repeated measurements of the same variable. Therefore, we were not able to take into account the possible correlation between the counts from houses within the same village [30]. “Human bait” is another level that could induce correlation in the data but there is no sufficient information about all mosquito collectors. Besides, the rotation of the collectors during data collection reduces considerably such a correlation. “Season” could be another possible level of correlation; it was taken into account through rainfall data which is the main seasonal factor in the context of malaria vector density.

Moreover, the numbers of collected vectors during the 8 surveys are assumed to be uncorrelated although one may speculate about a correlation structure along time. Nevertheless, the correlation between mosquito counts from successive surveys is deemed to be very low because the time span between two successive surveys is 6 weeks whereas the lifespan of the vectors is only 3 to 4 weeks. Studying the correlation between counts from two nights during the same survey may reveal interesting results.

In southern Benin, both spatial and temporal heterogeneities in vector densities were mentioned by Djènontin et al. [5]. This can be explained by some factors we found associated with the density of malaria vectors. Firstly, cumulated rainfalls during the 15 days preceding the catches were positively associated with vector density as previously reported in Benin [30]. Moreover, the mean number (over all surveys) of rainy days was positively associated with the vector density whereas the deviation at each survey from this mean was negatively associated with the vector density. This suggested that high frequency of rainy events might flush out vectors breeding sites [31]. The vector density was lower in villages with water supply; this could be due to the absence of water storages that could have provided breeding sites for malaria vectors [32,33]. Moreover, the presence of irrigated market gardening could have provided breeding sites [34,35] and then, increased the density of vectors in villages closed to this activity as previously observed in Benin [36]. Permanent freshwaters of the Toho Lake could also have provided breeding sites for both *An. funestus* and *An. gambiae* [37–39] that are both present in our study area [5]. This explains why the vector density decreased when moving away from freshwater bodies as showed by Amek et al. [40] in Western Kenya. The presence of cattle was negatively correlated with vector density suggested that a part of the vector population could have bite on cattle instead of human. More vectors were caught in multi-cluster villages than in single-cluster villages. This might indicate that a multi-cluster village layout might increase the attractiveness of the village for malaria vectors because of the extra vegetation surrounding houses. Thus, the attractiveness of a multi-cluster village may be higher than that of a single-cluster village of same size. Catches were also more abundant outside than inside the houses. This indicates an exophagic behavior of malaria vectors in the study area. As suggested by two studies in the OKT region [4,41], a part of the exophagic population of vectors could have avoided indoor residual insecticides.

One unexpected finding of the present study was that the NDVI was negatively correlated with the density of malaria vectors. This finding contrasts with several studies that used satellite imagery at a lower resolution [42,43] but agrees with a study carried out in Burkina Faso that used the same SPOT images than ours [44]. In this study, the authors found a negative relationship between the larval productivity in ponds and the NDVI calculated from high

resolution SPOT images. Indeed, a high NDVI might reflect the presence of submerged vegetation or water covered with vegetation that are usually related to very high *Anopheles* larval densities [44–46]. Moreover, the NDVI usually decreases with freshwater and unvegetated surfaces likely to provide breeding sites for the malaria vectors [37,47]. Nevertheless, the discussion about the NDVI effect can be more complex because of the co-existence in the region of two major malaria vectors with different breeding-site requirements.

In this work, villages were ranked into four classes of increasing mean malaria vector density but we were not able to find any relationship between this grouping structure and the vector control intervention implemented in the village. This confirms the finding of Corbel et al. [4] who demonstrated with the same data, that vector density was not significantly different between treatment arms (TLLIN, ULLIN, TLLIN+IRS, and ULLIN+CTPS).

In conclusion, we found that the NPMP model was useful to assess the relationships between vectors density and villages or environmental characteristics. It might therefore be an efficient tool to compute risk maps of the host-vector contact. Moreover, the NPMP model provided a classification of the villages after taking into account some covariates. Such a classification could be used at a pre-study step to improve the study design of mosquito collection and adapt the sampling effort according to the village characteristics, especially in region with high spatial and temporal heterogeneities of mosquito density, like in the OKT region. Furthermore, NPMP model could help in the study design of RCT when a stratified sampling is needed. The same model may be adapted and used in other settings for the study of the distribution of vectors of other diseases.

Acknowledgments

We thank the populations and authorities of the OKT district for their kind support and collaboration. We also thank Pr. Jean-François Etard for his helpful contribution to the conception and design of the present study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RE VC NF OB. Analyzed the data: OB RE. Wrote the paper: OB RE JI NM VC. Collected the data: AD NM SBB. Revised the manuscript: RE NF VC NM JI AD OB.

References

1. WHO (2011) World Malaria Report 2011. Geneva: World Health Organization.
2. Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, et al. (2011) Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *The Lancet Infectious Diseases*.
3. Silver JB SM (2008) Sampling adults by animal bait catches and by animal-baited traps. *Mosquito ecology field sampling methods*: Springer. pp. 493–675.
4. Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, et al. (2012) Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 12: 617–626.
5. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Boussari O, et al. (2010) Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* 3: 83.
6. Alain E, Brenac T (2001) Modèles linéaires généralisés appliqués à l'étude des nombres d'accidents sur des sites routiers. *Le modèle de Poisson et ses extensions*. Recherche Transports Sécurité: 3–16.
7. Bouche G, Lepage B, Migeot V, Ingrand P (2009) Application of detecting and taking overdispersion into account in Poisson regression model. *Rev Epidemiol Sante Publique* 57: 285–296.
8. Gardner W, Mulvey EP, Shaw EC (1995) Regression analyses of counts and rates: Poisson, overdispersed Poisson, and negative binomial models. *Psychol Bull* 118: 392–404.
9. Breslow N (1990) Tests of hypotheses in overdispersed Poisson regression and other quasi-likelihood models. *Journal of the American Statistical Association*: 565–571.
10. Dean C, Lawless JF (1989) Tests for detecting overdispersion in Poisson regression models. *Journal of the American Statistical Association*: 467–472.
11. Hauer E, Ng JCN, Lovell J, Board NRCTR (1988) Estimation of safety at signalized intersections: National Research Council, Transportation Research Board.
12. Johnson NL, Kotz S (1969) *Discrete distributions*: Wiley Online Library.
13. Lambert D (1992) Zero-inflated Poisson regression, with an application to defects in manufacturing. *Technometrics*: 1–14.
14. McLachlan GJ, Peel D (2000) *Finite mixture models*: Wiley-Interscience.
15. Aitkin M (1996) A general maximum likelihood analysis of overdispersion in generalized linear models. *Statistics and computing* 6: 251–262.
16. Aitkin M (1999) A general maximum likelihood analysis of variance components in generalized linear models. *Biometrics* 55: 117–128.
17. Gillies M, De Meillon B (1968) *The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)*. Johannesburg: S. Afric Inst Med Res.
18. Akogbeto M (1995) Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake. *Ann Soc Belg Med Trop* 75: 219–227.
19. Fontenille D, Simard F (2004) Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 357–375.

20. Kelly-Hope LA, McKenzie FE (2009) The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J* 8: 19.
21. Dennis J, Schnabel RB (1983) Numerical methods for nonlinear equations and unconstrained optimization. *Classics in Applied Math* 16.
22. R Development Core Team and contributors worldwide. The R Stats Package, version 2.14.1.
23. Einbeck J, Darnell R, Hinde J (2009) npmlreg: Nonparametric maximum likelihood estimation for random effect models. R-project.org/package=npmlreg. 0.44 ed.
24. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*: 1–38.
25. Rabe-Hesketh S, Skrondal A (2004) Counts. Generalized latent variable modeling: multilevel, longitudinal, and structural equation models: Chapman & Hall. pp. 349–372.
26. Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics* 6: 461–464.
27. Nagin DS, Odgers CL (2010) Group-Based Trajectory Modeling in Clinical Research. *Annual Review of Clinical Psychology* 6:109–138.
28. Biernacki C, Celeux G, Govaert G (2000) Assessing a mixture model for clustering with the integrated completed likelihood. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on* 22: 719–725.
29. McCullagh P, Nelder JA (1989) Generalized linear models: Chapman & Hall/CRC.
30. Cottrell G, Kouwaye B, Pierrat C, le Port A, Bouraima A, et al. (2012) Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in Benin and its implications for cohort study. *PLoS One* 7: e28812.
31. Paaijmans KP, Wandago MO, Githeko AK, Takken W (2007) Unexpected high losses of *Anopheles gambiae* larvae due to rainfall. *PLoS One* 2: e1146.
32. Bio-Bangana S, Chandre F, Djènontin A, Chabi J, Ossè R, et al. (2009) Characterization of mosquito fauna in Ouidah, Kpomasse and Tori-Bossito Sanitary Zone in Benin (West Africa). Multilateral Initiative on Malaria. Nairobi, Kenya. Poster.
33. Holstein MH (1954) Biology of *Anopheles gambiae*: research in French West Africa: World Health Organization.
34. Matthys B, Vouatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EG, et al. (2006) Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1223–1231.
35. Klinkenberg E, McCall P, Wilson MD, Amerasinghe FP, Donnelly MJ (2008) Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana. *Malar J* 7: 151.
36. Yadouleton A, N'Guessan R, Allagbe H, Asidi A, Boko M, et al. The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin. *Parasit Vectors* 3: 118.
37. Hamon J (1955) *Biologie d'Anopheles funestus*. Biologie des anophèles d'AOF et d'AEF. Paris: ORSTOM. pp. 6 multigr.
38. Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, et al. (2009) Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol* 9: 16.
39. Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouana J, et al. (2009) Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol* 9: 17.
40. Amek N, Bayoh N, Hamel M, Lindblade KA, Gimnig J, et al. (2012) Spatial and temporal dynamics of malaria transmission in rural Western Kenya. *Parasit Vectors* 5: 86.
41. Moiroux N, Bustamante GM, Penetier C, Elanga E, Djègbé I, et al. (2012) Changes in *Anopheles funestus* biting behaviour following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *J Infect Dis*: In press.
42. Thomson MC, Connor SJ (2000) Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol* 14: 227–244.
43. Hay SI, Omumbo JA, Craig MH, Snow RW (2000) Earth observation, geographic information systems and *Plasmodium falciparum* malaria in sub-Saharan Africa. *Adv Parasitol* 47: 173–215.
44. Dambach P, Sie A, Lacaux JP, Vignolles C, Machault V, et al. (2009) Using high spatial resolution remote sensing for risk mapping of malaria occurrence in the Nouna district, Burkina Faso. *Glob Health Action* 2.
45. Gillies M, Coetzee M (1987) A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Johannesburg, South Africa: South African Institute for Medical Research. 143 p.
46. Gimnig JE, Ombok M, Kamau L, Hawley WA (2001) Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology* 38: 282–288.
47. Edillo FE, Toure YT, Lanzaro GC, Dolo G, Taylor CE (2002) Spatial and habitat distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani village, Mali. *J Med Entomol* 39: 70–77.

Modelling the risk of being bitten by malaria vectors in a vector control area in south Benin, West Africa.

Authors:

Nicolas Moiroux^{1,3§}, Abdul S. B. Bangana³, Armel Djènontin^{2,3}, Fabrice Chandre¹, Vincent Corbel^{1,4}, H el ene Guis^{5,6}

¹ MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP64501, 34394 Montpellier, France.

² MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 01 BP4414 RP, Cotonou, Bénin.

³ Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou (CREC), Ministère de la Santé, Cotonou, Bénin.

⁴ Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

⁵ CIRAD, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France.

⁶ INRA, UMR 1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France.

§Corresponding author

Email addresses:

NM: nicolas.moiroux@ird.fr

ASB: biobanganaa@yahoo.fr

AD: armel.djenontin@ird.fr

FC: fabrice.chandre@ird.fr

VC: vincent.corbel@ird.fr

HG: helene.guis@cirad.fr

Abstract

Background

The diversity of malaria vector populations, expressing various resistance and/or behavioural patterns could explain reduced effectiveness of vector control interventions reported in some African countries. A better understanding of ecology and distribution of malaria vectors is essential to design more effective and sustainable strategies for malaria elimination. Here, we analyzed the spatio-temporal risk of the contact between humans and the sympatric *An. funestus* and both M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in an area of Benin with high coverage of vector control measures with an unprecedented level of resolution.

Methods

Presence-absence data for the three vectors from 1-year human-landing collections in 19 villages were assessed using binomial mixed-effects models according to vector control measures and environmental covariates derived from field and remote sensing data. After 8-fold cross-validations of the models, predictive maps of the risk of the contact between humans and the sympatric *An. funestus* and both M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* were computed.

Results

Model validations showed that the *An. funestus*, *An. gambiae* M form, and S form models provided an excellent (Area Under Curve>0.9), a good (AUC>0.8), and an acceptable (AUC>0.7) level of prediction, respectively. The distribution area of the probability of contact between human and *An. funestus* largely overlaps that of *An. gambiae* M form but this latter showed important seasonal variation. *An. gambiae* S form also showed seasonal variation but with different ecological preferences. Landscape data were powerful to discriminate between the species' distributions.

Conclusions

These results showed that available remote sensing data could help predict the human-vector contact of several species of malaria vectors at a village level. The predictive maps showed seasonal and spatial variations in risk of human-vectors contact for the all three vectors. Such maps could help Malaria Control Programs to implement more effective vector control strategy by taking into account to the seasonality and to the distribution of malaria vector species.

Keywords

Malaria; Anopheles; Remote sensing; Modelling; Host-vector contact

Background:

In response to the worldwide decrease in deaths due to malaria (1, 2), malaria elimination is back on the global agenda (3). However, evidences of reduced effectiveness of vector control interventions have been reported in some African countries (4-6) hence challenging confidence in malaria control efforts in the region. According to the authors of these studies, the diversity of malaria vector populations, expressing various resistance and/or behavioural patterns could explain this trend. A better understanding of the mosquito ecology and distribution is thus essential to take into account this diversity and design more effective and sustainable strategies for malaria control and elimination (7, 8).

The ~60 species of *Anopheles* which are considered vectors of malaria (9) vary in terms of their capacity to transmit the disease because of variations in their susceptibility to the parasite (vectorial competence), host-seeking preferences (anthropophagy), and/or abundance (this latter being related to the local availability of their specific habitat) (10). The difference in vectorial capacity can also be observed at the sub-species level. Indeed, M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* (taxa that are considered in a process of speciation (11)) have very different ecological preferences (12-14) and susceptibility to the *Plasmodium* infection (15). Regarding their ecological preferences, the S form was more frequently observed in the driest areas, in open fields that accommodate for temporary and rainfall-dependent breeding sites with low predation (12, 13, 16) whereas the M form showed a longer larval development (17, 18) and a low sensibility to predation (19, 20) highlighting a better adaptation to more permanent breeding sites. Moreover, major malaria vectors species facing the wide use of residual insecticides in Africa have adapted by expressing different “strategies” including insecticide resistance (21) or behavioural avoidance (22-24). These strategies seem to vary according to the vector population and/or the species (21, 25-31).

In the Ouidah-Kpomasse-Tori Bossito (OKT) region in southern Benin, a recent cluster randomized controlled trial (RCT) did not report any benefits of using combined long-lasting insecticidal nets (LLIN) and carbamate indoor residual spraying (IRS) or Carbamate Treated Plastic Sheeting (CTPS) compared to selective coverage of LLIN (5). In this area, the three major African malaria vectors, *An. gambiae* M and S forms and *An. funestus* are sympatric, with spatial and temporal variations (30). High levels of physiological resistance have been recorded in both M and S forms of *An. gambiae* population (32-34) whereas *An. funestus* seems to avoid the contact with insecticide by modulating its biting behaviour (22). The presence, in sympatry, of several vector species with different ecologies and resistance strategies gives a particularly interesting opportunity to study the bioecology of the three major African malaria vectors exposed to insecticidal products.

In the present work, we studied the spatio-temporal risk of the contact between humans and the sympatric *An. funestus* and both M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* according to a set of environmental covariates in 19 villages in southern Benin, with an unprecedented level of resolution. Using Binomial mixed-effect models, we assessed the environmental determinants (including vector control measures) of the probability of human-vector contact and we mapped the predicted risk of being bitten by each of these vectors during the dry and the rainy seasons.

Method:

Study area and vector control interventions:

This study was carried out in the Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito (OKT) health administrative region in southern Benin (on the Atlantic coast). Of the 58 villages screened at the baseline, 30 were excluded because they did not fulfil inclusion criteria *i.e.* distance between two villages greater than two kilometres, population size between 250 and 500 inhabitants with non-isolated habitations, and absence of any local health care centre (5). Twenty-eight were randomly assigned to four groups (seven villages by groups) for implementation of four vector control interventions: (1) targeted LLIN coverage (TLLIN) to pregnant women and children younger than 6 years; (2) universal LLIN coverage of sleeping units (ULLIN), (3) targeted LLIN coverage plus full coverage of carbamate IRS (TLLIN+IRS), and (4) universal LLIN coverage plus full coverage of carbamate CTPS lined up to the walls of the household (ULLIN+CTPS). Of the 28 villages used during the clinical trial, nine (three TLLIN, two ULLIN, two ULLIN+CTPS, and two TLLIN+IRS) were excluded because they were not covered by the satellite image used for the landscape analysis. Details about the allocation of vector control intervention method have been described elsewhere (5).

Mosquito collections:

Mosquitoes were collected every six weeks during the year 2009 (eight surveys) using the human landing catch (HLC) technique. HLC were done from 22:00 to 06:00 both indoors and outdoors of four houses in each village on two successive nights for each survey (*i.e.*, 16 collector-nights per village per survey). Sites were a minimum distance of 50 metres from each other and were homogeneously distributed across the village (sites situated near eucalyptus tree, smoke, etc. were discarded). Collectors were rotated hourly between collection sites and/or position (indoor/outdoor). Independent staff supervised rotations and regularly checked the quality of mosquito collections.

Malaria vectors collected on humans were identified using morphological keys (35, 36). All mosquitoes belonging to the Gambiae complex and the Funestus Group were identified to species by PCR (37, 38). Both M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* were identified by the method of Favia *et al.* (39).

Peri-domestic breeding sites inventory:

Anthropogenic larval habitats inside the village borders were surveyed using a standard dipping methods (40). Sampling was repeated during each survey of adult collection and the number of breeding sites positive (or not) for the presence of *Anopheles sp.* larvae was recorded. The Breteau index, representing the number of positive containers for larvae per 100 houses was estimated in each locality (41).

Size of the buffer zone:

To characterize the environment in the neighborhood of the 19 villages, buffer zones were defined around each village. According to Service (42), two kilometres is the maximum flight range for *Anopheles sp.* and breeding sites located beyond that distance can be considered as insignificant. The distance of two kilometres was therefore selected as the radius of the buffer zones.

Spatio-temporal data:

We used the Land-Surface Temperature (LST) at a spatial resolution of one kilometre measured by the Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) sensors on the

Terra satellite (<https://lpdaac.usgs.gov/>). The weekly nocturnal and diurnal temperatures during the week of the surveys and during each of both weeks preceding the surveys were extracted using ArcGis ArcInfo 9.3 software (ESRI, Redlands, CA) in the buffer zone of each village. When the data were not available at a specific date, we used the TiSEG software (43) to estimate missing data: according to the quality statement of the pixels provided as metadata with MODIS data, pixels that do not fit a "good" or an "acceptable" quality (because of clouds for example) were temporally interpolated (linear interpolation) between the values of the same pixels (if they fitted the required quality) of the closest preceding and following images.

We used the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) at a spatial resolution of 250 metres measured by the MODIS sensor. For each survey and each village, the average 16-day NDVI during the two-weeks period including the survey and the two-week period preceding the survey was extracted in the buffer zone. TiSEG was used to interpolate missing data using the same method that was used with LST data

Daily rainfall data used was derived from the Tropical Rainfall Measuring Mission (TRMM) and other Satellites Precipitation product (3B42 Version 6). TRMM daily rainfall data were cumulated for the 15 days preceding each mosquito collection and spatially interpolated (using a kriging technique). The mean estimate of the cumulated rainfall in the buffer zone of each village was extracted. Cumulated rainfall was expressed in millimetres. The same procedure was used to extract the number of rainy days over the 15 days preceding each mosquito collection in each village.

Spatial only data:

A Digital Elevation Model (DEM) derived from the Satellite Pour l'Observation de la Terre (SPOT) SPOTDEM product with a 30 meters resolution was used to compute mean elevation, mean slope, count of sink and mean theoretical flow accumulation (i.e. for each pixel, the surface of its drainage area giving the theoretical drainage network capacity). To describe the ability of soils to accommodate for breeding sites, hydromorphic soils were identified on a digitized soil map of south Benin (44). Hydromorphic soils are poorly-drained and characterized by an excess of water due to temporary waterlogging or the presence or rise of groundwater (45, 46). The percentage of area of hydromorphic soils in the buffer areas was computed.

A land-cover map was obtained by carrying out a supervised object-oriented nearest-neighbour classification (47) of a SPOT-5 satellite image (pixel of five metres) acquired on 01/23/2010 (eCognitionTM software, Definiens-imaging, Munich, Germany). More than 140 plots of known land-cover were identified and geolocated in the field. These plots were used as training plots to define the feature of each land-cover class and then classify the overall image using a nearest-neighbour algorithm. The accuracy of the final classification was assessed using a confusion matrix to compare the allocated land cover class to 70 supplementary ground-truth validation plots.

A landscape analysis was conducted on the land-cover map to characterize its spatial structure. Using the Fragstats freeware (48), the following metrics were calculated for each class of land-cover in the buffer zone of each village: the percentage of the surface, the number of patches, the edge length. Other metrics were used to describe the diversity present within the whole landscape (i.e. for the entire buffer regardless of the class): the Patch Richness Density, the Simpson's Diversity Index and the Modified Simpson's Evenness Index (all metrics are defined in the Fragstats documentation (48)).

Market gardening could create breeding sites due to the irrigation and water storages. However, these activities are difficult to discriminate on SPOT imagery because of the small size of fields. We therefore carried out field surveys to inventory market gardening areas. Roads were digitalized from 1/50000 maps from 1968 available at the Institut Géographique National of Benin and updated using the SPOT-5 image.

In order to describe attractiveness and penetrability for malaria vectors, village perimeters were extracted by on screen digitalization using visual interpretation of the SPOT image. Then, area and population density were computed and the distance from each collection site to the perimeter of the village was measured. The number of neighbourhoods (homogenous groups of houses separated from other groups by a vegetated strip) was recorded to describe the clustered or spread-out layout of the villages. Using the Shape Metrics Tool (http://clear.uconn.edu/tools/Shape_Metrics/), the normalized Spin and Depth indices describing the shape of the villages were computed. Cattle farms were inventoried because they can interfere with host seeking behaviour of malaria vectors that may bite on cattle rather than human (49).

Statistical analysis:

All analyses were performed using the 'R' software (50) and the additional 'lme4' (51) and 'pROC' (52) packages.

The probability of human-vector contact (PHVC) for each species and molecular forms considered during a survey (two consecutive nights) was assessed using a Binomial Mixed-Effect (BME) model with nested random effects at the village and collection site level. The dependent variable was the presence/absence of vectors collected during 1216 catches (19 villages * four collection sites * two places (indoors and outdoors) * eight surveys). The BME was adjusted for the vector control intervention and the collector's position (indoor or outdoor). The independent variables were tested both as continuous and categorical variables (after recoding). They were kept as continuous variables whenever possible, and were stratified into terciles (or into presence/absence if more relevant) when necessary to accommodate for non-monotonic and non-linear responses. Only variables found to be significantly correlated ($p < 0.05$) with the PHVC of malaria vector species were kept for analysis of collinearity. Collinear covariates were deleted based on empirical knowledge until the Variance Inflation Factor (VIF) of remaining variables was below three (53).

All selected variables from the univariate analysis were introduced in the multivariate BME models, and a backward procedure was applied to select only those that remained significant with a p -value < 0.05 in the final model.

The structure of the models was evaluated by 8-fold cross-validation with the data of each survey successively used for validation. The predictive accuracy of the models was assessed using the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve method (54). The area under curve (AUC) of the ROC curve, its 95% confidence interval (95% CI), sensitivity and specificity were calculated to assess the quality of the models (52).

Risk maps of human-vector contact:

Based on the final multivariate BME models, two seasonal maps of the risk of contact with the three species were computed for the 15-16/01/2009 (dry season) and the 30-31/06/2009 (rainy season). Covariates describing attractiveness and penetrability for which data were not available at all points of the area were set at a constant value equal to the mean calculated for overall villages.

Ethics statement:

The IRD (Institut de Recherche pour le Développement) Ethics Committee and the National Research Ethics Committee of Benin approved the study (CNPERS, reference number IRB00006860). All necessary permits were obtained for the described field studies. No mosquito collection was done without the approval of the head of the village, the owner and occupants of the collection house. Mosquito collectors gave their written informed consent and were treated free of charge for malaria presumed illness throughout the study.

Results

Malaria vector collection

In the 19 villages (Table 1) during 2432 human-nights of collection, 2379 malaria vectors were collected: 1091 were *An. funestus* and 1288 were *An. gambiae s.s.* among which 1063 belonged to the molecular M form and 225 belonged to the molecular S form. Over 1216 catches (two human-nights per site per survey) used for modelling, only 252, 323, and 114 were positive for *An. funestus*, *An. gambiae* M form, and *An. gambiae* S form, respectively.

Land-cover map

Fourteen land-cover classes were discriminated: surface freshwater (1.8% of the total surface), aquatic grassland (1.4%), herb swamp (2.1%), coco tree (1%), eucalyptus tree (4.5%), palm tree (11.5%), teak tree (6.3%), pineapple (1.8%), rainfed agriculture (28%), forest (6%), degraded riparian forest (3%), thicket (13.9%), savanna (5.9%), and degraded surface (bare soil and constructed areas, 12.4%). The confusion matrix revealed that the overall accuracy of the classification was excellent (98.9%). The resulting land-cover map of the study area is presented in Figure 1.

Determinants of the probability of human-vector contact

Covariates that were kept in final multivariate models, their odds-ratio and 95% confidence interval are presented in Tables 2 (*An. funestus*), Table 3 (*An. gambiae* M form), and Table 4 (*An. gambiae* S form).

Cumulated rainfall during the 15 days preceding the catch positively correlated to the PHVC of each vector species ($p < 0.001$) whereas the number of rainy days was negatively associated with the PHVC of *An. gambiae* M form. NDVI was correlated negatively with the PHVC of *An. gambiae* S form and *An. funestus* (NDVI two weeks before collection) but positively with *An. gambiae* M form (NDVI of the collection period).

The PHVC of the three species was explained by temperature data recorded two weeks before the catch. The PHVC of *An. funestus* and *An. gambiae* M form decreased respectively with the diurnal and the nocturnal temperatures recorded during the week or the week preceding the mosquito collection. They were also both positively correlated with the number of neighborhoods.

PHVC of M and S forms of *An. gambiae* was positively correlated with the presence and the number of domestic breeding sites. Interestingly, the PHVC of the *An. gambiae* M form was associated with both the surface and an intermediate number of patches of unvegetated land but negatively correlated with the presence of herbswamp. The PHVC of *An. gambiae* M form decreased with the number of cattle recorded around the village.

The PHVC of *An. gambiae* S form was positively associated with the elevation, the length of roads, an intermediate number of patches of pineapple plantation (between 10 and 25) but

negatively correlated with the slope. The presence of hydromorphic soils correlated with the PHVC of the three species and the surface of freshwater increased the PHVC of *An. funestus*. The PHVC of *An. gambiae* S form was lower in the villages where ULLIN+CTPS were implemented compared to villages belonging to the reference group (TLLIN). However, the PHVC of *An. gambiae* M form or S form was higher in villages where ULLIN was implemented. The PHVC of *An. gambiae* S form was significantly higher outdoor than indoor.

Validation

The ROC curves of the 8-fold cross validation are presented in Figure 2. The AUC of the *An. funestus* BME was 0.92 (95% CI 0.90-0.94; Figure 2A) indicating an excellent prediction. For the probability threshold 0.13, specificity was 80% (95% CI 78-83) and sensitivity was 93% (95% CI 90-96).

The AUC of the *An. gambiae* M form BME was 0.84 (95% CI 0.81-0.86; Figure 2B) indicating a "good" prediction. For the probability threshold 0.21, specificity was 65% (95% CI 63-69) and sensitivity was 86% (95% CI 83-90). The AUC of the *An. gambiae* S form BME was 0.77 (95% CI 0.72-0.82; Figure 3C) indicating an "acceptable" prediction. For the probability threshold 0.12, specificity was 81% (95% CI 79-83) and sensitivity was 65% (95% CI 56-74).

Risk maps

Maps of the predicted PHVC of *An. funestus*, *An. gambiae* M form, and *An. gambiae* S form for two nights during the dry and the rainy season are presented in Figure 3. During the dry season, *An. funestus* was highly concentrated around Toho Lake in the southern part of the study area. During the rainy season, we observed an increase of its PHVC along the downstream parts of the rivers that drain into Toho Lake and the lagoon. The PHVC of *An. gambiae* M form followed a similar distribution pattern in the dry season: areas of highest risk were found in the southern part of the study area, largely overlapping areas of high PHVC of *An. funestus*. Distribution of the PHVC of *An. gambiae* M form showed the most important seasonal variations spreading along the rivers and in the most elevated part of the study area during the rainy season. The PHVC of *An. gambiae* S form was lower than that of *An. funestus* and *An. gambiae* M form. Its distribution is very different as it is largely confined in the northern and eastern part of the study area. It represented a risk in the south only during the rainy season.

Discussion

The M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* and *An. funestus* occurred in sympatry in the OKT region (30) and this setting is particularly favourable to study the environmental determinants involved in the spatial and temporal distribution of each malaria vector species. Here, we fitted specific models at an unprecedented level of resolution to predict the spatio-temporal risk of the human-vector contact in 19 villages in southern Benin. The models were validated using an 8-fold cross-validation technique. The predictions given by BME models were considered as "good" and "excellent" for *An. gambiae* M form and *An. funestus* respectively whereas the predictions for the *An. gambiae* S form model was "acceptable". The lower predictive value of the *An. gambiae* S form model was likely due to the lower number of mosquitoes collected during the collection period. Indeed *An. gambiae* S form was previously described as being at the edge of its distribution area in southern Benin (55). At our knowledge, this study is the one considering the most important number of environmental

covariates likely to impact the ecology of these malaria vectors. Indeed, we paid great attention to take into account most of the relevant factors driving the production of breeding sites, the vector dispersion, and the vector survival. However, some factors that are likely to affect the contact with malaria vectors can not be used because they were unavailable, of poor quality, or of poor resolution. Such factors like human settlements others than the studied villages, predation, personal protection, humidity, and wind could increase the accuracy of these models.

The present study seems to indicate that *An. gambiae* M form was not dependent on the presence of permanent wetlands (freshwaters and aquatic grassland). This result contrasts with previous studies conducted in Burkina Faso and Cameroon (12, 13). Instead, we found a positive correlation between the PHVC of *An. gambiae* M form and both the surface and the number of patches of unvegetated land. This might be explained by the fact that the SPOT image used to assess land use was acquired during the dry season when seasonal wetlands were almost absent. The PHVC of *An. gambiae* M form was negatively correlated to the number of rainy days hence suggesting that this species may be particularly sensitive to flush-out. Nevertheless, all species were positively associated with the surface and presence of hydromorphic soils that might provide suitable semi-permanent breeding sites during the rainy season. As expected, the PHVC of *An. funestus* was predicted by the presence of freshwater bodies that could provide ideal breeding sites for this species (56).

Length of roads in the buffer area around the villages positively predicted the PHVC of *An. gambiae* S form. Indeed, road ditches and puddles created by vehicles are known to provide good breeding sites for this species, particularly during the rainy season (57). Interestingly, only the intermediate class of number of patches (10 to 25) of pineapple plantations increased the probability of contact with *An. gambiae* S form. Leaf axils of pineapple plants could provide breeding sites for *An. gambiae* as previously observed in the neighbouring Nigeria (58) and regular traffic of vans carrying fruits could create ruts in roads. However, the relationship was not linear and not related to the surface indicating that external factors probably alter the development of *An. gambiae* S form when the number of plantations increases. We presume that different species of pineapples, cropping techniques or the presence of more or less predators may impact on this trend. Despite a small range of elevations and slopes in the study area, these factors were significantly associated with the PHVC of *An. gambiae* S form as described elsewhere in Africa (12-14). *An. funestus* and *An. gambiae* M form were correlated to the number of neighbourhoods that is an indicator of the villages' layout. This might indicate that scattered habitations in a village might increase the attractiveness of the village for these species. This suggests that the field of attraction of a scattered village may be larger than that of a clustered village of the same size.

Temperatures recorded 2 weeks before the catch (corresponding to the larval period) explained the PHVC of the three species. The PHVC of *An. funestus* and *An. gambiae* S form was higher when temperatures increased. A different scenario was observed with *An. gambiae* M form: the lower the temperature (over different time periods comprised between the week of the catch and two weeks before the catch), the higher the PHVC of *An. gambiae* M form. This result could indicate that the M form was more susceptible to high water temperatures that can induce high mortality rates at the larval stage (59-61) and more active when temperatures were the lower. However there is no data available to biologically support our assumptions and the real underlying reason for these associations remains unclear. Our models show that the relationship between temperatures and distribution of malaria vectors is complex. Indeed, both diurnal and nocturnal temperatures, over different time periods

(comprised between the week of the catch and two weeks before the catch), were significantly predictive for two of the three species studied. Temperature is known to influence many aspects of the mosquito biology like larval growth, survival of adults and biting activity. Moreover, our team found a negative correlation between elevated temperature and LLIN use in Benin that could also impact on mosquito longevity and density (62). Further investigations are needed to better understand the impact of temperature on the ecology of these vector species.

Our results indicate that the PHVC of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* was greater in presence of domestic breeding sites. This is worrying because it might indicate that villagers “bred” malaria vectors in the villages and inside the houses and might therefore support part of the malaria transmission. Since the majority of containers involved as breeding sites were used for water storage, these breeding sites were not rain-dependent and remained full especially during the dry season. No information is yet available regarding the *Anopheles* species present in the domestic breeding sites. Larviciding may then represent a complementary strategy for targeting malaria vectors within semi-urbanized population centres in rural areas.

Regarding vector control interventions, the probability of contact with at least one *An. funestus* was reduced only in villages sharing the ULLIN+CTPS combined intervention. This trend might reflect a decrease in the density of *An. funestus* following the implementations of vector control intervention hence underlying a certain efficacy of the treatments. In contrast, the PHVC of both molecular forms of *An. gambiae s.s.* was higher in villages where ULLIN were implemented alone. This finding contrasts with that of Corbel and colleagues (5) as they did not find a significant difference between ULLIN and TLLIN in terms of mosquito density and malaria transmission. We assume that mosquito collectors were overexposed to the vector bite. Indeed, high levels of LLIN use as observed in the ULLIN arm (5) might have contributed to divert a part of the vector population to alternatives hosts (like cattle, as suggested by the *An. gambiae* M form model) or to unprotected hosts such as our collectors (49, 63).

To conclude, the predictive maps showed seasonal and spatial variations in risk of human-vectors contact for the all three vectors. These variations were characterized by an increase of the distribution areas of the three species during the rainy season. Such maps could help Malaria Control Programs to implement more effective vector control strategy by taking into account to the seasonality and to the distribution of malaria vector species. The use of larvicides in domestic breeding sites might be cost effective considering the possible ecology of *An. gambiae s.s.* in rural areas in Benin.

Acknowledgments

We thank populations of the villages for their kind support and collaboration. We also thank all the field and laboratory staff for their strong commitment to this project. We thank French ministry of foreign affairs through the SCAC programme, IRD, the EDENext programme, and Mr François Lacoste for their financial support. We thank the ISIS programme of CNES for providing us the SPOT image.

Authors' contribution

NM, VC, FC and HG designed the study. NM, ASB, and AD collected field data. NM treated the data. NM and HG performed the analysis. NM, VC and HG wrote the article.

References

1. Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet*. 2012;379(9814):413-31.
2. World Health Organization. World Malaria Report: 2011. Geneva: World Health Organization 2011.
3. Feachem R, Sabot O. A new global malaria eradication strategy. *The Lancet*. 2008;371(9624):1633-5.
4. Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, Faye J, et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis*. 2011 Dec;11(12):925-32.
5. Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, et al. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2012 Aug;12(8):617-26.
6. 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 Jul;18(7):1101-6.
7. Ferguson HM, Dornhaus A, Beeche A, Borgemeister C, Gottlieb M, Mulla MS, et al. Ecology: a prerequisite for malaria elimination and eradication. *PLoS Med*. 2010;7(8):e1000303.
8. The malERA Consultative Group on Vector Control. A Research Agenda for Malaria Eradication: Vector Control. *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000401.
9. Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, Richard-Lenoble D, et al. Biodiversity of malaria in the world: John Libbey Eurotext; 2008.
10. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol*. 2010 Jan 5.
11. della Torre A, Tu Z, Petrarca V. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005 Jul;35(7):755-69.
12. Simard F, Ayala D, Kamdem GC, Pombi M, Etouna J, Ose K, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol*. 2009;9:17.
13. Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, et al. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol*. 2009;9:16.
14. de Souza D, Kelly-Hope L, Lawson B, Wilson M, Boakye D. Environmental factors associated with the distribution of *Anopheles gambiae* s.s in Ghana; an important vector of lymphatic filariasis and malaria. *PLoS One*. 2010;5(3):e9927.
15. Ndiath MO, Cohuet A, Gaye A, Konate L, Mazenot C, Faye O, et al. Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malar J*. 2011;10:269.

16. Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabire RK, Simard F. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol.* 2011 Mar;26(1):9-17.
17. Diabate A, Dabire RK, Heidenberger K, Crawford J, Lamp WO, Culler LE, et al. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. *BMC Evol Biol.* 2008;8:5.
18. Diabate A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, Baldet T, et al. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol.* 2005 Jul;42(4):548-53.
19. Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol.* 2010 Sep;21(5):1087-92.
20. Gimonneau G, Pombi M, Dabire RK, Diabate A, Morand S, Simard F. Behavioural responses of *Anopheles gambiae sensu stricto* M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit Vectors.* 2012;5:65.
21. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 2011 Feb;27(2):91-8.
22. Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djenontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin. *J Infect Dis.* 2012 Nov;206(10):1622-9.
23. Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J.* 2011;10:80.
24. Govella NJ, Ferguson H. Why Use of Interventions Targeting Outdoor Biting Mosquitoes will be Necessary to Achieve Malaria Elimination. *Front Physiol.* 2012;3:199.
25. Diabate A, Baldet T, Chandre C, Dabire KR, Kengne P, Guiguemde TR, et al. KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. *J Med Entomol.* 2003 Mar;40(2):195-8.
26. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia.* 1999 Sep;41(1-3):319-22.
27. Fanello C, Petrarca V, della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, et al. The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae s.s.* *Insect Mol Biol.* 2003 Jun;12(3):241-5.
28. Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, Barrese E, Dia I, Caccone A, et al. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J.* 2008 Apr 29;7(1):74.
29. Dabire KR, Diabate A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouedraogo JB, et al. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J.* 2008;7:188.
30. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, Henry MC, Bousari O, Chabi J, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors.* 2010 Sep 6;3(1):83.

31. Brooke BD, Kloke G, Hunt RH, Koekemoer LL, Temu EA, Taylor ME, et al. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*. 2001;91(4):265-72.
32. 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 Mar;101(3):207-16.
33. Djogbenou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol*. 2011 Sep;25(3):256-67.
34. 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. *Malaria Journal*. 2011;10(1):261.
35. Gillies M, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Johannesburg, South Africa: South African Institute for Medical Research; 1987.
36. Gillies M, De Meillon B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Publication of the South Afr Inst Med Res*. 1968(54):343.
37. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):804-11.
38. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Oct;49(4):520-9.
39. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 2001 Feb;10(1):19-23.
40. Silver JB. Sampling the Larval Population. *Mosquito Ecology*2008. p. 137-338.
41. World Health Organization. Yellow-fever panel: report on the first session. Geneva: World Health Organization 1950 1-6 December 1949 Contract No.: 19.
42. Service MW. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal--the long and short of it. *J Med Entomol*. 1997 Nov;34(6):579-88.
43. Colditz RR, Conrad C, Wehrmann T, Schmidt M, Dech S. TiSeG: A flexible software tool for time-series generation of MODIS data utilizing the quality assessment science data set. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*. 2008;46(10):3296-308.
44. Volkoff B, Willaime P. Carte pédologique de reconnaissance de la République Populaire du Bénin à 1/200 000 : feuille de Porto-Novo. AP : Autres productions. Paris: ORSTOM1976.
45. Aubert G, editor. La classification pédologique utilisée en France. *Classification des Sols : Symposium International*; 1965; Gand.
46. Young A. *Tropical soils and soil survey*. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1976.
47. Benz UC, Hofmann P, Willhauck G, Lingenfelder I, Heynen M. Multi-resolution, object-oriented fuzzy analysis of remote sensing data for GIS-ready information. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*. 2004;58(3-4):239-58.
48. McGarigal K, Cushman S, Ene E. *FRAGSTATS v4: Spatial Pattern Analysis Program for Categorical and Continuous Maps*. Amherst: University of Massachusetts2012.
49. Killeen GF, Smith TA. Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Sep;101(9):867-80.
50. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2.12 ed. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2010.

51. Bates D., Maechler M. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999375-32 ed2009.
52. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. BMC Bioinformatics. 2011;12:77.
53. Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. Methods in Ecology and Evolution. 2010;1(1):3-14.
54. Park SH, Goo JM, Jo CH. Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. Korean J Radiol. 2004 Jan-Mar;5(1):11-8.
55. Djogbenou L, Pasteur N, Bio-Bangana S, Baldet T, Irish SR, Akogbeto M, et al. Malaria vectors in the Republic of Benin: Distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex. Acta Trop. 2010 Feb 4.
56. Hamon J. Biologie d'*Anopheles funestus*. Biologie des anophèles d'AOF et d'AEF. Paris: ORSTOM; 1955. p. 6 multigr.
57. Edillo FE, Toure YT, Lanzaro GC, Dolo G, Taylor CE. Spatial and habitat distribution of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Banambani village, Mali. J Med Entomol. 2002 Jan;39(1):70-7.
58. Anosike JC, Nwoke BE, Okere AN, Oku EE, Asor JE, Emmy-Egbe IO, et al. Epidemiology of tree-hole breeding mosquitoes in the tropical rainforest of Imo State, south-east Nigeria. Ann Agric Environ Med. 2007;14(1):31-8.
59. Bayoh MN, Lindsay SW. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res. 2003 Oct;93(5):375-81.
60. Bayoh MN, Lindsay SW. Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. Med Vet Entomol. 2004 Jun;18(2):174-9.
61. Lyimo EO, Takken W, Koella JC. Effect of rearing temperature and larval density on larval survival, age at pupation and adult size of *Anopheles gambiae*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 1992;63(3):265-71.
62. Moiroux N, Boussari O, Djènontin A, Damien G, Cottrell G, Henry M-C, et al. Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. PLoS One. 2012;7(1):e30558.
63. Lines JD, Myamba J, Curtis CF. Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and eave curtains against malaria vectors in Tanzania. Med Vet Entomol. 1987 Jan;1(1):37-51.

Figure 1: Land use map based on a supervised object-oriented classification of a SPOT-5 satellite image acquired on 01/23/2010

This map was obtained by carrying out a supervised object-oriented nearest-neighbour classification using the software eCognition™ (Definiens-imaging, Munich, Germany). More than 210 plots of known land-cover were identified and geolocated in the field to be used as training and validation (ground-truth) data.

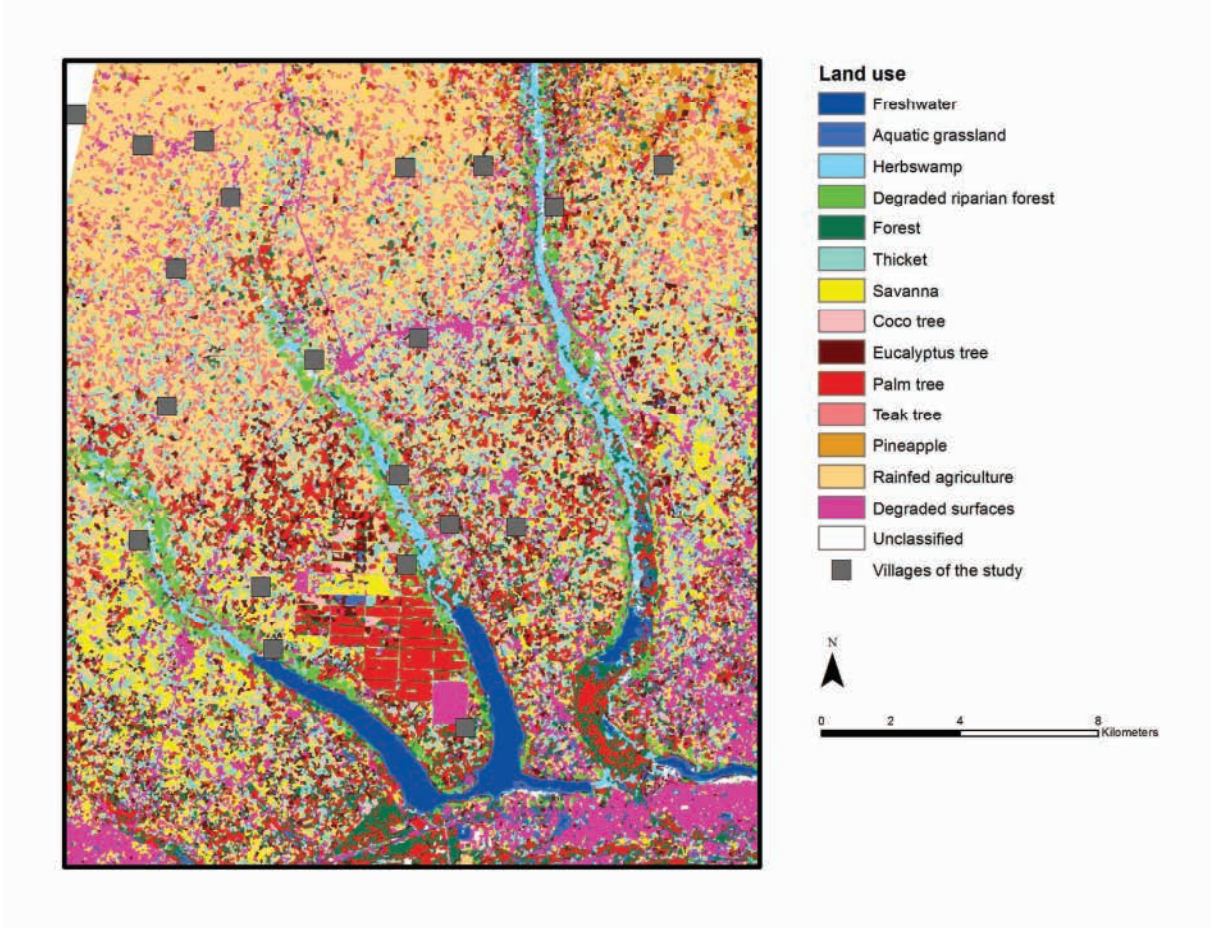


Figure 2: ROC curve of the predictive model of the contact between human and (A) *An. funestus* (B) *An. gambiae* M form and (C) *An. gambiae* S form.

ROC (Receiver Operating Characteristic) curves were performed based on 8-fold cross-validations of the final multivariate models with the data of each survey successively used for validation. The curves plot the sensitivity versus one minus the specificity. Greater is the area under the curve, greater is the predictive accuracy of the model.

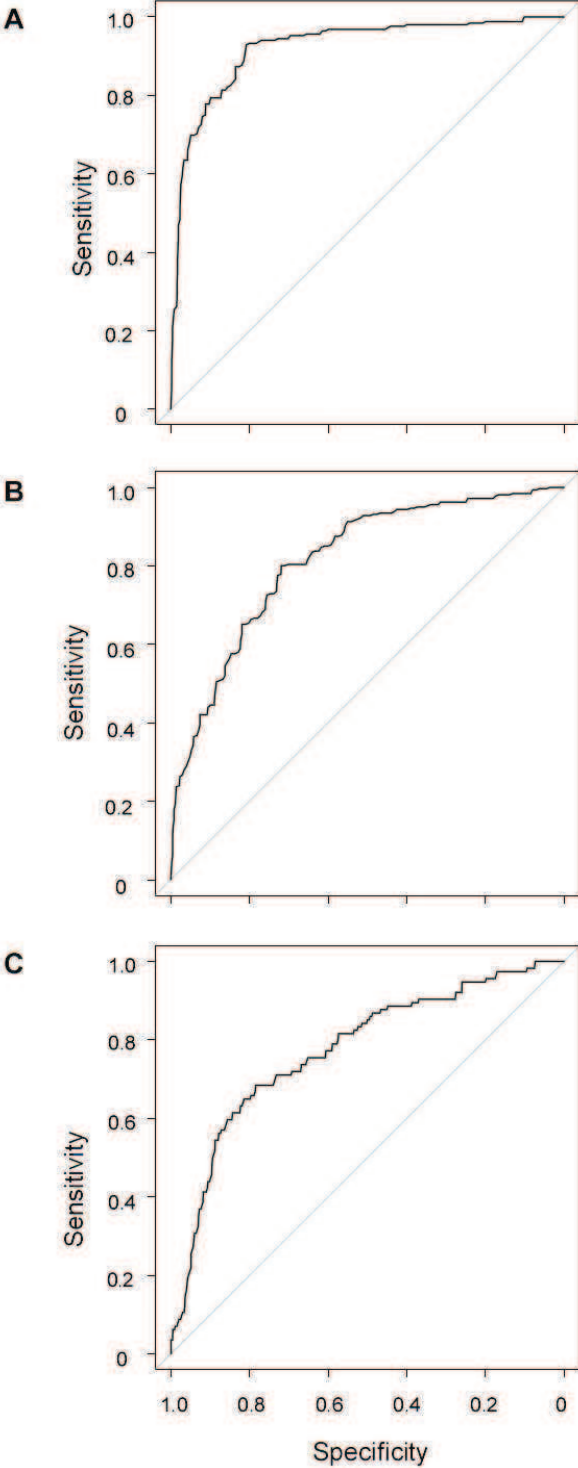


Figure 3: Risk maps of the contact between human and (A, B) *An. funestus*, (C, D) *An. gambiae* M form and (E, F) *An. gambiae* S form for 2 nights during the dry and the rainy season

Risk maps were computed based on the final multivariate binomial mixed-effect models. Two seasonal maps of the probability of contact with the three species/forms were produced for the 15-16/01/2009 (dry season) and the 30-31/06/2009 (rainy season). Covariates describing attractiveness and penetrability for which data were not available at all points of the area were set at a constant value equal to the mean calculated for overall villages.

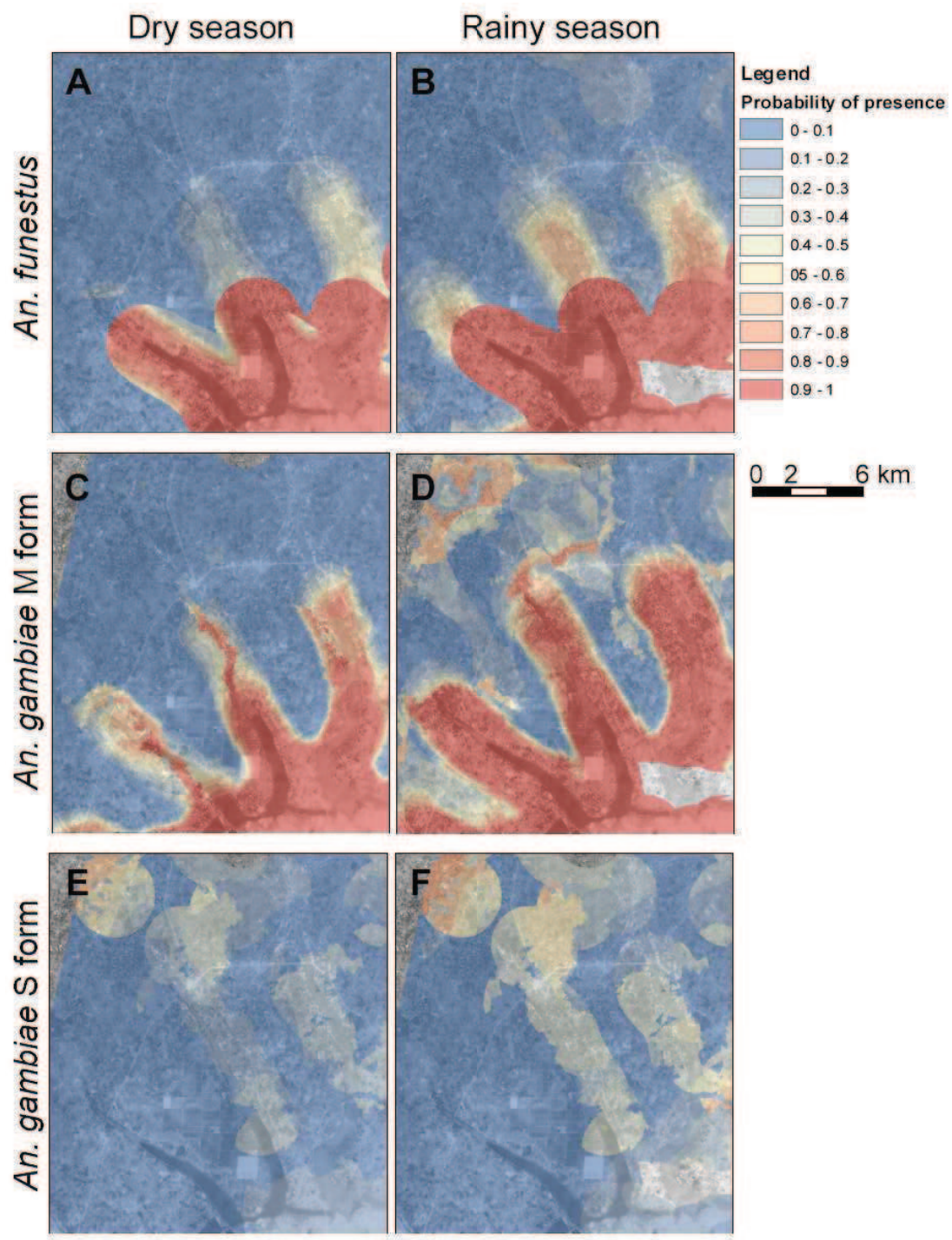


Table 1: Spatial coordinates of the studied villages and entomological data.

Latitudes and longitudes are given in the standard coordinate system WGS84. Proportion of catches positive for each species was calculated over 64 catches carried out in each village (4 collection sites * 2 places (indoors and outdoors) * 8 repetitions (surveys)).

Village name	Village center coordinates		Proportion (%) of catches positive for			Total no. of vectors collected		
	Latitude	Longitude	<i>An. funestus</i>	<i>An. gambiae</i> M form	<i>An. gambiae</i> S form	<i>An. funestus</i>	<i>An. gambiae</i> M form	<i>An. gambiae</i> S form
AGOUAKO	N 06°30'30.2"	E 002°09'47.7"	1.56	9.38	6.25	1	7	5
AMOULEHOUE	N 06°26'36.3"	E 002°07'19.9"	35.94	26.56	4.69	50	53	8
ASSOGBENOU DAHO	N 06°27'19.5"	E 002°05'24.5"	4.69	18.75	6.25	3	22	6
AYIDOHOUÉ	N 06°31'35.8"	E 002°05'59.6"	1.56	6.25	0.00	1	8	0
ADJAHASSA	N 06°33'11.3"	E 002°09'34.5"	0.00	18.75	6.25	0	27	4
DOKANMEY	N 06°33'13.9"	E 002°13'37.5"	3.13	10.94	4.69	2	9	5
KINDJITOKPA	N 06°25'37.5"	E 002°07'31.3"	84.38	39.06	6.25	297	127	6
TOKOLI-VIDJINNAGNIMON	N 06°26'57.1"	E 002°09'36.6"	65.63	34.38	12.50	230	81	10
HEKANDJI	N 06°29'26.0"	E 002°05'51.0"	0.00	4.69	6.25	0	3	5
HLA	N 06°32'34.0"	E 002°11'54.8"	3.13	21.88	10.94	2	41	7
HOUNKPONOUHOUE	N 06°33'31.4"	E 002°05'27.7"	1.56	7.81	15.63	2	8	12
MANGUEVIER	N 06°28'21.8"	E 002°09'29.3"	18.75	53.13	4.69	18	95	4
TANTO	N 06°33'13.1"	E 002°10'48.0"	0.00	29.69	23.44	0	88	64
LOKOHOUÉ	N 06°24'24.2"	E 002°10'32.1"	71.88	53.13	7.81	273	175	10
TODD	N 06°30'09.9"	E 002°08'09.2"	0.00	26.56	6.25	0	56	6
TOKOLI-DOZOUZRAME	N 06°27'35.2"	E 002°10'17.1"	50.00	43.75	25.00	112	100	22
WANHO	N 06°27'32.9"	E 002°11'19.6"	46.88	62.50	0.00	96	77	0
AGADON	N 06°33'35.8"	E 002°06'25.7"	3.13	23.44	25.00	2	67	43
ZOUME	N 06°32'42.7"	E 002°06'50.5"	1.56	14.06	6.25	2	19	8

Table 2: Multivariate binomial mixed-effect model of the risk of human-*An. funestus* contact

OR: Odds-ratio; CI: Confidence Interval; ha: hectares; °C: degrees Celsius; mm: millimetres; m: metres; TLLIN: Targeted distribution of Long-Lasting Insecticidal Nets; ULLIN: Universal distribution of LLIN; CTPS: Carbamate Treated Plastic Sheeting; IRS: carbamate Indoor Residual Spraying.

		OR	95% CI		P-value	
Surface water	absence	1				
	presence	228.775	81.888	639.144	< 2e-16	***
Area of hydromorphic soils (per additional 100 ha)		3.823	2.136	6.843	< 5e-4	***
NDVI 2 weeks before the catch		0.001	0.000	0.067	0.001	***
Diurnal temperature 2 weeks before the catch (per additional °C)		1.321	1.175	1.485	< 5e-4	***
Nocturnal temperature (1 week before the catch; in °C)	<20.68	1				
	20.68-21.64	0.090	0.040	0.200	< 5e-4	***
	≥21.64	0.129	0.053	0.316	< 5e-4	***
Cumulated precipitation 16 days preceding the catch (per additional mm)		1.012	1.009	1.016	< 5e-4	***
Number of neighbourhoods	<2	1				
	2	2.187	0.767	6.233	0.143	
	≥3	116.273	35.779	377.856	< 5e-4	***
Vector control intervention	TLLIN	1				
	ULLIN	0.679	0.311	1.481	0.330	
	ULLIN+CTPS	0.264	0.108	0.646	0.004	**
	TLLIN+IRS	0.398	0.151	1.045	0.061	.

Table 3: Multivariate binomial mixed-effect model of the risk of human-*An. gambiae* M form contact

OR: Odds-ratio; CI: Confidence Interval; ha: hectares; °C: degrees Celsius; mm: millimetres; m: metres; TLLIN: Targeted distribution of Long-Lasting Insecticidal Nets; ULLIN: Universal distribution of LLIN; CTPS: Carbamate Treated Plastic Sheeting; IRS: carbamate Indoor Residual Spraying.

		OR	95% CI		P-value	
Proportion of unvegetated land (per additional %)		1.080	1.047	1.113	< 5e-4	***
Number of patches of unvegetated lands	<75	1				
	75-92	6.321	3.472	11.509	< 5e-4	***
	≥92	1.174	0.421	3.275	0.759	
Herbswamp	absence	1				
	presence	0.276	0.135	0.565	< 5e-4	***
Area of hydromorphic soils (per additional 100 ha)		20.323	9.908	41.688	< 2e-16	***
Domestic breeding sites	absence	1				
	presence	2.021	1.215	3.360	0.007	**
NDVI (during collection)	<0.591	1				
	0.591-0.652	2.472	1.427	4.281	0.001	**
	≥0.652	3.042	1.643	5.635	< 5e-4	***
Diurnal temperature 1 week before the catch (per additional °C)		0.735	0.614	0.882	0.001	***
Nocturnal temperature the week of the catch (per additional °C)		0.755	0.651	0.875	< 5e-4	***
Nocturnal temperature 2 weeks before the catch		0.835	0.714	0.977	0.024	*
Number of days with rainfall during the 16 days preceding the catch (per additional day)		0.842	0.751	0.943	0.003	**
Cumulated precipitation during the 16 days preceding the catch		1.020	1.015	1.025	< 5e-4	***
Number of cattle (per additional individual)		0.990	0.981	0.998	0.021	*
Number of neighbourhoods	<2	1				
	2	0.779	0.380	1.595	0.495	
	≥3	10.644	3.114	36.386	< 5e-4	***
Vector control intervention	TLLIN	1				
	ULLIN	3.214	1.241	8.324	0.016	*
	ULLIN+CTPS	1.902	0.820	4.416	0.134	
	TLLIN+IRS	0.459	0.170	1.239	0.124	

Table 4: Multivariate binomial mixed-effect model of the risk of human-*An. gambiae* S form contact

OR: Odds-ratio; CI: Confidence Interval; ha: hectares; °C: degrees Celsius; mm: millimetres; m: metres; TLLIN: Targeted distribution of Long-Lasting Insecticidal Nets; ULLIN: Universal distribution of LLIN; CTPS: Carbamate Treated Plastic Sheeting; IRS: carbamate Indoor Residual Spraying.

		OR	95% CI		P-value	
Road length (m)	<18,000	1				
	18,000 - 22,000	6.272	2.321	16.949	< 5e-4	***
	≥22,000	2.978	1.202	7.380	0.018	*
Number of patches of pineapple	<10	1				
	10-25	5.668	1.135	28.309	0.035	*
	≥25	1.581	0.664	3.763	0.301	
Elevation (per additional m)		1.058	1.028	1.088	< 5e-4	***
Slope (per additional degree)		0.551	0.291	1.042	0.067	.
Hydromorphic soil	absence	1				
	presence	13.407	4.705	38.206	< 5e-4	***
Nocturnal temperature 2 weeks before the catch (per additional °C)		1.330	1.086	1.628	0.006	**
NDVI 2 weeks before catch		0.016	0.000	0.639	0.028	*
Cumulated precipitation 16 days preceding the catch (per additional mm)		1.005	1.002	1.009	0.003	**
Number of breeding sites per 100 houses (per additional site)		1.055	0.999	1.114	0.056	.
Domestic breeding sites	absence	1				
	presence	2.668	1.485	4.792	0.001	**
Vector control intervention	TLLIN	1				
	ULLIN	2.799	1.016	7.709	0.046	*
	ULLIN+CTPS	1.016	0.365	2.824	0.976	
	TLLIN+IRS	0.615	0.152	2.483	0.495	
Collection site	Indoor	1				
	Outdoor	1.519	0.992	2.326	0.054	.

Changes in *Anopheles funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin

Nicolas Moiroux,^{1,3} Marinely B. Gomez,^{3,4} Cédric Pennetier,^{3,4} Emmanuel Elanga,^{3,4} Armel Djènontin,^{3,4} Fabrice Chandre,¹ Innocent Djègbé,^{3,4} Hélène Guis,² and Vincent Corbel^{3,4}

¹MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; ²UMR CMAEE, CIRAD, Montpellier, France; ³MIVEGEC (IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2), Institut de Recherche pour le Développement, Cotonou, Benin; and ⁴Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou, Ministère de la Santé, Cotonou, Bénin

Background. Behavioral modification of malaria vectors in response to vector control methods is of great concern. We investigated whether full coverage of long-lasting insecticide-treated mosquito nets (LLINs) may induce a switch in biting behavior in *Anopheles funestus*, a major malaria vector in Africa.

Methods. Human-landing collections were conducted indoor and outdoor in 2 villages (Lokohoué and Tokoli) in Benin before and 1 year and 3 years after implementation of universal LLIN coverage. Proportion of outdoor biting (POB) and median catching times (MCT) were compared. The resistance of *A. funestus* to deltamethrin was monitored using bioassays.

Results. MCT of *A. funestus* switched from 2 AM in Lokohoué and 3 AM in Tokoli to 5 AM after 3 years (Mann–Whitney *U* test, $P < .0001$). In Tokoli, POB increased from 45% to 68.1% (odds ratio = 2.55; 95 confidence interval = 1.72–3.78; $P < .0001$) 1 year after the universal coverage, whereas POB was unchanged in Lokohoué. In Lokohoué, however, the proportion of *A. funestus* that bites after 6 AM was 26%. Bioassays showed no resistance to deltamethrin.

Conclusions. This study provides evidence for a switch in malaria vectors' biting behavior after the implementation of LLIN at universal coverage. These findings might have direct consequences for malaria control in Africa and highlighted the need for alternative strategies for better targeting malaria vectors.

During the past decade, mortality and prevalence of malaria decreased substantially in sub-Saharan Africa [1]. Relying on increased international funding and massive implementation of vector control strategies, malaria elimination is back on the global health agenda [2]. Unfortunately, recent evidences of malaria resurgence have been recorded in several countries, underlying limitations in the efficacy of the long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual sprayings of insecticide (IRSs) [1, 3–5].

These vector control strategies are based on early characterization of the behavioral ecology of the main malaria vectors in Africa, *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* [6]. Both interventions target vectors when they feed and/or rest indoors [7]. However, as described by Fergusson et al [8], there are many ecological reasons for all vectors to not be targeted by an insecticide (eg, insecticide resistance, behavioral avoidance, and vector biodiversity). Implication of pyrethroid resistance in the reduction of LLIN effectiveness [3, 9–11] was recently reported in West Africa, although no clear evidence for an operational vector control failure could be yet demonstrated. Renewed interest recently emerged regarding the behavioral changes of mosquitoes after the implementation of vector control interventions [12]. Indeed, recent evidence suggests that malaria vectors may avoid the contact with the insecticide by either feeding predominantly outdoor or in the early evening

Received 2 March 2012; accepted 21 June 2012; electronically published 10 September 2012.

Correspondence: Vincent Corbel, PhD, IRD/CREC, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Benin (vincent.corbel@ird.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2012;206:1622–9

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jis565

[12–14]. This behavioral modulation may result from the selection of genetically inherited traits or from phenotypic plasticity in response to increased coverage of LLINs and/or indoor residual sprayings. Moreover, Lefèvre et al recently showed phenotypic plasticity in blood-feeding behavior in *A. gambiae* when humans are not readily accessible [15]. The authors showed a strong difference between host-seeking preferences (88% anthropophilic rate observed in an odor-baited entry trap) and the real blood meals analyzed in blood-fed *A. gambiae* s.s. females collected in the same village (half the blood meals were taken on cattle). Scaling up LLIN coverage may also have strong impact on the distribution and diversity of vector species and then on malaria transmission. In Kenya, authors reported a shift in malaria vector species (*A. arabiensis* replaced *A. gambiae* s.s.) after an increase in LLIN ownership [16]. These issues are now in the spotlight and have become a priority in the research agenda, because such behavioral modifications may have severe implications for the success of vector control programs [7].

In the present study, we investigated whether the host-seeking behavior of the major malaria vector *A. funestus* may be modified after the implementation of universal coverage of LLINs. In Benin, *A. gambiae* s.s. populations are strongly resistant to pyrethroid insecticides [10, 17, 18], whereas no pyrethroid resistance was found in *A. funestus* [19]. To avoid any confounding effect of the presence of pyrethroid resistance alleles, cross-sectional surveys were performed in 2 villages

(Lokohouè and Tokoli) where *A. funestus* was found to be predominant and responsible for malaria transmission [19, 20].

METHODS

Study Area

This study was performed in the District Of Ouidah (Figure 1) in southern Benin (on the Atlantic coast). The local climate is coastal-guinean, with 4 seasons including a long dry season (from November through April). Investigations were conducted in Tokoli (6°26'57.1" N, 2°09'36.6" E) and Lokohouè (6°24'24.2" N, 2°10'32.1" E), where *A. funestus* is the main malaria vector [19, 20].

Mosquito Collection

Indoor and outdoor mosquito collections were done at 4 sites per village with use of the human landing catches (HLC) technique (8 collectors per village per night of collection). Sites were distant from 50 meters minimum and were homogeneously distributed in the village (sites situated near eucalyptus trees and smokes, for example, were discarded) [21]. Collectors were hourly rotated along collection sites and/or position (indoor or outdoor). At each position, all mosquitoes caught were kept in individual tubes and in hourly bags. Independent staff supervised rotations and regularly checked quality of the mosquito collections on a randomly selected sample representing 12% of the total night collection.

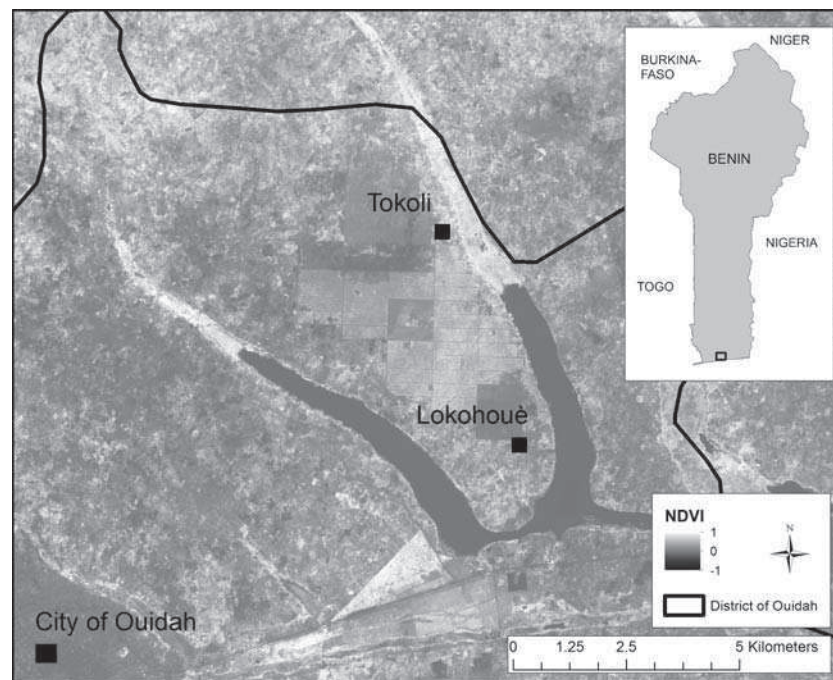


Figure 1. Map of the study area. Normalised difference vegetation index (NDVI) calculated from Satellite Pour l’Observation de la Terre data. CNES (2010), Distribution Spot Image S.A. Freshwater (included Toho Lake) is shown as dark grey. Healthy vegetation is shown as light grey and white.

Study Design

Three rounds of mosquito collection were done in Tokoli and Lokohouè to study the biting behavior of malaria vectors. The study design is summarized in Figure 2.

Round 1 (from October 2007 through May 2008) corresponded to a baseline period of mosquito collection during which LLINs (ie, Permanet 2.0, containing 55 mg/m² deltamethrin; Vestergaard Frandsen) were provided selectively to pregnant women and children aged <6 years by the National Malaria Control Programme.

Round 2 (from November 2008 through June 2009) corresponded to a period of mosquito collection performed 1 year after distribution of LLINs to the entire community (universal coverage) by our team (see [11] for details). Each household was provided with 2 nets.

Rounds 1 and 2 consisted of 5 surveys of 2 consecutive nights (16 human-nights per village per survey) at 6-week intervals. The collection time was 10 PM to 6 AM.

Round 3 (April 2011) corresponded to a period of mosquito collection performed 3 years after universal coverage of LLINs. Mosquito collection was done by conducting 2 surveys on 3 consecutive nights (24 human-nights per village per survey) at 1-week intervals. The collection period was 11 PM to 9 AM.

Identification of Vector Species and Infection Rates

Malaria vectors collected on humans were identified using morphological keys [6, 22]. All mosquitoes belonging to the *funestus* group were kept in individual tubes containing silica gel and were preserved at -20°C in the laboratory. Members of the *funestus* group were identified to species by polymerase chain reaction (PCR) with use of the method describe by Koekemoer et al [23]. Heads and thoraces of *A. funestus* complex were processed for detection of circumsporozoite protein (CSP) of

Plasmodium falciparum sporozoites with use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique [24].

Entomological Indicators

Human biting rates (HBRs) for *A. funestus* were calculated as numbers of bites per human per night. Sporozoite rates (SRs) were the proportions of *A. funestus* found to be positive for CSP antigens. Entomological inoculation rates (EIRs; number of infected bites per human per day) were obtained by multiplying the HBR by SR.

World Health Organization (WHO) Bioassays

Susceptibility of *A. funestus* to deltamethrin was checked on mosquitoes collected in Tokoli and Lokohouè by HLC in January 2010. Mosquitoes were kept in cages and brought back to the Centre de Recherche Entomologique de Cotonou for rearing. Females were fed on rabbit to obtain eggs (F1 progeny), and larvae were maintained in a plastic bowl containing distilled water and dry cat food until adult emergence. Before bioassays were performed, 40 females were randomly selected for identification of sibling species, as described above. The other part was tested for pyrethroid susceptibility with use of the WHO susceptibility tests [25]. Four batches of 25 field-caught, non-blood-fed, 2–5-day-old females were exposed to deltamethrin 0.05%–treated paper for 1 hour. Two batches of 25 mosquitoes were exposed to untreated paper to serve as a control. Insecticide papers were obtained from the WHO reference center at the Vector Control Research Unit, University Sains Malaysia [26]. In the absence of susceptible reference strain of *A. funestus*, the susceptible Kisumu strain of *A. gambiae* (n = 100) was exposed to deltamethrin 0.05%–treated paper for validation. Percentage of knocked-down (KD) mosquitoes was recorded at 60 minutes, after which mosquitoes were held for 24 hours at 27 ± 2°C and 80% ± 10%

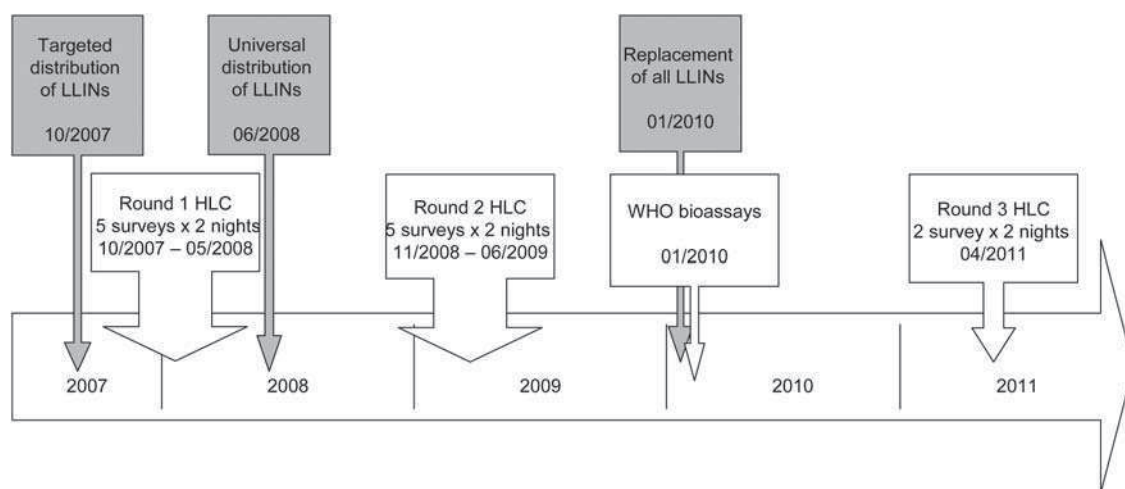


Figure 2. Chronogram presenting long-lasting insecticidal impregnated net (LLIN) distributions and human landing catch (HLC) during the study.

relative humidity. Mortality was recorded 24 hours after exposure.

Statistical Analysis

To compare hourly aggressiveness of *A. funestus* before and after implementation of universal LLIN coverage, a median catching time (MCT) was estimated from field data. MCT represents the time for which 50% of the total malaria vectors were caught on humans. MCTs were compared between rounds of collection (pair-wise comparisons) with use of Mann–Whitney *U* tests. Proportions of outdoor biting mosquitoes (exophagy) were compared between rounds of collection in each village with use of Fisher’s exact tests.

SRs in *A. funestus* were compared between outdoor and indoor biting vectors, between rounds and between villages, with use of Fisher’s exact tests. Odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) were also calculated.

Ethics Statement

The Institut de Recherche pour le Développement Ethics Committee and the National Research Ethics Committee of Benin approved the study (reference number IRB00006860). All necessary permits were obtained for the described field studies. No mosquito collection was done without the approval of the head of the village and the owner and occupants of the collection house. Mosquito collectors gave their written informed consent and were treated free of charge for malaria-presumed illness throughout the study.

RESULTS

Vector Densities and Transmission

During the 3 rounds of HLC collection (ie, 416 human-nights), 1866 members of the *funestus* group and 367 specimens belonging to the *A. gambiae* complex were caught. The 1866 specimens of the *funestus* group processed by PCR for

species identification were *A. funestus*. The HBR for all rounds for *A. funestus* was 4.49 bites per person per night. Minimum (2.1 bites/person/night) and maximum HBRs (18.73 bites/person/night) were found in Lokohouè during rounds 1 and 3, respectively.

Twenty-nine of 1866 *A. funestus* were found to be positive for the presence of *P. falciparum* by CSP-ELISA, corresponding to a prevalence of *P. falciparum* infection of 1.6%. The EIR for all rounds was 0.06 infected bites of *A. funestus* per person per night. Maximum EIR was found in Lokohouè during round 3 (0.25 infected bites/person/night). All data related to *A. funestus* HBR and EIR at each location and for each round of collection are summarized in Table 1.

We were not able to find any statistically significant difference in SR between rounds of collection (Supplementary Table 1). Moreover, we did not find any statistically significant difference when we compared SR between outdoor and indoor biting *A. funestus*, regardless of the round or village considered. The same was true when we compared the proportion of infected mosquitoes before and after 6 AM during round 3.

Biting Behavior

Figure 3 shows the hourly biting aggressiveness of *A. funestus* during each round of collection in Tokoli and Lokohouè. During round 1 (ie, selective coverage of LLIN), the peak of aggressiveness of *A. funestus* was from midnight to 01 AM in Tokoli (Figure 3A). During round 2 (ie, 1 year after implementation of universal coverage of LLIN), we observed 2 peaks of activity in the same village: the first peak was similar to round 1 (from midnight to 1 AM), but the second peak was reported later during the night (from 03 AM to 04 AM) (Figure 3C). The analysis of MCT showed a statistically significant difference between rounds 1 and 2 (Mann–Whitney *U* test, $P = .0028$) (Figure 4A). During round 3 (ie, 3 years after universal coverage of LLIN), only 1 peak of activity was observed from 4 AM to 6 AM (Figure 3E), and the MCT was 5 AM,

Table 1. Aggressiveness and Entomological Inoculation Rates of *Anopheles funestus* Before and After Implementation of Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Impregnated Nets (LLINs)

Location, Period	Time of catch	Month of collection	No. of human-nights	No. bites of <i>A. funestus</i>	HBR	SR (%)	EIR
Tokoli							
Round 1 (Baseline)	10 PM to 6 AM	October to May	80	204	2.55	1.96	0.05
Round 2	10 PM to 6 AM	November to June	80	226	2.83	0.88	0.03
Round 3	11 PM to 9 AM	April	48	152	3.17	3.29	0.10
Lokohouè							
Round 1 (Baseline)	10 PM to 6 AM	October to May	80	168	2.10	2.38	0.05
Round 2	10 PM to 6 AM	November to June	80	217	2.71	0.92	0.03
Round 3	11 PM to 9 AM	April	48	899	18.73	1.34	0.25

Abbreviations: EIR, entomological inoculation rate (number of infected bites/person/night); HBR, human biting rate (number of bites/person/night); SR, sporozoite rate (proportion of vectors positive to CSP antigens).

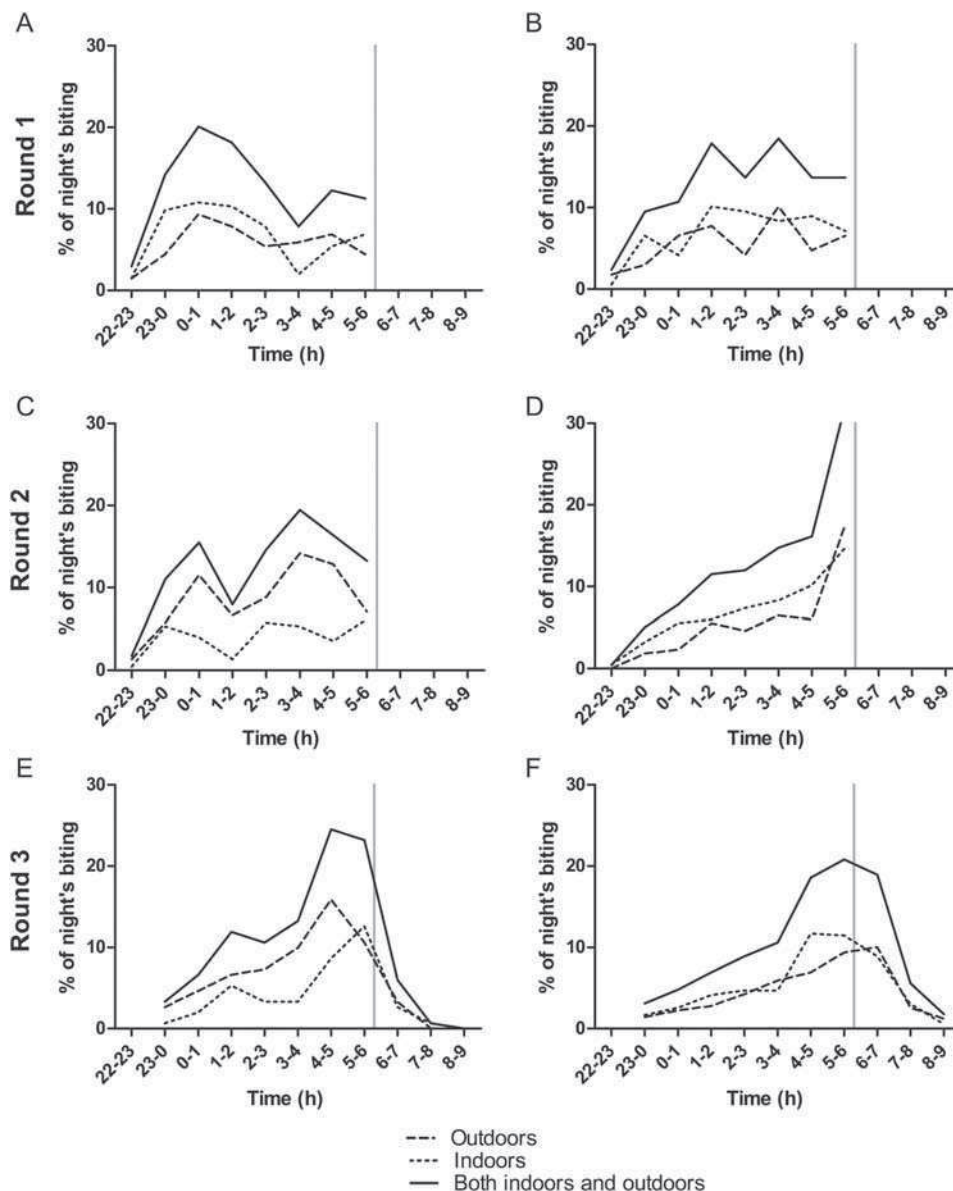


Figure 3. Hourly biting activity of *Anopheles funestus* in Tokoli (A, C, and E) and Lokohouè (B, D, and F) before and after implementation of universal coverage of LLIN. Vertical grey lines indicate morning civil dawn.

later than that recorded during the previous rounds of collection (Mann–Whitney U test, $P = .0039$) (Figure 4A). During 2008–2011, the MCT in *A. funestus* population switched from 2 AM to 5 AM (Mann–Whitney U test, $P < .0001$).

In Lokohouè, we were not able to identify a peak of activity during round 1 (Figure 3B). However, we clearly observed a peak of aggressiveness just before dawn (5–6 AM) during rounds 2 and 3 (Figure 3D and F). The MCT was 3 AM before full coverage of LLIN (Figure 4B), and it shifted to 4 AM and 5 AM during rounds 2 and 3, respectively (Mann–Whitney U test, $P < .0001$).

During round 3, 26.4% of the overall *A. funestus* were caught after 6 AM in Lokohouè, (Table 2), whereas the

proportion of late-biting mosquitos was 6.6% in Tokoli (OR = 5.084; 95% CI, 2.63–9.82; $P < .0001$). The morning civil dawn (ie, the beginning of twilight) was 6:17 AM during round 3 of collection.

With regard to exophagy rates, the proportion of outdoor biting mosquitoes was similar in Tokoli and Lokohouè during round 1 (45.6% and 44.6%, respectively) (Table 3).

In Tokoli, exophagy increased significantly to 68.1% (OR = 2.55; 95% CI, 1.72–3.78; $P < .0001$) and 60.9% (OR = 1.86; 95% CI, 1.21–2.85; $P = .0052$) during rounds 2 and 3, respectively, whereas it remained unchanged in Lokohouè (44.2% at round 2 [$P > .99$] and 46.7% at round 3 [$P = .6737$]).

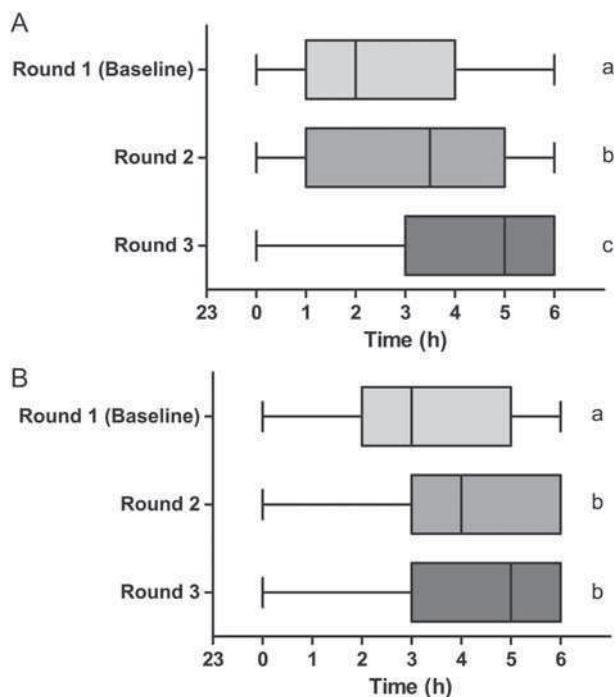


Figure 4. Median catching time of *Anopheles funestus* before and after implementation of universal coverage of long-lasting insecticidal impregnated nets (LLINs) in Tokoli (A) and Lokohouè (B). Boxes indicate 1st-3rd quartile and median hours of biting activity. Whiskers indicate 2.5–97.5 percentiles. Boxes carrying the same letter were not significantly different ($P < .05$) when comparing median catching time using Mann–Whitney U tests. To compare all rounds to each other, only mosquitoes caught from 11 PM to 6 AM were taken into account in the statistical analysis.

Resistance to Insecticides

Bioassays showed that females of *A. funestus* were fully susceptible to deltamethrin (100% mortality). Moreover, mosquitoes were 100% KD after 60 minutes of exposure, suggesting the absence of any KD resistance alleles. One hundred exposed mosquitoes of the susceptible strain Kisumu of *A. gambiae* showed 100% mortality and 100% KD. No mortality was observed in the control tubes (ie, with untreated paper). Of the

Table 2. Rates of *Anopheles funestus* Biting after 6 AM, Three Years After Implementation of Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Impregnated Nets (LLINs)

Location	No. of bites before 6 AM	No. of bites after 6 AM	After 6 AM rate (%)	Odds Ratio	95% CI	P value
Tokoli	142	10	6.6	1		
Lokohouè	662	237	26.4	5.084	2.632–9.820	<.0001

Abbreviations: CI: Confidence interval; Odds-ratio, 95%CI and P value according to a Fisher exact test.

Table 3. Proportion of *Anopheles funestus* biting outdoor before and after implementation of universal coverage of Long-Lasting Insecticidal Impregnated Nets (LLINs)

Location, period	No. of outdoor bites	No. of indoor bites	Rate of exophagy (%)	Odds ratio	95% CI	P value
Tokoli						
Round 1 (Baseline)	93	111	45.6	1		
Round 2	154	72	68.1	2.553	1.724–3.781	<.0001
Round 3	92	59	60.9	1.861	1.214–2.854	.0052
Lokohouè						
Round 1 (Baseline)	75	93	44.6	1		
Round 2	96	121	44.2	0.9838	.6559–1.476	1
Round 3	419	479	46.7	1.071	.7788–1.511	.6737

Abbreviations: CI, confidence interval. Odds ratio, 95% CI, and P value according to Fisher's exact tests.

40 specimens checked by PCR for species identification, all belonged to *A. funestus*.

DISCUSSION

This study reported significant changes in the host-seeking behavior of the *A. funestus* population after scaling up universal coverage of LLINs in southern Benin. Results showed that 3 years after implementation of LLIN at community level, *A. funestus* bit later during the night (almost at dawn) and more frequently outdoors, compared with the baseline survey. Induced exophagy and late-biting behavior were already observed in African malaria vectors after implementation of indoor residual spraying [12, 27]. In Benin, the results of a randomized control trial conducted in 28 villages showed that the prevalence of outdoor biting malaria vectors was higher in villages covered by the combination of LLINs and carbamate IRS, compared with LLINs alone [11]. With regard to *A. funestus*, recent findings showed a shift from indoor to outdoor biting in Tanzania [14] in relation to increasing coverage of pyrethroid-impregnated nets. However, the authors showed a shift of biting time of *A. funestus* to the early evening and not late in the morning as we observed in the present study. To our knowledge, very few studies have reported a peak of aggressiveness of *A. funestus* during the last hour of collection, before dawn [28–30]. One such study [28] was in northern Ghana in the context of nationwide distribution of LLINs, but the relationship between mosquito behavior and vector control method could not be clearly established.

Changes in mosquitoes' feeding behavior can be associated with seasonality [31]. Most cited environmental factors influencing the biting habits of mosquitoes are wind, rain, and temperature [32]. Usually, wind and rain occur simultaneously in

tropical storms and can drastically reduce the number of mosquitoes caught on humans. However, we never conducted mosquito collection when the weather was bad. Moreover, we observed that nocturnal temperatures were not different between rounds of collection or correlated with changes in biting behavior (see in the [Supplementary Table 2 and 3](#)). This suggests that local climatic conditions were unlikely to be responsible for the switch in *A. funestus* biting behavior during the study.

Here, we provide, to our knowledge, the first evidence for a substantial diurnal host-biting behavior of a major malaria vector in Africa. Indeed, during round 3 in Lokohouè, a large proportion of the aggressive fraction of *A. funestus* (26%) was collected after 6 AM. Of note, in both villages during round 1, the proportion of biting of *A. funestus* from 5 AM to 6 AM was >10%, suggesting that a diurnal biting activity was already present before the implementation of LLINs. The dogma that malaria vectors are strictly nocturnal may be not entirely true, especially if they have been exposed to intense selection pressure resulting from the scaling up of residual insecticide for malaria vector control. Moreover, in many studies in which the peaks of aggressiveness of *A. funestus* occurred during the last hours of collection (before dawn) [28, 29, 33], the estimation of malaria transmission might have been under-estimated. Biting preferences of malaria vectors will have to be more frequently investigated after dawn in different ecological settings. The late and outdoor biting behavior of malaria vector is worrying, because in rural Africa, villagers usually wake up before dawn to work in crops, and thus, they are not protected by mosquito nets. This might explain why malaria prevalence or incidence remained high despite the high LLIN coverage in areas where *A. funestus* is the dominant malaria vector [3, 28, 34]. Moreover, *A. funestus* may play an important role in malaria transmission during the dry-hot season [6, 35–37], when LLINs are less likely to be used because of high nocturnal temperatures and low mosquito biting nuisances [20].

Of interest, increases in outdoor biting mosquitoes was observed in Tokoli, where the proportion of vector biting after 6 AM was the lowest. This contrasts with the situation in Lokohouè, where lower exophagy rates but higher late morning biting rates were observed. These findings raise crucial questions about the evolutionary processes involved in mosquito behavior in relation to insecticide treatments. Beyond the dogma of the strict nocturnal biting activity of the African malaria vectors, there is a consensus for a trade-off between the energy gain acquired through the blood meal and the risk caused by the defensive behavior of the host [31, 38]. Recent but massive selection pressure induced by vector control tools may have altered the human-vector interactions. Therefore, of note, one behavior among late biting and outdoor biting predominated in each village suggested that vector control interventions may select for different adaptive responses and probably genetic diversity among vector populations. Clearly,

there is an urgent need to better understand the evolution processes involved in host-seeking in malaria vectors in relation to vector control tools [7, 8].

Insecticide resistance is frequently questioned in vector control failure relying on residual insecticides [10]. The resistance mechanisms that allow mosquitoes to survive despite insecticides might influence behavioral traits. Here, the *A. funestus* population was fully susceptible to deltamethrin, the insecticide used in Permanet 2.0. Thus, modifications of biting behavior observed after full coverage of LLINs cannot be attributed to pleiotropic effects or to the presence of any pyrethroid resistance mechanism. Adaptation of *A. funestus* to LLINs may result from a phenotypic plasticity or from selected behavioral traits. In Senegal and in Burkina Faso [39, 40], chromosomal forms of *A. funestus* were found to be associated with different resting, biting, or host preference behavior. We assume that, in southern Benin, a genetically distinct form of *A. funestus* might be selected by vector control interventions. Further investigations in cytogenetic, population genetics and mosquito behavior are, however, required to confirm this trend.

In conclusion, we found evidence for a modulation of *A. funestus* biting behavior after implementation of full coverage of LLINs at the community level. Vectors biting outdoor and/or at dawn when persons are not protected by a residual insecticide (LLIN or IRS) is worrying for malaria prevention in Africa. These findings highlighted the need for new vector control strategies to better interrupt outdoor and diurnal malaria transmission.

PERMISSION

We provide written permission for all personal communications.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org/>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank populations of Tokoli and Lokohouè, for their kind support and collaboration; field and laboratory staff, for their strong commitment to this project; and the French Ministry of Foreign Affairs through the SCAC programme, IRD, and Mr François Lacoste, for their financial support.

Financial support. This work was supported by the French Ministry of Foreign Affairs and the Institut de Recherche pour le Développement (FSP project REFS N°2006-22) and International Voluntary fellowship and François Lacoste fellowship (to NM).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. World Health Organization. World Malaria Report: 2011. Geneva: World Health Organization, **2011**: 259.
2. Feachem R, Sabot O. A new global malaria eradication strategy. *The Lancet* **2008**; 371:1633–5.
3. Trape JF, Tall A, Diagne N, et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:925–32.
4. Kleinschmidt I, Schwabe C, Shiva M, et al. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 81:519–24.
5. Protopopoff N, Verhaeghen K, Van Bortel W, et al. A significant increase in *kdr* in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands. *Trop Med Int Health* **2008**; 13:1479–87.
6. Gillies M, De Meillon B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Publication of the South Afr Inst Med Res **1968**; 54:343.
7. The malERA Consultative Group on Vector Control. A Research Agenda for Malaria Eradication: Vector Control. *PLoS Med* **2011**; 8: e1000401.
8. Ferguson HM, Dornhaus A, Beeche A, et al. Ecology: a prerequisite for malaria elimination and eradication. *PLoS Med* **2010**; 7:e1000303.
9. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* **2000**; 14:181–9.
10. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:199–206.
11. Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, et al. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: a cluster randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2012**; 12:617–26.
12. Pates H, Curtis C. Mosquito behavior and vector control. *Annu Rev Entomol* **2005**; 50:53–70.
13. Geissbuhler Y, Chaki P, Emidi B, et al. Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J* **2007**; 6:126.
14. Russell TL, Govella NJ, Azizi S, Drakeley CJ, Kachur SP, Killeen GF. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar J* **2011**; 10:80.
15. Lefevre T, Gouagna LC, Dabire KR, et al. Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* s.s. when humans are not readily accessible. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 81:1023–9.
16. Bayoh MN, Mathias DK, Odiere MR, et al. *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. *Malar J* **2010**; 9:62.
17. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* **2007**; 101:207–16.
18. Djogbenou L, Pasteur N, Akogbeto M, Weill M, Chandre F. Insecticide resistance in the *Anopheles gambiae* complex in Benin: a nationwide survey. *Med Vet Entomol* **2010**; 25:256–67.
19. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* **2010**; 3:83.
20. Moiroux N, Boussari O, Djènontin A, et al. Dry Season Determinants of Malaria Disease and Net Use in Benin, West Africa. *PLoS One* **2012**; 7:e30558.
21. Coffinet T, Rogier C, Pages F. Evaluation of the anopheline mosquito aggressivity and of malaria transmission risk: methods used in French Army. *Med Trop (Mars)* **2009**; 69:109–22.
22. Gillies M, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Johannesburg, South Africa: South African Institute for Medical Research, **1987**.
23. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* **2002**; 66:804–11.
24. Wirtz RA, Zavala F, Charoenvit Y, et al. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bull World Health Organ* **1987**; 65:39–45.
25. World Health Organization. Report of the WHO Informal Consultation Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Geneva: World Health Organization: Parasitic Diseases and Vector Control (PVC)/Communicable Disease Control, Prevention and Eradication (CPE), **1998**:43.
26. World Health Organization. Supplies for monitoring insecticide resistance in disease vectors. Geneva: World Health Organization: Parasitic Diseases and Vector Control (PVC)/Communicable Disease Control, Prevention and Eradication (CPE), **2001**:16.
27. Takken W. Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors? *Tropical Medicine & International Health* **2002**; 7:1022–30.
28. Appawu M, Owusu-Agyei S, Dadzie S, et al. Malaria transmission dynamics at a site in northern Ghana proposed for testing malaria vaccines. *Trop Med Int Health* **2004**; 9:164–70.
29. Githeko AK, Adungo NI, Karanja DM, et al. Some observations on the biting behavior of *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* and their implications for malaria control. *Exp Parasitol* **1996**; 82:306–15.
30. Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Toto JC, et al. High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *J Med Entomol* **2002**; 39:350–5.
31. Silver JB. Blood-feeding and its Epidemiological Significance. *Mosquito Ecology* 3rd ed. Dordrecht: Springer, **2008**: 677–769.
32. Silver JB. Sampling Adults by Animal Bait Catches and by Animal-Baited Traps. *Mosquito Ecology* 3rd ed. Dordrecht: Springer, **2008**: 493–675.
33. Killeen GF, Kihonda J, Lyimo E, et al. Quantifying behavioural interactions between humans and mosquitoes: evaluating the protective efficacy of insecticidal nets against malaria transmission in rural Tanzania. *BMC Infect Dis* **2006**; 6:161.
34. Koram KA, Owusu-Agyei S, Fryauff DJ, et al. Seasonal profiles of malaria infection, anaemia, and bednet use among age groups and communities in northern Ghana. *Trop Med Int Health* **2003**; 8:793–802.
35. Fontenille D, Lochouarn L, Diagne N, et al. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* **1997**; 56:247–53.
36. Fontenille D, Lochouarn L, Diatta M, et al. Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1997**; 91:647–52.
37. Kelly-Hope LA, McKenzie FE. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J* **2009**; 8:19.
38. Kelly DW. Why are some people bitten more than others? *Trends Parasitol* **2001**; 17:578–81.
39. Lochouarn L, Dia I, Boccolini D, Coluzzi M, Fontenille D. Bionomical and cytogenetic heterogeneities of *Anopheles funestus* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1998**; 92:607–12.
40. Costantini C, Sagnon N, Ilboudo-Sanogo E, Coluzzi M, Boccolini D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia* **1999**; 41:595–611.

Résumé

L'accroissement des résistances aux insecticides chez les anophèles vecteurs de *Plasmodium* sont mises en cause dans la baisse d'efficacité des principales stratégies de lutte antivectorielle (LAV) en Afrique. Des techniques de combinaisons d'insecticides, évaluées au Bénin, n'ont pas été plus efficaces pour réduire la morbidité palustre et limiter l'extension des résistances que la stratégie préconisée par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (moustiquaires imprégnée seules). Dans cette thèse, nous avons cherché à identifier les facteurs opérationnels, biologiques et environnementaux pouvant expliquer cet échec. Nous avons modélisé le risque d'exposition de l'homme aux piqûres de vecteurs en fonction de variables environnementales afin (i) d'identifier les déterminants de la présence et de la densité des vecteurs et (ii) d'analyser l'impact des méthodes de LAV. Nos résultats ont montré à l'échelle des villages une forte hétérogénéité spatio-temporelle de la population vectorielle, caractérisée par des niches écologiques et comportementales différentes qui ont pu moduler l'efficacité de la LAV. Nous avons mis en évidence le rôle vectoriel majeur de *An. funestus* qui assurait la transmission en saison sèche tandis que le taux d'utilisation des moustiquaires diminuait en raison des fortes températures et de la baisse de nuisance culicidienne. De plus, nous avons observé des modifications comportementales chez les vecteurs suite à la mise en place de méthodes de LAV. Nous faisons donc des propositions pour l'amélioration des méthodes actuelles de LAV, pour définir les caractéristiques des futures méthodes et pour mieux choisir les méthodes à implémenter en fonction du faciès entomologique.

Mots clés : paludisme ; modélisation ; lutte anti-vectorielle ; anophèles ; télédétection ; bio-écologie.

Summary

Insecticide resistance in malaria vector has increased in Africa. Implications for the effectiveness of the most widely implemented vector control (VC) techniques are questioned. To manage resistance, two VC strategies combining two different insecticides were evaluated during a randomised controlled trial in Benin. These strategies did not show a better efficacy than the baseline intervention recommended by the National Malaria Control Program (insecticidal nets alone). The aim of this thesis was to identify operational, biological and environmental factors that could explain this failure. We modelled the risk of exposure to malaria vectors according to environmental factors to (i) identify the determinants of the vectors' presence and density and to (ii) analyse the impact of VC strategies. Our results showed high spatial-temporal heterogeneities of vector populations at the village scale. The vector populations were characterized by different ecological and behavioural niches which could have impacted the effectiveness of VC. We highlighted the importance of *An. funestus* in malaria transmission during the dry season when people are less likely to use nets because of hot temperatures and low mosquito biting nuisances. We also observed changes in vectors biting behaviour following the implementation of VC. We therefore provide suggestions to improve actual VC tools, to define characteristics of new tools and to better select tools to implement in the field according to the entomological facies.

Keywords: malaria ; modelling ; vector control ; anopheles ; remote sensing ; bio-ecology.