THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (UM) ET DE L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI (UAC)

En Science de la vie – Entomologie Médicale et Vétérinaire

Écoles doctorales CBS²/UM et Sciences de la vie et de la terre/UAC

Impact entomologique de stratégies complémentaires de lutte intégrée contre le paludisme dans un contexte de résistance des vecteurs aux insecticides au Nord de la Côte d'Ivoire

Présentée par Mahugnon Barnabas ZOGO
Le 13 décembre 2019

Sous la direction de Dr Cédric PENNETIER
et Pr Lamine BABA-MOUSSA

Devant le jury composé de

M Seth IRISH, PMI Entomology Team Lead, CDC, Atlanta, USA	Rapporteur
M Raphaël N'GUESSAN, Assistant Professor, LSHTM, London, UK	Rapporteur
M Pierrick LABBE, Professeur, ISEM, Montpellier, France	Examinateur
Mme Christine OUINSAVI, Professeur, UP, Parakou, Bénin	Examinateur
Mme Alphonsine KOFFI, Maître de recherche, IPR, Bouaké, Côte d'Ivoire	Invitée
M Vincent CORBEL, Directeur de recherche, IRD, Montpellier, France	Invité
M Cédric PENNETIER, Chargé de recherche, IRD, Montpellier, France	Directeur de thèse
M Lamine BABA-MOUSSA, Professeur, UAC, Cotonou, Bénin	Co-Directeur de thèse

Remerciements

J’exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à mes directeurs de thèse Dr Cédric Pennetier et Pr Baba Moussa Lamine pour m’avoir encadré pendant ces trois années. Merci Dr Cédric pour m’avoir permis d’apprendre à vos côtés et pour m’avoir accompagné à chaque étape de ce travail. Merci Pr Lamine pour votre indéfectible disponibilité et vos soutiens sans lesquels cette thèse en cotutelle ne serait pas possible. Dr Cédric et Pr Lamine, merci pour vos valeurs personnelles qui font de vous des encadrants que tout thésard rêve d’avoir.

J’adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d’évaluer ma thèse : Drs Alphonsine Koffi, Vincent Corbel, Seth Irish, Raphaël N’guessan et Professeurs Pierrick Labbé, Christine Ouinsavi. Dr Alphonsine Koffi, merci de m’avoir accueilli dans votre laboratoire et de me donner tout ce dont j’ai besoin pour mener à bien mes travaux de recherche. Merci Dr Vincent Corbel de m’avoir ouvert les portes de l’IRD à Cotonou et de m’avoir initié au monde passionnant de l’entomologie médicale. Drs Raphaël N’guessan, Seth Irish et Professeurs Pierrick Labbé, Christine Ouinsavi, c’est un grand honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

J’ai eu la chance de faire cette thèse dans un grand projet dans lequel sont impliquées de nombreuses personnes qui ont énormément contribué à ce travail. Je tiens donc à remercier l’équipe de REACT : Nicolas Moiroux, Florence Fournet, Assi Serges, Rock Dabiré, Félix Zounménou, Ludovic Alou, Anna Cohuet, Aboubacar Koné, Awa Soro, Soromane Camara, Margaux Mulatier, Baba Coulibaly, N’cho Bertin Tchiekoi, Dieudonné Soma, Amal Dahounto, Akoliba Patrice Azaibou, Laurent Niamien, Youssouf Dosso, Serges Koffi, Koffi Guillaume Konan, Rosine Wolie. Je me permets de remercier particulièrement Drs Nicolas et Florence pour m’avoir transmis leur connaissance et leur passion, j’ai beaucoup appris de vous. Un grand merci aussi à Mr Aboubacar pour sa disponibilité permanente.

Un grand merci à la population et les autorités administratives et sanitaires de Korhogo pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Merci à l’IRD et à Dr Frédéric Simard pour m’avoir permis de bénéficier de la bourse ARTS.

Drs Fabrice Chandre, Sylvie Cornellie, Franck Remoué, merci pour vos soutiens, encouragements et conseils.

Je tiens à remercier le personnel de l'IPR : Dr Kaba, Sylla, Bamoro, Cynthia, Innocent, Arsène et le personnel du Vectopôle : Marie, Bethsabée, Carolle qui ont participé d'une manière ou d'une autre à ce travail.

Merci aux amis de l'IRD à Montpellier : Serges, Amadou, Ghislain, Michelle, Michaelle, Dachel, Edwige, Constant, Claire, Cheick et les autres pour tous ces agréables moments passés ensemble.

Je remercie l'équipe du CREC et de l'IEMTV avec qui j'ai passé beaucoup années avant de commencer cette thèse : Pr Martin Akogbéto, Pr Armel Djènontin, Dr Razack Ossè, Dr Gil Padonou, Aziz Bouraima, Christophe Souarès, Oriane Aicheou, Daleb Abdoulaye, Sébastien Koudénoukpo.

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

Mes sincères remerciements à ma tendre femme Irène Fatognon. Tu m'as été d'un grand soutien surtout dans les moments d'incertitude. Merci pour les sacrifices. Ce travail est le tien, ma chérie. The best is yet to come !!!

Merci à ma fille Lirane Zogo qui ne m'a toujours pas eu à ses côtés à cause de ce travail. Merci de t'être contentée des appels « whatsApp ».

Merci à mes parents Zogo Louïs et Hinnoude Marie. Vous êtes les meilleurs parents qu'un enfant puisse avoir. Merci pour vos prières, vos mots d'encouragement et vos sacrifices depuis mon enfance à ce jour.

Je remercie ma famille et ma belle famille : Sylas, Eunice, Philémon, Valentine, ma belle mère, Irisse, Rémi, Patrick, Yolande, Fausta, Juste, Eudes, Lucien, Patrick, Arnaud, Eskil, Dieudonné, Daniel, Alfred, Quentin, Constatin, Gabin, Phillipe, Abdias, Annick, Alex tous mes neveux et nièces pour leurs soutiens.

Un grand merci à mes amis Achille, Assirius, Emile, Nausica de vous être toujours sentis concernés de l'état d'avancement de ma thèse.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cité et qui m'ont aidé durant ces trois années.

Table des matières

Résumé 9

Abstract 10

Liste des figures 11

Liste des tableaux 12

Liste des abréviations 12

Introduction 15

Chapitre 1. Revue bibliographique 21

1.1 Situation actuelle du paludisme dans le monde 21

1.2 Les parasites et les vecteurs responsables du paludisme 21

1.2.1 Les parasites 21

1.2.2 Les vecteurs 23

1.2.3 Le cycle de vie des *Plasmodium spp.* parasites de l'homme 28

1.3 Les indicateurs de la transmission 30

1.4 Les principales méthodes de lutte utilisées contre les vecteurs 31

1.4.1 Les moustiquaires imprégnées d'insecticides 31

1.4.2 Les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent 33

1.4.3 La lutte anti-larvaire 34

1.5 Les insecticides utilisés en santé publique 34

1.5.1 Les organochlorés 35

1.5.2 Les pyréthrinoïdes 36

1.5.3 Les organophosphorés 36

1.5.4 Les carbamates 37

1.5.5 Les régulateurs de croissance 37

1.5.6 Les pyrroles 37

1.5.7 Les néonicotinoïdes 38

1.5.8 Les toxines bactériennes 38

1.6 Les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides 39

1.6.1 Modifications de la cible 40

1.6.2 La résistance métabolique 40

1.6.3 La résistance comportementale 41

1.6.2 La résistance cuticulaire 41

1.7 Les stratégies de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides 41

1.8 Problématique 42

Chapitre 2. Matériel et méthodes 44

2.1 Description de la zone d'étude 44

2.1.1 Situation géographique et climatique 44

2.1.2 Hydrographie 44

2.1.3 Activités économiques 44

2.2 Méthodologie 45

2.2.1 Étude en conditions semi-naturelles de l'efficacité résiduelle d'une nouvelle formulation de larvicide à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* contre le vecteur majeur des *Plasmodium spp.* en Afrique, *Anopheles gambiae s.s.* (Chapitre 3)..... 45

2.2.2 Étude des espèces vectrices, des mécanismes de résistance aux insecticides et de l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires (Chapitre 4) 49

2.2.3 Identification et caractérisation des gîtes larvaires d'*Anopheles spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires (Chapitre 5) 52

2.2.4 Impact des combinaisons d'interventions (MILDA + IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL) sur la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo (Chapitre 6) 55

Chapitre 3. Étude en conditions semi-naturelles de l'efficacité résiduelle d'une nouvelle formulation de larvicide à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* contre le vecteur majeur des *Plasmodium spp.* en Afrique, *Anopheles gambiae s.s.* 64

Chapitre 4. Étude des espèces vectrices, des mécanismes de résistance aux insecticides et de l'intensité de la transmission de *Plasmodium falciparum* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires..... 76

Chapitre 5. Identification et caractérisation des gîtes larvaires d'*Anopheles spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires 89

Chapitre 6. Impact des combinaisons d'interventions (MILDA + IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL) sur la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo..... 101

6.1 Introduction 101

6.2 Résultats 102

6.2.1 Contrôle de la qualité de la stratégie renforcée IEC..... 102

6.2.2 Contrôle de la qualité des pulvérisations intradomiciliaires 102

6.2.3 Contrôle de la qualité des traitements anti-larvaires 103

6.2.4 Impact des combinaisons sur la densité des vecteurs 103

6.2.5 Impact des combinaisons sur l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique (TIE) 106

6.3. Conclusion 108

Chapitre 7. Discussion 109

7.1 Limites de l'efficacité des biolarvicides (*Bti* et *Bs*) contre les larves d'*Anopheles gambiae s.s.* en conditions semi-naturelles 110

7.1.1 Facteurs biologiques 110

7.1.2 Facteurs environnementaux 111

7.2 Défis de la lutte antivectorielle au Nord de la Côte d'Ivoire 111

7.2.1 Multiplicité d'espèces vectrices 111

7.2.2 Comportements de piqûre des vecteurs 112

7.2.3 Forte intensité de la transmission 113

7.2.4 Les mécanismes de résistance aux insecticides 114

7.2.5 Les rizières 115

7.3 Bénéfices et limites des combinaisons évaluées 116

7.3.1 La combinaison MILDA + IEC 116

7.3.2 La combinaison MILDA + PID 119

7.3.3 La combinaison MILDA + LAL 121

7.4 Les limites de l'étude 123

7.5 Stratégies complémentaires potentielles pour une lutte antivectorielle plus efficace dans l'avenir 124

Conclusion générale 126

Références 128

Annexes 149

Résumé

L'expansion de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes et le ralentissement des progrès obtenus récemment dans la lutte contre le paludisme en Afrique mettent en exergue le besoin urgent de déployer des stratégies complémentaires aux moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) pour accélérer la réduction du poids de la maladie. Les stratégies telles que le renforcement de l'Information, l'Education et la Communication (IEC), les pulvérisations intradomiciliaires (PID) et la lutte anti-larvaire (LAL) à base du *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) sont disponibles mais le réel bénéfice de leur utilisation en combinaison aux MILDA reste à démontrer. L'objectif principal du présent travail a été de mesurer l'impact additionnel de ces trois stratégies sur la transmission des *Plasmodium spp*. à travers un essai contrôlé randomisé mené dans 28 villages du district sanitaire de Korhogo, au Nord de la Côte d'Ivoire, une zone de résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes. En amont du déploiement de ces interventions, mon travail de thèse a d'abord permis 1) l'étude de l'efficacité d'une nouvelle formulation de larvicide en conditions semi-contrôlées ; 2) l'étude de la bionomie des anophèles vecteurs, des mécanismes de résistance aux insecticides et de la transmission des *Plasmodium spp.* et 3) l'identification et la caractérisation des gîtes larvaires d'anophèles dans la zone d'étude. Le suivi post-intervention a permis de montrer 1) une réduction de la densité agressive des vecteurs (69%) cinq mois après le démarrage de la stratégie IEC, de l'indice sporozoïtique (84%) et du taux d'inoculation entomologique (TIE) (86%) dans le bras MILDA + IEC par rapport au bras MILDA seules ; 2) une réduction de la densité agressive des vecteurs deux mois (71%) et quatre mois (69%) après la mise en place de la PID puis du TIE (61%) dans le bras MILDA + PID par rapport au bras MILDA seules ; 3) une réduction de la densité agressive des vecteurs (95%) trois mois après le démarrage de la LAL et du TIE (88%) dans le bras MILDA + LAL par rapport au bras MILDA seules. Ces résultats montrent que les stratégies IEC, PID et LAL sont des stratégies complémentaires efficaces pour réduire l'intensité de la transmission à Korhogo. L'analyse des données épidémiologiques de l'essai permettra de mieux apprécier le bénéfice additionnel de ces stratégies sur le poids du paludisme.

Mots clés : paludisme, lutte antivectorielle, évaluation, stratégies complémentaires, Côte d'Ivoire

Abstract

The spread of pyrethroid resistance in malaria vectors and the stalling of recent progress in malaria control in Africa highlight the urgent need to deploy complementary strategies to long-lasting insecticidal nets (LLINs) to accelerate the reduction in the disease burden. Strategies such as strengthened Information, Education and Communication (IEC), Indoor Residual Spraying (IRS) and larviciding with *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) are available but the actual benefit of their use in combination with LLINs remains to be demonstrated. The main objective of this work was to measure the additional impact of these three strategies on malaria transmission through a randomized controlled trial run in 28 villages in the health district of Korhogo, northern Côte d'Ivoire, an area of vector resistance to pyrethroids. Prior to the deployment of these strategies, my work allowed us to 1) assess the efficacy of a new larvicide formulation under semi−field conditions; 2) study vector bionomics, insecticide resistance mechanisms and malaria transmission; 3) identify and characterize *Anopheles spp.* breeding habitats in the study area. Data from post-intervention surveys showed 1) a reduction of vector density (69%) five months after the beginning of the IEC strategy, of the sporozoïte rate (84%) and of entomological inoculation rate (EIR) (86%) in the LLIN+IEC arm relative to the LLIN alone arm; 2) a reduction of vector density at months two (71%) and four post-IRS (69%) and of EIR (61%) in the LLIN+IRS arm relative to the LLIN alone arm; 3) a reduction of vector density (95%) three months after the beginning of larviciding intervention and of EIR (88%) in the LLIN + larviciding arm relative to the LLIN alone arm. These results provide evidence that IEC, IRS and larviciding are effective complementary strategies to reduce transmission intensity in Korhogo. Analysis of epidemiological data collected during the trial will allow a better understanding of the additional benefit of these strategies on the malaria burden.

Keywords: malaria, vector control, evaluation, complementary strategies, Côte d'Ivoire

Liste des figures

Figure 1 : Distribution géographique de l'incidence des cas de paludisme dus à *P. falciparum* et de la mortalité associée en 2017 dans le monde 23

Figure 2 : Cartographie prédictive de la présence des principales espèces vectrices de *Plasmodium spp.* en Afrique 24

Figure 3 : Les principales phases du cycle biologique des femelles d'anophèles 28

Figure 4 : Cycle de développement des *Plasmodium spp.* 29

Figure 5 : Cibles biochimiques des insecticides chimiques de synthèse 35

Figure 6 : Les principales classes d'insecticides utilisées en PID par les programmes nationaux de 2010 à 2017 37

Figure 7 : *Bacillus thuringiensis israelensis* en phase de sporulation (A) et cristal du *Bti* montrant les quatre principales toxines (B). Sp, spore ; E, exosporium ; PB, parasporal body 39

Figure 8 : Mécanismes impliqués dans la résistance physiologique aux insecticides 39

Figure 9 : Dispositif expérimental, Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire. 47

Figure 10 : Un superviseur et un capteur au cours d'une enquête 50

Figure 11 : Un technicien collectant les larves au cours d'une enquête 53

Figure 12 : Une femme d'un village de l'étude recevant des MILDA PermaNet®2.0 au cours de la campagne de distribution 57

Figure 13 : Un relais communautaire au cours d'une séance de causeries de groupe 58

Figure 14 : Un opérateur traitant un mur 59

Figure 15 : Un technicien traitant un gîte 60

Figure 16 : Chronogramme des activités de collecte de données et de mise en place des interventions 63

Figure 17 : Concentration de pirimiphos-méthyl (médianes avec intervalle de confiance 95% ; moyennes en rouge) sur les papiers filtres posés sur les murs en ciment et en terre de barre. 103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition géographique des espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme 22

Tableau 2 : Nombre de villages randomisé par bras 56

Tableau 3 : Densité agressive des vecteurs en fonction des bras au cours des quatre enquêtes post-interventions 105

Tableau 4 : L'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique en fonction des bras. 107

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIP : Association Ivoirienne pour le Progrès

ASC : Agent de santé communautaire

ATP : Adénosine triphosphate

Bs : *Bacillus sphaericus*

Bti : *Bacillus thuringiensis var. israelensis*

CDC : Center for Disease Control

CSH : Capture sur sujet humain

CTA : Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine

DDT : Dichlorodiphenyltrichloroethane

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GPS : Geographical Positioning System

GST : Glutathion-S-transférases

HRP2 : Histidine Rich Protein 2

IC : Intervalle de confiance

IEC : Information, éducation et communication

IPR : Institut Pierre Richet

KD : Knock-Down

LAL : Lutte anti-larvaire

LAV : Lutte antivectorielle

MII : Moustiquaires imprégnées d'insecticides

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

OAA : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture

ODK : Open Data Kit

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONG : Organisation non gouvernementale

PBO : Pyperonyl butoxide

PCR : Polymerase Chain Reaction

PID : Pulvérisation intradomiciliaire d'insecticide

PMI : President's Malaria Initiative

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

RC : Rapport de cote

SIG : Système d' Information Géographique

SPLAT : Specialized Pheromone & Lure Application Technology

TIE : Taux d'inoculation entomologique

TII : Technique de l'Insecte Incompatible

TPIp : Traitement préventif intermittent pendant la grossesse

UV : Ultraviolet

WHO : World Health Organization

WHOPES : World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme

Introduction

Plus de 85% des espèces animales de la planète appartiennent à l'embranchement des arthropodes qui comprend plus de 1,3 million d'espèces d'insectes décrites. Parmi ces dernières, plusieurs rendent d'énormes services à l'homme et à l'environnement. Certains insectes jouent un rôle capital dans la reproduction végétale par la pollinisation, d'autres sont à l'origine des produits de valeur tels que le miel, la soie, etc (Duvallet *et al*. 2017). De plus, selon l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (OAA, plus connue sous son sigle anglais FAO), environ 1900 espèces d'insectes sont consommées par plus de 2 milliards de personnes dans le monde (FAO 2013). Malheureusement, certains insectes représentent des dangers potentiels pour l'homme par les ravages qu'ils causent sur les plantations ou par le poids des maladies animales ou humaines dont ils assurent la transmission. Au niveau mondial, les maladies à vecteur représentent 17% des maladies infectieuses et causent plus de 700 000 décès par an (WHO 2018a). Ces maladies à vecteurs, quoique présentes dans toutes les régions du monde, concernent particulièrement les zones tropicales qui demeurent les plus durement touchées.

Le paludisme est la maladie à vecteur la plus meurtrière et la parasitose la plus répandue dans le monde (WHO 2018a). Il est dû à un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre d'une femelle de moustique du genre *Anopheles*. Plus de 70 espèces d'anophèles, dont une trentaine en Afrique sub-saharienne, sont décrites comme vectrices de *Plasmodium* (Sinka *et al*. 2012). Les cinq espèces de *Plasmodium* pathogènes pour l'homme sont : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* (WHO 2018a). Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 219 millions de cas de paludisme et 435 000 décès ont été recensés dans le monde en 2017 (WHO 2018a). L'Afrique sub-saharienne compte pour une part importante et disproportionnée de la charge mondiale, avec 92% de cas et 93% de décès. En Côte d'Ivoire, le nombre de cas de paludisme a été estimé à 3 373 486 et le nombre de décès associé à 9 579 en 2017 (WHO 2018a). Dans ce pays, comme dans la plupart des pays endémiques, les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes sont les plus vulnérables et sont donc plus susceptibles de développer un paludisme grave (PNLP 2014).

L'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* est disproportionnellement élevée en Afrique sub-saharienne notamment à cause des principales espèces vectrices locales : *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* et *An. funestus*. Ces espèces ont en effet une capacité

vectorielle très élevée car elles ont une longue durée de vie et une forte anthropophilie (Mouchet *et al*. 2004). Cependant la lutte antivectorielle basée notamment sur le déploiement massif des moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) a connu un succès sans précédent en Afrique sub-saharienne au début du XXIe siècle. Selon les estimations d'une étude récente, les MILDA ont permis de sauver environ 7 millions de personnes en Afrique entre 2000 et 2015, soit en moyenne 1200 par jour (Bhatt *et al*. 2015a). Elles constituent un moyen de lutte particulièrement efficace contre le paludisme en Afrique sub-saharienne car elles exploitent les comportements des vecteurs majeurs présents que sont : l'endophagie et l'activité de piqûres nocturne. De plus, elles offrent une protection communautaire indirecte en réduisant la densité des vecteurs (Darriet *et al*. 1984). Selon l'OMS, près d'un milliard de MILDA ont été distribuées en Afrique sub-saharienne depuis 2000 et la proportion de la population dormant sous MILDA a augmenté de 2% à 53% entre 2000 et 2015 (WHO 2015).

Jusqu'en 2017, les pyréthrinoïdes étaient les seuls insecticides recommandés par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires (Zaim *et al*. 2000). Malheureusement, sous la pression d'une sélection importante, l'aire de distribution et l'intensité de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes ont considérablement augmenté ces dernières années dans presque tous les pays de l'Afrique sub-saharienne (WHO 2017). Les enquêtes réalisées en Côte d'Ivoire entre 2013 et 2015 ont révélé que les populations d'*An. gambiae s.l.*, le vecteur majeur dans le pays, collectées dans presque toutes les zones investiguées, sont résistantes aux pyréthrinoïdes (Koffi *et al*. 2013; Camara *et al*. 2018b; Zoh *et al*. 2018). Des études sur l'intensité de la résistance dans des zones du pays ont également rapporté des niveaux de résistance très élevés (jusqu'à >1000) (Edi *et al*. 2012; Glunt *et al*. 2018). L'impact de la résistance des vecteurs aux pyréthrinoïdes sur l'efficacité des MILDA n'est pas clairement établi pour plusieurs raisons. D'une part, on ignore à quel point les tests de sensibilité, réalisés sur des moustiques dont l'état physiologique (âge), le temps de contact avec l'insecticide et les conditions climatiques (température, humidité) sont contrôlés, se rapportent à l'efficacité de l'insecticide sur le terrain (Glunt *et al*. 2013; Viana *et al*. 2016; WHO 2016). D'autre part, il n'est pas possible de randomiser la résistance (Kleinschmidt *et al*. 2015). Toutefois, des études en conditions semi-naturelles et des modèles mathématiques ont montré que la résistance des vecteurs diminuerait l'efficacité de l'outil (N'Guessan *et al*. 2007b; Churcher *et al*. 2016). Récemment, un essai contrôlé randomisé a fortement mis en évidence cet impact négatif en rapportant que les moustiquaires bi-imprégnées de pyréthrinoïdes et d'un synergiste (pyperonyl butoxide, PBO)

étaient plus efficaces que les MILDA conventionnelles dans une zone de résistance aux pyréthrinoïdes en Tanzanie (Protopopoff *et al*. 2018). Il est donc urgent de trouver des solutions alternatives ou complémentaires aux MILDA afin de prévenir une perte totale d'efficacité de la lutte antivectorielle due à la résistance des vecteurs, ce qui pourrait entrainer un rebond de la maladie et de la mortalité. Les dernières données publiées par l'OMS mettent d'ailleurs en exergue la fragilité des progrès obtenus en montrant une stagnation de l'incidence des cas et de la mortalité associée entre 2015 à 2017. Ces données ont également révélé que 12 pays endémiques ont enregistré une augmentation du nombre de cas entre 2015et 2017 (WHO 2018a).

Pour maintenir l'efficacité de la lutte antivectorielle (LAV), des outils complémentaires aux MILDA comme l'Information, l'Education et la Communication (IEC), la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide (PID) et la lutte anti-larvaire (LAL) à base d'insecticides d'origine bactérienne sont à la disposition des programmes nationaux de lutte contre le paludisme (PNLP) des pays de l'Afrique sub-saharienne dont la Côte d'Ivoire. Toutefois, il est primordial que le déploiement des stratégies complémentaires soit soutenu par des données fiables montrant leur efficacité additionnelle. Or, pour le moment, le réel bénéfice de l'utilisation de chacune des trois stratégies en combinaison avec les MILDA reste à démontrer ou n'a pas été validé partout où elles ont été évaluées.

L'IEC est une composante importante de l'action des programmes nationaux de lutte contre le paludisme de plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne dont la Côte d'Ivoire. Cette stratégie vise à optimiser la mise en place des MILDA, l'adhésion des populations aux campagnes de lutte et l'observance (i.e. l'utilisation correcte et régulière des MILDA). Sa place dans les programmes de lutte contre le paludisme dans le contexte actuel se justifie par le fait qu'il existe suffisamment de preuves que l'utilisation de MILDA continue d'offrir une protection contre le paludisme, comparativement à sa non utilisation (Chinwe *et al.* 2018; Kleinschmidt *et al*. 2018). Or, malgré l'augmentation de la couverture en MILDA observée ces dernières années, le taux d'utilisation des MILDA est restée de loin en deçà de celui visé par l'OMS (au moins 80%) (Toé *et al*. 2009; Chinwe *et al*. 2018; Olapeju *et al.* 2018). Selon les données rapportées par l'OMS, la proportion de la population ayant dormi la veille sous une moustiquaire imprégnée en Côte d'Ivoire était seulement de 50% en 2016 (WHO 2017). Il y a donc un besoin de renforcer les stratégies d'IEC pour maximiser l'efficacité de la couverture universelle en

MILDA. Toutefois, à notre connaissance, les données scientifiques (entomologiques et/ou épidémiologiques) permettant d'établir et de quantifier le bénéfice d'utiliser cette stratégie dans un contexte de couverture universelle en MILDA n'existent pas.

La PID est l'un des principaux outils de LAV utilisés contre le paludisme dans le monde. Elle permet de tuer les vecteurs qui se reposent sur les murs après leur repas de sang. A l'heure actuelle, les insecticides non-pyréthrinoïdes préqualifiés par l'OMS pour la PID appartiennent à trois différentes classes (carbamates, organophosphorés et néonicotinoïdes), les néonicotinoïdes ayant intégré la liste en 2017 (WHO 2011a, 2019). Les données extraites du site IR mapper[1] montrent que 82% et 51% des pays dans lesquels les tests de sensibilité ont été effectués entre 2010 et 2017 ont respectivement confirmé la résistance des vecteurs aux carbamates et organophosphorés (Knox *et al*. 2014). En Côte d'Ivoire, la résistance aux carbamates est très répandue chez *An. gambiae s.l.*, suggérant que les insecticides de la classe des organophosphorés ou des néonicotinoïdes peuvent être plus efficaces en PID que les carbamates (Camara *et al*. 2018b). La PID a été combinée aux MILDA dans 28 pays d'Afrique entre 2015 et 2017 (WHO 2018a), mais elle n'a pas encore été déployée en Côte d'Ivoire. Cependant, les essais contrôlés randomisés évaluant l'efficacité additionnelle de cette combinaison en Afrique sub-saharienne ont donné des résultats contradictoires. Deux essais réalisés en Tanzanie dont un très récent ont montré que le déploiement simultané des deux outils offrait une protection additionnelle contre le paludisme, comparativement aux MILDA seules (West *et al*. 2014; Protopopoff *et al*. 2018). Par contre, les essais menés au Bénin, en Gambie et en Ethiopie n'ont pas montré un bénéfice à combiner les deux stratégies pour lutter contre le paludisme (Corbel *et al*. 2012; Pinder *et al*. 2015; Loha *et al*. 2019). Des facteurs tels que les différences d'intensité de la transmission, de résistance aux insecticides et de comportements des vecteurs ont été évoqués pour expliquer les résultats contradictoires obtenus mais il reste difficile de prédire l'impact de cette combinaison (Lines and Kleinschmidt 2015; Choi *et al*. 2019).

La LAL était la principale méthode de lutte utilisée contre le paludisme avant l'apparition des moustiquaires imprégnées et de la PID (WHO 1982). Elle a été ensuite abandonnée au profit

[1]http://www.irmapper.com/

des deux dernières à cause des connaissances plus précises acquises sur l'éthologie (comportement de piqûres, préférences trophiques, etc.) et l'écologie des anophèles vecteurs. De plus, le modèle de Ross a démontré qu'une réduction plus importante de la transmission des *Plasmodium spp*. est obtenue en réduisant la longévité des populations vectrices donc en tuant les vecteurs adultes (MacDonald 1956). Toutefois, la LAL a toujours fait partie intégrante des méthodes de lutte utilisées partout dans le monde pour éliminer le paludisme (Kitron and Spielman 1989; Killeen et al. 2002). Elle connaît un regain d'intérêt de nos jours en Afrique, particulièrement dans les zones urbaines, car elle offre la possibilité de lutter contre les populations vectrices responsables de la transmission résiduelle malgré une couverture élevée des MILDA (WHO 2013). Dans cet esprit, une volonté politique forte est actuellement orientée vers la LAL à base de larvicides d'origine biologique contre les anophèles en Afrique de l'Ouest (Ecowas Commission 2012). Les larvicides d'origine bactérienne tels que *Bacillus thuringiensis var. israelensis (Bti)* et *Bacillus sphaericus (Bs)* sont très sélectifs et non dangereux pour les organismes non cibles (WHO 2013). Plusieurs études conduites dans diverses zones d'Afrique sub-saharienne ont montré leur efficacité contre les anophèles vecteurs (Fillinger *et al.* 2009; Geissbuhler *et al.* 2009; Djènontin *et al.* 2014). En avril 2012, l'OMS a publié une déclaration de position qui recommande les traitements larvicides uniquement dans les zones où les gîtes larvaires sont peu nombreux, fixes et repérables. Elle encourage aussi des recherches opérationnelles sur l'efficacité de cette stratégie dans les autres zones (WHO 2012a). Malheureusement, à notre connaissance, un seul essai randomisé a été mené pour évaluer l'efficacité des traitements larvicides en Afrique sub-saharienne. Cet essai qui a été conduit dans une zone rurale de la Gambie où les gîtes larvaires sont très étendus et situés dans des plaines alluviales n'a pas montré d'impact sur la transmission des *Plasmodium spp.* et sur la prévention du paludisme (Majambere *et al*. 2010). D'autres études de type « avant-après » ont été conduites en Afrique sub-saharienne mais ont donné des résultats mitigés (Fillinger *et al*. 2008, 2009; Geissbühler *et al*. 2009; Maheu-giroux and Castro 2013; Tusting *et al*. 2013).

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'un essai contrôlé randomisé visant à évaluer à l'échelle communautaire, l'efficacité additionnelle de quatre stratégies de lutte sur la transmission des *Plasmodium spp.* et la survenue du paludisme : 1) une stratégie renforcée d'IEC, 2) la PID à base du pirimiphos méthyl, 3) la lutte anti-larvaire (LAL) à base du *Bti*, et 4) l'ivermectine administrée aux animaux domestiques. L'essai a été conduit dans 28 villages

du district sanitaire de Korhogo, Nord de la Côte d'Ivoire et 27 villages du district sanitaire de Diébougou, Sud-Ouest du Burkina Faso. J'ai conduit toutes les activités du volet entomologique de l'essai qui se sont déroulées dans les 28 villages de Korhogo. L'objectif principal de ma thèse est d'étudier l'impact entomologique des stratégies complémentaires aux MILDA que sont une stratégie renforcée de l'IEC, la PID et la lutte anti-larvaire dans les 28 villages de Korhogo.

Les objectifs spécifiques de la thèse étaient de :

i) Étudier en conditions semi-naturelles l'efficacité d'une nouvelle formulation de larvicide à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* contre le vecteur majeur du paludisme en Afrique, *Anopheles gambiae s.s.* ;
ii) Étudier les espèces vectrices, les mécanismes de résistance aux insecticides et l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* dans la zone de Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires ;
iii) Identifier et caractériser les gîtes larvaires d'*Anopheles spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires ;
iv) Évaluer l'efficacité additionnelle de l'IEC, de la PID et de LAL sur la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo.

Dans le premier chapitre, une revue bibliographique est présentée dans le but de décrire le contexte général dans lequel a été mis en œuvre ce travail de thèse et d'en poser la problématique afin de faciliter la compréhension de la suite du manuscrit. Nous avons abordé les thèmes de la situation actuelle du paludisme dans le monde, les parasites et les vecteurs, les indicateurs de la transmission, les principales méthodes de lutte utilisées contre les vecteurs, les insecticides utilisés en santé publique et les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides. Dans le second chapitre, nous avons décrit le matériel et les méthodes utilisés pour atteindre nos objectifs spécifiques. Dans les chapitres 3, 4, 5 et 6 sont présentés les résultats pour chacun des objectifs spécifiques. Les chapitres 3, 4 et 5 sont étayés par des articles publiés. Dans le septième et dernier chapitre, nous avons discuté l'ensemble de nos résultats et proposé des pistes de recherches pour une lutte antivectorielle plus efficace en Côte d'Ivoire et en Afrique sub-saharienne.

Chapitre 1. Revue bibliographique

1.1 Situation actuelle du paludisme dans le monde

Le paludisme est endémique dans 87 pays du monde en 2017. Il a été éliminé de la plupart des pays tempérés au cours du vingtième siècle pour se retrouver essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique (WHO 2018a). Dans la zone Afrique de l'OMS, seuls 2 pays ont été reconnus par l'OMS comme exempts du paludisme : l'Île Maurice en 1973 et l'Algérie en 2019. Selon l'OMS, 219 millions cas de paludisme ont été enregistrés en 2017 dans le monde. C'est l'Afrique qui est de loin la région la plus touchée, supportant 92% de la charge palustre mondiale. Elle est suivie par la région d'Asie du Sud-Est (5%) et la région de la Méditerranée orientale (2%). Quatre pays d'Afrique sub-saharienne (Nigéria, République Démocratique du Congo, Mozambique et Ouganda) et l'Inde ont concentré à eux seuls près de la moitié des cas de paludisme dans le monde en 2017. Toutefois, à l'échelle mondiale, l'incidence du paludisme est passée de 72 cas pour 1000 habitants à 59 pour 1000 entre 2010 et 2017, soit une diminution de 13% pendant cette période. Mais à part la région d'Asie du Sud-Est où une baisse d'incidence continue d'être observée, aucun progrès significatif n'a été obtenu dans les autres régions de l'OMS après 2015. En ce qui concerne la mortalité due au paludisme, elle a été estimée à 435000 dans le monde en 2017. La grande majorité de ces décès (93%) ont été enregistrés en Afrique et les enfants de moins de 5 ans étaient les plus représentés (61%). Comparativement à 2010, la mortalité due au paludisme en 2017 a baissé en Asie du Sud-Est (54%), en Afrique (40%), en Méditerranée orientale (10%), mais elle n'a pas diminué aux Amériques. En général, comme dans le cas de l'incidence du paludisme, la diminution de la mortalité a freiné depuis 2015 (WHO 2018a).

1.2 Les parasites et les vecteurs responsables du paludisme

1.2.1 Les parasites

L'agent pathogène du paludisme est un protozoaire du genre *Plasmodium*. Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium* qui infectent des espèces animales variées. Seules cinq espèces sont naturellement infectieuses pour l'homme : *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890, *Plasmodium ovale* Stephens, 1922, *Plasmodium malariae* Feletti & Grassi, 1889, *Plasmodium knowlesi* Sinton & Mulligan, 1933 et *Plasmodium falciparum* Welch, 1897. Les quatre

premières appartiennent au sous-genre *Plasmodium* alors que la dernière (*Plasmodium falciparum*) est membre du sous-genre *Laverania*. Le tableau 1 présente la répartition géographique des 5 espèces de *Plasmodium*. Les deux espèces plasmodiales les plus dangereuses sont *P. falciparum* et *P. vivax. Plasmodium vivax* infecte plus de personnes dans le monde mais est moins grave que *P. falciparum* qui est la plus répandue en Afrique. En 2017, *P. falciparum* a été à l'origine de 99,7% des cas de paludisme en Afrique. La Figure 1 montre la distribution géographique de l'incidence des cas de paludisme à *P. falciparum* et la mortalité associée en 2017 dans le monde. Les trois autres espèces (*P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*) sont moins répandues et ne causent pas d'accès graves (WHO 2011). Toutes les espèces plasmodiales sont présentes en Afrique sauf *P. knowlesi*. *Plasmodium knowlesi,* une espèce qui ressemble *à P. malariae* au microscope*,* est habituellement inféodée aux singes macaques de l'Asie du Sud-Est. L'infection à *P. knowlesi* peut causer des pathologies cérébrales graves (Cox-Singh *et al*. 2010).

Tableau 1 : Répartition géographique des espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme. (Singh *et al*. 2004)

Espèces de *Plasmodium*	Zones concernées
Plasmodium falciparum	Afrique sub-saharienne Asie- Océanie Amérique centrale et du Sud
Plasmodium malariae	Afrique
Plasmodium vivax	Afrique Asie Amérique Centrale et du Sud Amérique Centrale et du Sud
Plasmodium ovale	Océanie-Amazonie Afrique Asie Afrique
Plasmodium knowlesi	Asie du Sud-Est

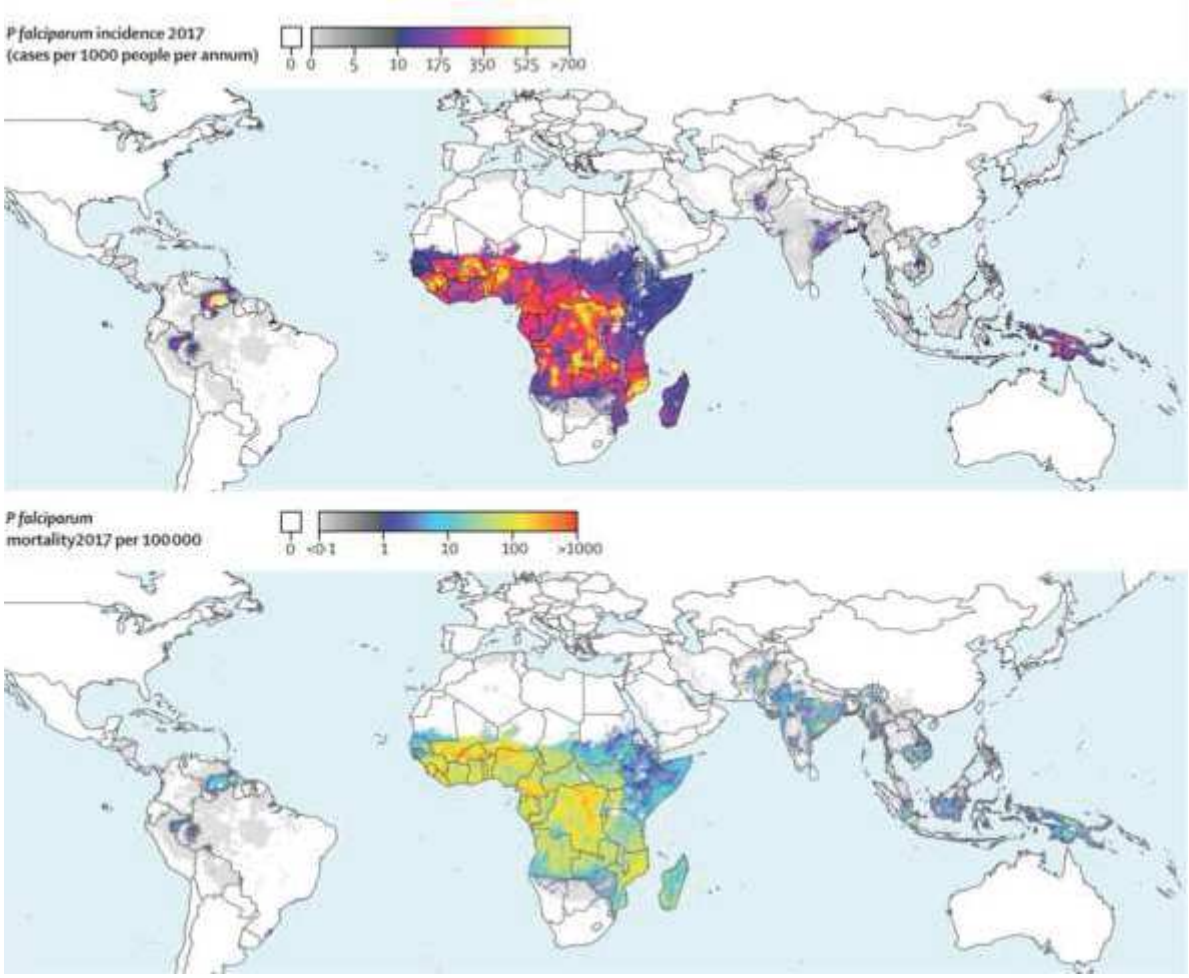

Figure 1 : Distribution géographique de l'incidence des cas de paludisme dus à *P. falciparum* et de la mortalité associée en 2017 dans le monde. Source (Weiss *et al*. 2019)

1.2.2 Les vecteurs

Plasmodium spp. est transmis à l'homme par des moustiques du genre *Anopheles* qui comprend 465 espèces reconnues et plus de 50 complexes d'espèces pas encore totalement décrits (Sinka *et al*. 2012). Plus de 100 espèces du genre *Anopheles,* dont une trentaine en Afrique, peuvent transmettre *Plasmodium spp*. En fonction des zones géographiques, on distingue des vecteurs principaux à grande répartition géographique, des vecteurs d'importance locale et des vecteurs secondaires. Les principales espèces vectrices retrouvées en Afrique sont *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* et *An. coluzzii* du complexe *An. gambiae* et *An. funestus s.s.* Ces vecteurs ne sont pas uniformément répartis sur le continent africain (Figure 2). La présence d'une espèce donnée dans une localité est influencée par plusieurs facteurs environnementaux dont la température,

l'humidité, la nature des sols, le régime des pluies, la salinité de l'eau, etc. (Wiebe *et al*. 2017) mais également par des facteurs anthropiques (Kamdem *et al*. 2012).

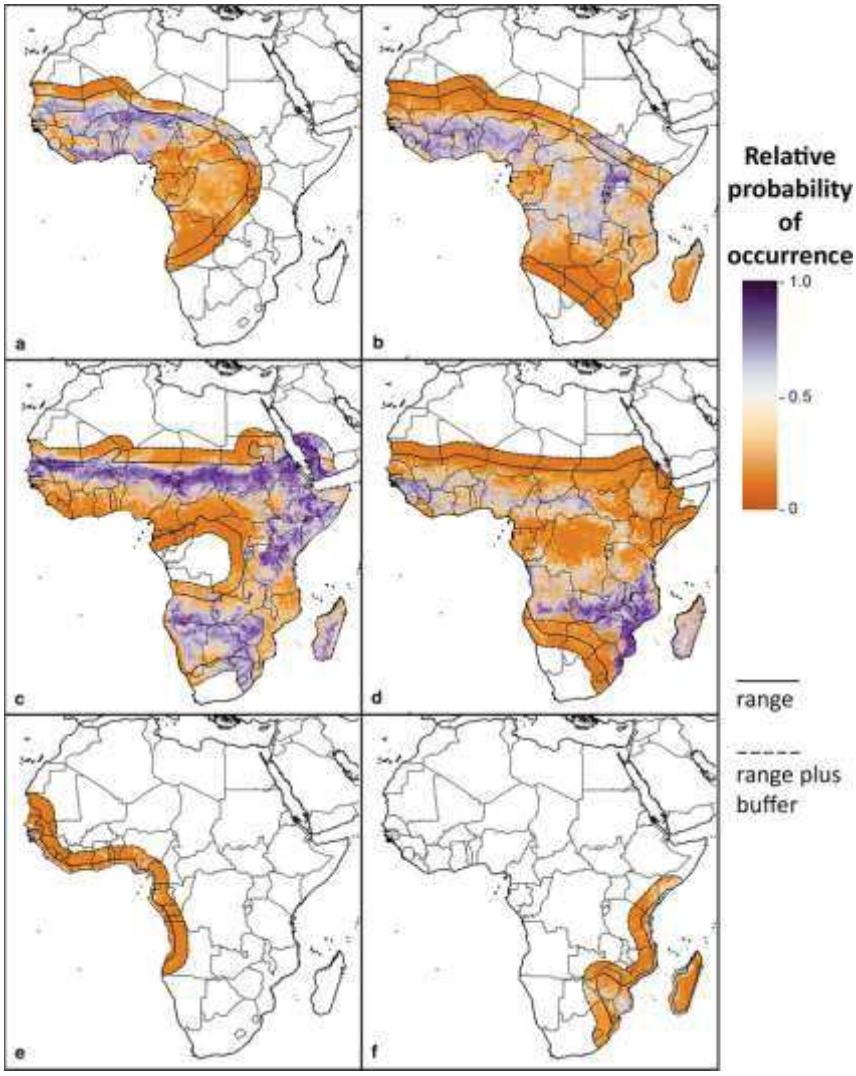

Figure 2 : Cartographie prédictive de la présence des principales espèces vectrices de *Plasmodium spp.* en Afrique. a *An. coluzzii*. b *An. gambiaie.* c *An. arabiensis*. d *An. funestus*. e *An. melas*. f *An. merus*. Source (Wiebe *et al*. 2017).

1.2.2.1 Le complexe An. gambiae

Le complexe *An. gambiae* comprend huit espèces (*An. gambiae s.s.* Giles, 1902 ; *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 ; *An. arabiensis* Patton, 1905 ; *An. melas* Theobald, 1903 ; *An. merus* Donitz, 1902 ; *An. bwambae* White, 1985 ; *An. quadriannulatus* Theobald, 1911 ; *An. amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013). La notion de complexe d'espèces a été initialement basée sur des critères écologiques des vecteurs au stade larvaire. Il a fallu attendre

le XXème siècle pour que l'existence du complexe *An. gambiae* soit démontrée par des croisements de référence réalisés entre écotypes (Davidson 1964). Ainsi, sept « unités de croisements » ont été mises en évidence sur la base de la production de mâles F1 stériles, et ont été considérées comme des espèces au sein du complexe *An. gambiae* (White 1974; Hunt *et al*. 1998). Les études ultérieures ont permis de distinguer et d'identifier les espèces du complexe en se basant sur des critères cytogénétiques (Coluzzi *et al*. 1979). En 2013, *An. gambiae s.s.* Giles, 1902 a été scindée en deux espèces qui correspondent aux classifications antérieures des deux formes moléculaires M et S, la forme M et la forme S correspondant respectivement à *An. coluzzii* et *An. gambiae s.s.* (Coetzee *et al*. 2013). Le complexe *An. gambiae* joue un rôle majeur dans la transmission des *Plasmodium spp.* en Afrique sub-saharienne, en particulier *An. gambiae s.s., An. coluzzii*, et *An. arabiensis* (Wiebe *et al*. 2017).

Les aires de distribution d'*An. gambiae s.s.* et d'*An. coluzzii* se chevauchent en Afrique de l'Ouest et Centrale. Il convient de noter que les niveaux d'hybridation entre ces deux espèces varient énormément en fonction des zones géographiques. Certains pays n'ont rapporté aucun cas d'hybridation alors que d'autres ont observé des fréquences peu voire très élevées (Wondji *et al*. 2005; Yawson *et al*. 2007; Nwakanma *et al*. 2013). *An. gambiae s.s.* se retrouve, toutefois en allopatrie en Afrique de l'Est mais une étude a observé la présence d'*An. coluzzii* au Zimbabwe (Masendu *et al*. 2004). Les larves d'*An. gambiae s.s.* se retrouvent dans des gîtes larvaires temporaires avec peu de prédateurs. *An. coluzzii,* par contre, est plus adapté aux gîtes larvaires permanents ou semi-permanents dans lesquels les prédateurs sont abondants (Diabaté *et al*. 2005; Gimonneau *et al*. 2010, 2012).

An. arabiensis est présent dans toute la zone afrotropicale excepté les zones de forêts. Comparativement à *An. gambiae s.s.* ou *An. funestus s.s.*, il s'adapte mieux aux environnements plus secs, ce qui explique sa distribution qui s'étend jusqu'au Nord dans le Sahel, à l'Est de l'Ethiopie, le Sud-Ouest de la péninsule arabique, le Kenya et la Somalie et le Sud dans les environnements désertiques et steppiques de la Namibie et du Botswana en Afrique australe (Wiebe *et al*. 2017).

1.2.2.2 Le groupe An. funestus

Le groupe *An. funestus* est réparti en 3 sous-groupes (Funestus, Rivulorum et Minimus) et est composé de 10 espèces : *An. funestus s.s., An. aruni*, *An. parensis*, *An. vaneedeni*, *An. confusus*,

An. rivulorum, *An. leesoni*, *An. brucei, An. fuscivenosus et An. funestus-like* (Spillings *et al*. 2009). Il existe de grandes différences entre les membres du groupe en ce qui concerne leur biologie, leur comportement et leur capacité vectorielle. Seul *An. funestus s.s.* est un vecteur majeur de *Plasmodium*. *spp.*; les autres espèces du groupe jouent un rôle mineur ou ne sont pas vectrices (Choi *et al*. 2010).

Deux formes chromosomiques d'*An. funestus s.s.* (Kiribina et Folonzo) ont été observées au Burkina-Faso et au Sénégal correspondant à des comportements de piqûres et de repos différents (Costantini *et al*. 1999 ; Dia *et al*. 2000). La forme Kiribina serait plus abondante dans les zones rizicoles alors que la forme Folonzo serait plus présente dans les zones comportant des retenues d'eau avec une végétation aquatique naturelle. Des études plus récentes sur des populations d'*An. funestus s.s.* de 12 pays ont permis d'identifier 3 formes moléculaires : M, W et MW. La forme M est retrouvée essentiellement en Afrique de l'Est, la forme W en Afrique de l'Ouest et centrale et MW au Sud de l'Afrique (Garros *et al*. 2004). Toutefois, ces 3 formes ont été toutes retrouvées dans des populations d'*An. funestus s.s.* de Malawi. Au moins deux formes ont également été retrouvées au sein d'une même population collectée dans d'autres pays (Koekemoer *et al*. 2006). *An. funestus s.s.* est répandu dans toute l'Afrique sub-saharienne, se retrouvant plus dans les savanes ouvertes que dans les zones boisées. Son aire de distribution chevauche celles d'*An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis*, faisant des quatre espèces les principaux vecteurs de *Plasmodium spp.* sur le continent africain (Wiebe *et al*. 2017).

1.2.2.3 Le complexe An. nili

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

1.2.2.4 Le cycle de vie des anophèles vecteurs

Les anophèles sont des insectes holométaboles (insectes à métamorphose complète) et leur cycle de développement comprend deux phases, quelle que soit l'espèce : une phase immature aquatique et une phase adulte aérienne (Figure 3). La phase immature aquatique comprend les stades que sont les œufs, les larves et les nymphes. Une femelle d'anophèle pond en moyenne 50 à 300 œufs qui sont de forme allongée et mesurent 1/2 millimètre de longueur chacun. Les œufs sont pondus isolément, en vol, sur la surface de l'eau et sont pourvus en général de deux flotteurs latéraux. Après éclosion, en général dans les 48 heures après la ponte, les larves obtenues passent par quatre stades larvaires successifs. Les larves d'anophèles se distinguent des autres moustiques par leur position horizontale sur la surface de l'eau. Le dernier stade de la phase immature est la nymphe d'où émerge l'adulte ailé. La vie de l'adulte est marquée par deux comportements essentiels : l'alimentation et la reproduction. Les mâles et les femelles se nourrissent de nectar des fleurs et d'autres sources de sucre. Chez les mâles, l'accouplement se fait en moyenne 3 jours après l'émergence et est souvent précédé d'un essaimage pour attirer les femelles. L'accouplement chez les femelles se fait 2 ou 3 jours après l'émergence. Les femelles ne s'accouplent en général qu'une fois et stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque jusqu'à leur mort. Après l'accouplement, la femelle cherche successivement un repas de sang pour la maturation des follicules ovariens, un lieu de ponte puis un autre repas de sang. Ce cycle est dénommé cycle gonotrophique. Il est d'une importance capitale en épidémiologie car il conditionne la fréquence du contact hôte-vecteur pendant lequel se déroule la transmission des *Plasmodium spp*.

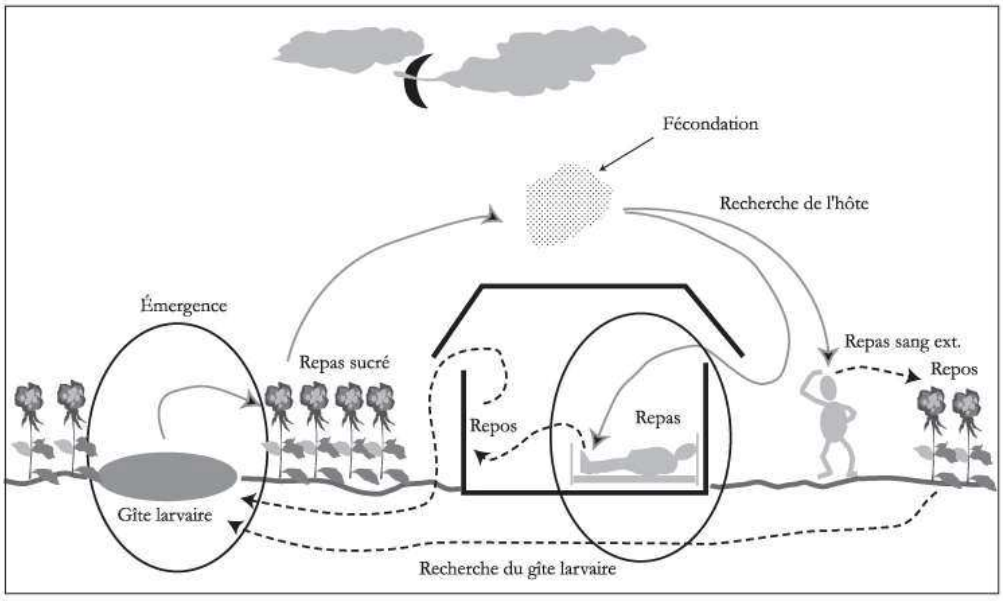

Figure 3 : Les principales phases du cycle biologique des femelles d'anophèles. Source : International Water Management Institute

1.2.3 Le cycle de vie des *Plasmodium spp.* parasites de l'homme

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

différencient en gamétocytes sexués. Ceci marque le début de la phase sexuée des *Plasmodium spp*.

Au cours d'un repas de sang, l'anophèle femelle ingère les gamétocytes. Le macro-gamétocyte femelle se transforme rapidement en macro-gamète femelle alors que les micro-gamétocytes mâles subissent trois cycles successifs conduisant à la formation de huit noyaux, chacun associé à un flagelle. Ces derniers émergent à la surface du corps du gamétocyte pour former les microgamètes, c'est l'exflagellation. Les membranes plasmiques suivies des noyaux des gamètes mâle et femelle fusionnent ensuite, c'est la fécondation qui conduit à la formation d'un œuf diploïde. L'œuf évolue en un ookinète mobile qui migre dans les parois de l'estomac de l'anophèle où il s'y enkyste sous la forme d'un oocyste. Après maturation, les oocystes libèrent les sporozoïtes qui migrent *via* l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires du moustique. La durée de la maturation dépend de la température et varie de 4 à 21 jours pour *P. falciparum*. L'inoculation de sporozoïtes dans un nouvel hôte humain boucle le cycle de développement des *Plasmodium spp.* (Figure 4).

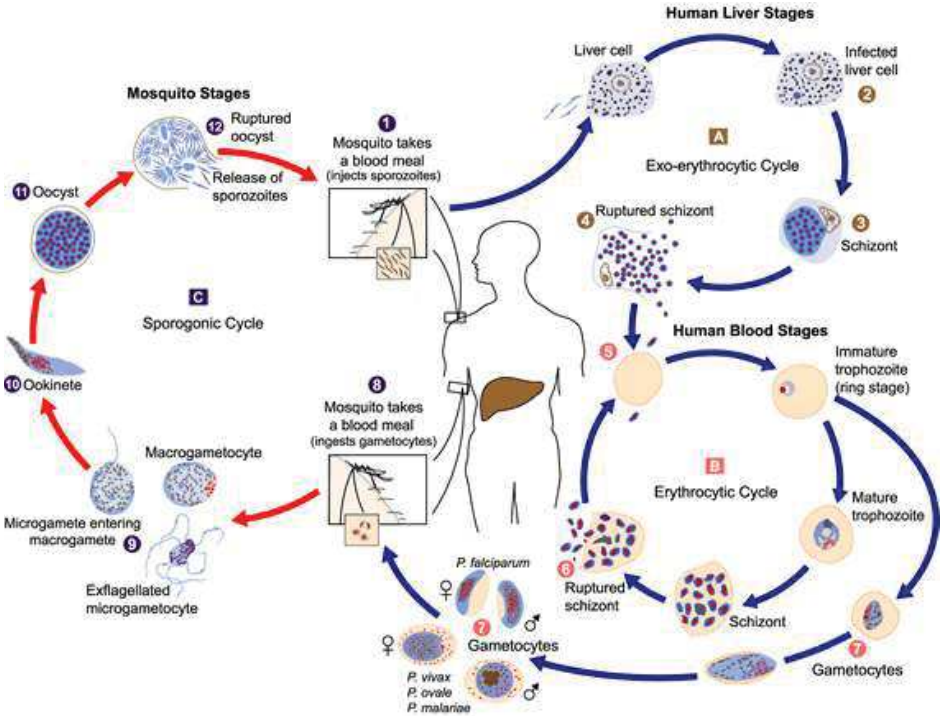

Figure 4 : Cycle de développement des *Plasmodium spp*. Source : Center for Disease Control (CDC)

1.3 Les indicateurs de la transmission

Plusieurs indicateurs présents chez l'homme ou chez les vecteurs peuvent être utilisés pour mesurer la transmission des *Plasmodium spp.*

Chez l'homme, la prévalence de l'infection qui correspond à la proportion de la population infectée par le parasite est le principal indicateur mesuré. L'infection est généralement examinée en observant au microscope les parasites dans le sang périphérique. Des tests immunologiques dits tests rapides peuvent également être utilisés. Ils sont basés sur la reconnaissance spécifique de la protéine HRP2 (Histidine Rich Protein 2) spécifique de *P. falciparum*, ou de différentes formes isomériques spécifiques de la lactate déshydrogénase commune à toutes les espèces plasmodiales.

Chez le vecteur, la transmission des *Plasmodium spp.* est en général mesurée en se basant sur la formule de Ronald Ross et sa « theory of happenings » (h). L'indicateur h, qui correspond au taux d'inoculation entomologique (TIE), est le nombre moyen de piqûres d'anophèles infectées reçues par un sujet humain en une nuit selon la formule classique : h=ma x s.

Dans cette formule, « ma » correspond au nombre de piqûres reçues/Homme/nuit et « s » équivaut à l'indice sporozoïtique. L'indice sporozoïtique est obtenu par dissection des glandes salivaires et examen microscopique ou par recherches ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de la protéine circumsporozoïtique ou par la recherche de l'ADN du *Plasmodium* par PCR dans les glandes salivaires. Cette dernière méthode est la plus courante et la plus fiable de nos jours. Le taux d'inoculation entomologique est l'indicateur entomologique le plus utilisé pour quantifier la transmission des *Plasmodium spp.* car il est facile à obtenir. Cependant, il peut être biaisé par les méthodes d'échantillonnage des vecteurs utilisées ou par la technique utilisée pour rechercher les vecteurs infectés.

Le taux de reproduction de Macdonald renseigne également sur la transmission des *Plasmodium spp.* mais il est particulièrement difficile à obtenir, comparativement à la capacité vectorielle de Garrett-Jones. La capacité vectorielle selon Garrett-Jones (1964) est calculée selon la formule suivante : $C = ma^2 h p^n/-lnp$. Dans cette formule, m représente le nombre d'anophèles femelles par personne ; a le nombre de sujets humains piqués en 1 jour par 1 anophèle femelle ; ma correspond au nombre de piqûres reçues/homme/nuit ou la densité

d'anophèles agressive pour l'homme ; p le taux de survie journalier de la population anophélienne ; n la durée du développement sporogonique (jours) ; p^n= la probabilité qu'un anophèle femelle infecté survive au-delà de la durée du développement sporogonique ; p^n/-lnp est le nombre d'infections nouvelles faites en 1 jour par une population anophélienne à partir d'un cas unique (sujet humain) infectant et h= la probabilité qu'un anophèle femelle s'infecte

D'autres indicateurs tels que l'indice de stabilité de Macdonald peuvent permettre de mesurer la transmission des *Plasmodium spp.* mais ils restent très peu utilisés (MacDonald G 1957).

1.4 Les principales méthodes de lutte utilisées contre les vecteurs

La prévention contre le paludisme repose essentiellement sur la lutte contre les anophèles vecteurs car le vaccin le plus avancé, RTS, S ne confère qu'une protection partielle contre le paludisme à *P. falciparum* chez le jeune enfant (RTS 2015). En Afrique sub-saharienne, la lutte antivectorielle (LAV) vise surtout à « contrôler » le paludisme. Le contrôle se définit comme une diminution durable de la transmission ou une réduction de la population de vecteurs dans des proportions telles que la maladie n'est plus un problème de santé publique, ni un obstacle au développement socio-économique. Les deux principales méthodes de LAV sont : les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) et les pulvérisations intradomiciliaires (PID). La lutte anti-larvaire (LAL) est une stratégie qui connaît un regain d'intérêt actuellement dans plusieurs pays d'Afrique.

1.4.1 Les moustiquaires imprégnées d'insecticides

L'usage des moustiquaires remonte aux temps anciens pendant lesquels il permettait de lutter contre les nuisances des insectes nocturnes. Ce n'est qu'à partir du XIXème siècle que les moustiquaires ont été reconnues comme un outil de lutte contre les maladies vectorielles. Elles offrent une protection individuelle efficace contre les anophèles car ceux-ci piquent généralement la nuit et à l'intérieur des habitations. Cependant, le niveau de protection conféré par une moustiquaire dépend largement de sa bonne utilisation et de son état d'usure physique. L'imprégnation des moustiquaires a permis de conférer à l'individu une protection au moyen d'une barrière chimique qui renforce la barrière physique. Darriet *et al.* ont été les premiers à prouver l'efficacité des moustiquaires imprégnées de perméthrine (un insecticide de la classe des pyréthrinoïdes) au Burkina-Faso en 1983 (Darriet *et al*. 1984). Très rapidement, les

moustiquaires imprégnées d'insecticide se sont affirmées comme l'outil de choix pour réduire significativement le poids du paludisme dans le monde, en particulier en Afrique. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide induisent plusieurs effets (Carnevale *et al*. 1988) :

• Effet Knock-Down (KD) ou effet choc. Le contact du moustique avec l'insecticide provoque une perturbation des influx nerveux qui se traduit par une paralysie momentanée du moustique ;

• Effet létal. En fonction de la durée de contact, le moustique exposé au matériel imprégné meurt ;

• Effet excito-répulsif. Les moustiquaires imprégnées d'insecticide réduisent à distance le nombre de vecteurs entrant dans les habitations ;

• Effet irritant qui limite le temps de contact avec la moustiquaire et induit l'envol du moustique (qui peut revenir au contact après) ;

• Effet de masse ou protection collective si le taux d'utilisation est supérieur à 50% (Killeen and Smith 2007). Il s'explique par le fait qu'un taux élevé (> 50%) d'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide dans une communauté pourrait entraîner une réduction de la densité et de la longévité des vecteurs, ce qui pourrait conférer une certaine protection aux personnes n'utilisant pas de moustiquaires.

Depuis quelques années, le développement des moustiquaires imprégnées à « longue durée d'action » (MILDA) a permis d'augmenter la durée efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide et leur résistance aux lavages (Guillet *et al*. 2001). Les technologies utilisées pour la fabrication des MILDA varient et dépendent du matériau utilisé. Les MILDA tissées en polyéthylène ou polypropylène ont l'insecticide incorporé par fusion dans la fibre alors que l'insecticide est fixé sur la fibre à l'aide d'une résine pour celles en polyester. La première technologie permet de relarguer progressivement l'insecticide à la surface de la moustiquaire par régénération alors que, pour la seconde, l'insecticide est directement disponible.

A travers le programme « Roll Back Malaria », les chefs d'Etats africains réunis à Abuja en avril 2000, avaient fixé entre autres objectifs d'atteindre une couverture en MILDA de 60% chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes avant 2005. Cet objectif a ensuite été revu à la hausse (80%) pour 2010. Ces taux visés n'ont malheureusement pas été atteints

dans la plupart des pays. De nos jours, l'OMS recommande la couverture universelle de MILDA dans toutes les zones endémiques, pas seulement pour les groupes les plus vulnérables (enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes) (Roll Back Malaria 2011). En conséquence, la couverture en MILDA a considérablement augmenté ces dernières années. Il a été estimé que près d'un milliard de MILDA ont été distribuées en Afrique sub-saharienne depuis 2000 et la population dormant sous MILDA a augmenté de 2 à 53% entre 2000 et 2015 (WHO 2015). Ceci a largement contribué (68%) au progrès obtenu dans la lutte contre le paludisme entre 2000 et 2015 (Bhatt *et al*. 2015a). Il convient de noter que de nouvelles moustiquaires bi-traitées (pyréthrinoïde et un autre ingrédient actif) sont disponibles actuellement et ont récemment reçu une recommandation provisoire de l'OMS (WHOPES 2017). Les ingrédients actifs ajoutés aux pyréthrinoïdes sont soit un nouvel insecticide (le chlorfenapyr de la famille des pyrroles) ou un régulateur de croissance (le pyriproxyfen de la catégorie des juvénoïdes) ou un synergiste (le butoxyde de pipéronyle ou PBO).

1.4.2 Les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent

La découverte du dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) en 1939 a marqué le début de la lutte contre les vecteurs par les pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent (PID). La PID est dirigée contre les vecteurs endophiles et anthropophiles. Elle permet de tuer les moustiques qui se reposent sur les murs avant ou après le repas sanguin (Kouznetsov 1977). La PID avec du DDT fut l'outil de base du programme mondial d'éradication du paludisme lancé par l'OMS en 1955. Les résultats obtenus furent spectaculaires, avec notamment l'éradication du paludisme aux Etats Unis d'Amérique, dans l'ancienne Union Soviétique et dans plusieurs pays d'Europe. En Asie du Sud-Est, en Inde et en Amérique du Sud, une diminution significative de l'incidence du paludisme avait été observée. Dans la même période, des projets pilotes d'éradication du paludisme ont été initiés dans des pays d'Afrique sub-saharienne comme le Bénin, le Togo, le Burkina-Faso, le Sénégal, le Libéria, le Nigéria, le Cameroun, la Tanzanie, le Rwanda, le Burundi, l'Ouganda et le Kenya. D'importantes réductions de la densité des vecteurs et des cas de paludisme ont été observées dans ces pays mais la transmission n'a pas pu être interrompue. Par conséquent, la PID n'a pas été implémentée dans la plupart des pays de l'Afrique sub-saharienne sauf dans des pays situés au Sud du continent tels que l'Afrique du Sud, la Zambie, la Namibie, le Swaziland, le Zimbabwe et le Botswana (Mabaso *et al*. 2004). Notons que le DDT a été ensuite progressivement remplacé par des insecticides moins dangereux pour l'environnement à savoir ceux de la classe des pyréthrinoïdes, des carbamates

et des organophosphorés. En 2006, l'OMS a réaffirmé l'importance de la PID comme stratégie primaire de lutte antivectorielle contre le paludisme (WHO 2006). Ces dernières années, les campagnes de PID se sont multipliées grâce notamment au programme President's Malaria Initiative (PMI). Le nombre de personnes protégées par la PID en Afrique sub-saharienne est passé de 13 millions en 2005 à 45 millions en 2016, avec un pic observé en 2010 (78 millions) (WHO 2017).

1.4.3 La lutte anti-larvaire

Après la découverte en 1897 que les anophèles sont les vecteurs des *Plasmodium spp.*, la lutte anti-larvaire (LAL) a été la principale stratégie utilisée pour lutter contre le paludisme. Elle vise à réduire la transmission des *Plasmodium spp.* en diminuant la densité des vecteurs. On distingue quatre catégories de stratégies de LAL : (i) modification de l'habitat, (ii) manipulation de l'habitat, (iii) contrôle biologique, (iv) traitement des gîtes à l'aide de larvicides. Les premières stratégies de LAL étaient essentiellement la destruction des gîtes par drainage des zones de marécages, la lutte biologique en utilisant des poissons larvivores et puis, à partir de 1924, l'utilisation des larvicides chimiques dont le vert de Paris (acéto-arseniate de cuivre). Ces stratégies ont montré leur efficacité, surtout en Europe, aux Etats Unis, en Italie et en Israël. Des succès historiques contre *An. gambiae s.l.* ont également été obtenus au Brésil dans les années 1940 grâce à l'utilisation de larvicides (vert de Paris) (Killeen *et al*. 2002). En Afrique, des programmes de LAL efficaces contre *An. gambiae s.l.* et/ou *An. funestus* ont aussi été implémentés en Egypte, en Zambie et en Tanzanie (Shousha 1948; Utzinger *et al*. 2001; Caldas de Castro *et al*. 2004). Actuellement, l'OMS encourage le déploiement des stratégies de LAL en combinaison avec les MILDA ou la PID. Elle ne recommande les traitements larvicides que dans les zones où les gîtes larvaires sont peu nombreux, fixes et repérables (WHO 2012a).

1.5 Les insecticides utilisés en santé publique

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

appartiennent à 7 grandes familles : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les régulateurs de croissance, les pyrroles et les néonicotinoïdes. Les deux dernières ont intégré la liste en 2017 (WHOPES 2017). En plus de ces familles, on a les toxines bactériennes qui sont les principaux insecticides biologiques utilisés dans la LAL.

1.5.1 Les organochlorés

Les organochlorés appartiennent à 3 sous-familles différentes en fonction de leur mode d'action et leur structure chimique : le DDT et ses analogues, les cyclodiènes et le lindane. Les cyclodiènes et le lindane sont des neurotoxines qui inhibent les canaux chlorures, récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Le DDT agit sur le système nerveux central et périphérique en interagissant avec le canal sodium voltage dépendant (Figure 5). Il ralentit la fermeture des canaux sodiques, ce qui induit chez le moustique un tremblement généralisé (incoordination motrice) puis une paralysie. La toxicité aiguë des organochlorés envers les vertébrés est relativement faible et leur rémanence est longue (> 6 mois). Ils ont été très utilisés de 1940 à 1970 mais ils sont toxiques pour la faune non cible et persistent durablement dans l'environnement. De fait, seul le DDT est encore utilisé pour la PID mais il est remplacé dans la plupart des pays par des insecticides moins dangereux. Il convient de noter que le DDT n'est actuellement autorisé que pour la lutte antivectorielle (WHO 2011a).

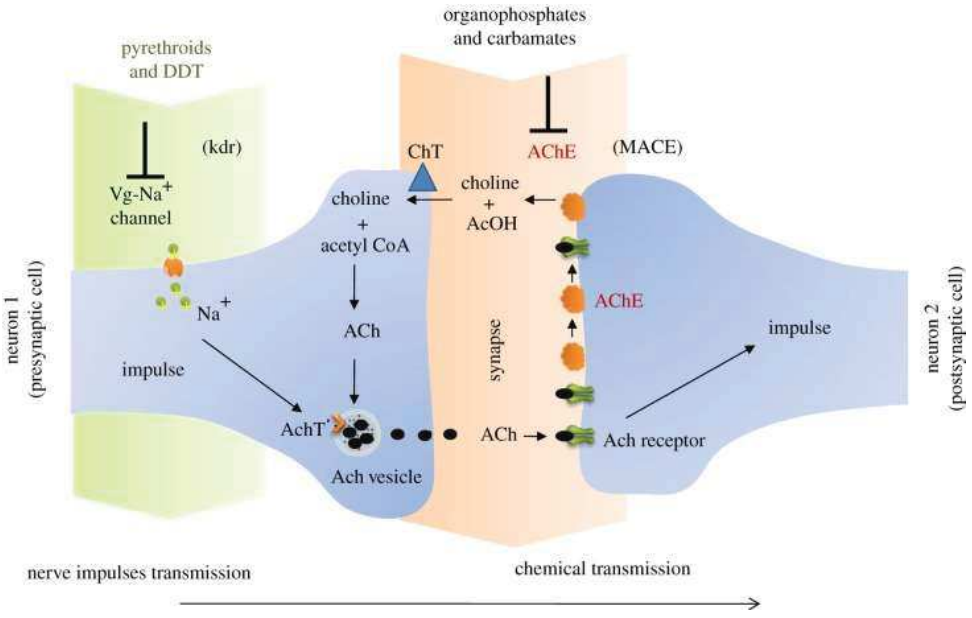

Figure 5 : Cibles biochimiques des insecticides chimiques de synthèse. ACh : Acétylcholine ; AChE : Acétylcholine Estérase ; AchT : Transporteur de l'Acétylcholine ; AcOH : Acide

acétique ; ChT : transporteur de la Choline ; MACE : Acétylcholine Estérase modifié. Source : adapté de (David *et al*. 2013)

1.5.2 Les pyréthrinoïdes

Ce sont des insecticides de synthèse copiés sur les pyréthrines naturelles (extraits des fleurs de chrysanthème). Ils ont le même mode d'action que le DDT (Figure 5). Ils sont peu toxiques pour les mammifères et ont le coefficient de sécurité (rapport de la toxicité pour les insectes et pour les mammifères) le plus élevé comparativement aux autres insecticides utilisés en santé publique. Ils sont également très biodégradables et possèdent des propriétés excito-répulsives. Ces particularités justifient leur utilisation pour imprégner les moustiquaires. Les pyréthrinoïdes sont classés en deux groupes : groupe I et groupe II. Les insecticides du groupe I ne possèdent pas de groupement cyané en α de la liaison ester alors que ceux du groupe II en possèdent. Les pyréthrinoïdes du type II ralentissent la fermeture des canaux sodiques pendant une durée plus longue que ceux du type I. Les moustiquaires distribuées (Permanet 2.0) à la population dans la présente étude sont imprégnées avec la deltaméthrine (type II).

1.5.3 Les organophosphorés

Les organophosphorés sont très hétérogènes. Ils inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine (Figure 5). L'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique empêche la transmission de l'influx nerveux, entrainant la paralysie puis la mort de l'insecte. Les organophosphorés sont moins dangereux pour l'environnement que les organochlorés. Cependant leur rémanence est plus faible (3 mois en moyenne). Récemment, une nouvelle formulation microencapsulée de pirimiphos-méthyl a montré une rémanence plus longue (pouvant aller jusqu'à 10 mois) (Rowland *et al*. 2013). Cette nouvelle formulation est celle utilisée pour la PID dans cette étude et depuis quelques années dans de nombreux programmes de pulvérisations intra-domiciliaires. La Figure 6 montre les principales classes d'insecticides utilisées en PID par les programmes nationaux de 2010 à 2017 (WHO 2018a).

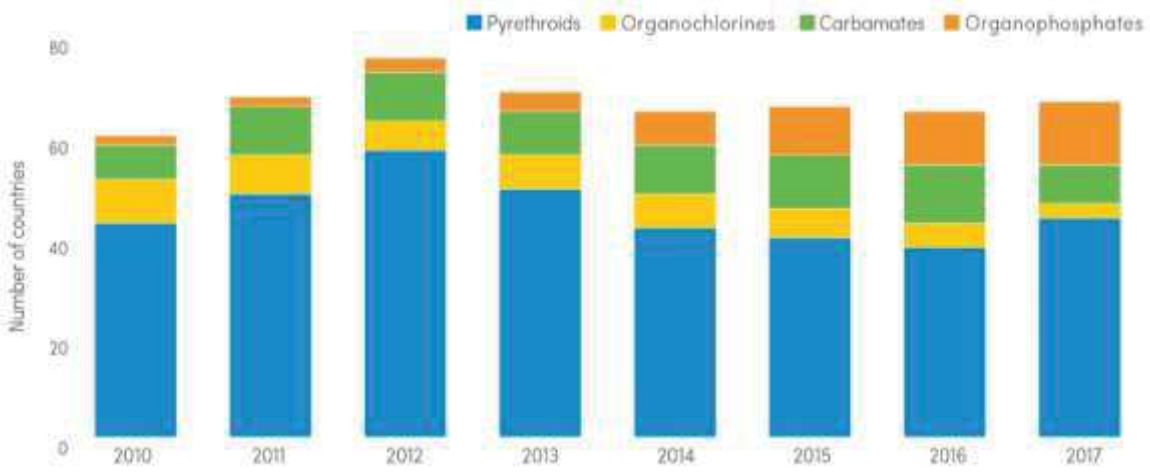

Figure 6 : Les principales classes d'insecticides utilisées en PID par les programmes nationaux de 2010 à 2017. Source : World malaria report 2018

1.5.4 Les carbamates

Ils sont les dérivés de l'acide carbamique et agissent, comme les organophosphorés, en inhibant l'acétylcholinestérase (Figure 5). Toutefois, contrairement aux organophosphorés, l'acétylcholinestérase est capable de se réactiver spontanément après la phosphorylation par un carbamate (Fukuto 1990). Jusqu'à récemment, les carbamates (bendiocarb notamment) étaient beaucoup utilisés pour la PID en Afrique mais à cause de leur faible rémanence (2-6 mois) (WHO 2019) et de l'accroissement de la résistance des vecteurs aux carbamates, ils sont progressivement remplacés par les organophosphorés (pirimiphos-méthyl notamment) (Figure 6).

1.5.5 Les régulateurs de croissance

Ce sont des larvicides qui appartiennent à deux catégories : les juvénoïdes et les ecdysoïdes. Les juvénoïdes (pyriproxifène par exemple) sont des analogues de l'hormone juvénile qui inhibent la nymphose. Les ecdysoïdes (diflubenzuron par exemple) inhibent la sclérification de la chitine de la larve après une mue larvaire ou nymphale causant ainsi la mort. Les régulateurs de croissance ont en général une durée d'efficacité courte (2-7 jours) et une action lente.

1.5.6 Les pyrroles

Le chlorfénapyr, de la classe des pyrroles, est un nouvel insecticide synthétique disponible en santé publique. En 2017, l'OMS a recommandé provisoirement l'utilisation des moustiquaires

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

1.5.7 Les néonicotinoïdes

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

1.5.8 Les toxines bactériennes

Bacillus thuringiensis israelensis (*Bti*) et *Bacillus sphaericus* (*Bs*) sont les deux principales toxines biologiques utilisées contre les larves de moustiques depuis leur découverte au milieu des années 1970. Ce sont des bacilles Gram positif qui se retrouvent dans de nombreux environnements tels que l'eau, les sols et l'air. Le principal avantage de l'utilisation de ces bactéries par rapport aux insecticides chimiques est qu'elles sont très sélectives et sans danger pour les organismes non cibles (WHO 2013). Le *Bti* et le *Bs* produisent lors de leur sporulation des cristaux protéiques qui doivent être ingérés par les larves, dissouts et activés par des enzymes digestives avant d'être toxiques (Figure 7). Les toxines activées se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques et forment des pores dans les membranes des cellules épithéliales. Ceci provoque la lyse des cellules épithéliales puis la mort de l'insecte. Le cristal du *Bs* est une toxine binaire ou Bin, composée de deux protéines nécessaires pour la toxicité. Le cristal du *Bti* a la particularité de comporter quatre toxines principales, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1A (Regis *et al*. 2001). Les larvicides évalués en conditions semi-naturelles et à l'échelle communautaire dans ce travail appartiennent à cette catégorie.

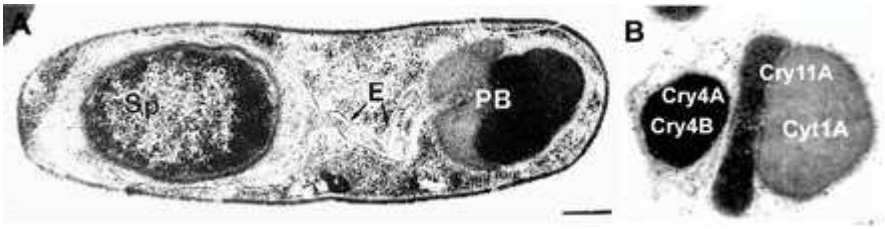

Figure 7 : *Bacillus thuringiensis israelensis* en phase de sporulation (A) et cristal du *Bti* montrant les quatre principales toxines (B). Sp, spore ; E, exosporium ; PB, parasporal body. Source (Federici *et al*. 2003)

1.6 Les mécanismes de résistance des vecteurs aux insecticides

Suite aux importantes pressions de sélection exercées par l'utilisation des insecticides, la résistance des vecteurs de *Plasmodium spp.* aux insecticides est actuellement très fréquente et répandue dans presque toutes les zones endémiques du paludisme du monde (WHO 2018d). Elle implique des mécanismes variés qui empêchent ou réduisent l'interaction des insecticides avec leurs cibles (Figure 8). La résistance des anophèles vecteurs aux insecticides est généralement regroupée en 2 catégories : la résistance physiologique et la résistance comportementale. Les 3 mécanismes de résistance physiologique identifiés sont la modification de la cible de l'insecticide, la résistance métabolique et la résistance cuticulaire (WHO 2018d). Chaque mécanisme de résistance est contrôlé par au moins un gène. Un mécanisme de résistance peut conférer la résistance à une ou plusieurs classes d'insecticides. La présence de plus d'un mécanisme de résistance dans des populations vectrices est très fréquente actuellement. La modification de la cible et la résistance métabolique sont les mécanismes de résistance les plus caractérisés et les plus importants.

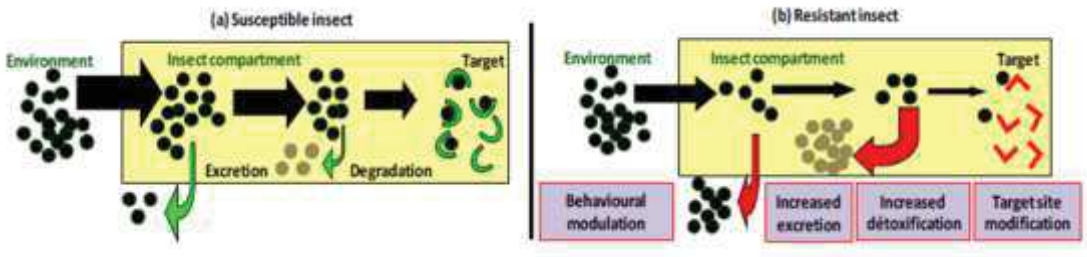

Figure 8 : Mécanismes impliqués dans la résistance physiologique aux insecticides. Source : (Lapied *et al*. 2009)

1.6.1 Modifications de la cible

Il s'agit d'une ou plusieurs mutations sur le gène qui code pour la synthèse de la protéine cible de l'insecticide, ce qui modifie la structure de la protéine et donc diminue l'affinité insecticide-cible. Ces mécanismes confèrent une résistance croisée à tous les insecticides agissant sur une même cible (Carnevale and Robert 2009). Les mutations les plus connues chez *An. gambiae s.l.* sont *kdr* et *ace-1*.

La mutation *kdr,* située sur le gène codant pour le canal sodium, confère une résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT. Il s'agit d'une substitution de la leucine sur le codon 1014 par la phénylalanine (L1014F, anciennement dénommée "*kdr*-ouest") ou par la sérine (L1014S, anciennement dénommée "*kdr*-est"). La mutation *kdr* L1014F est très répandue dans les populations d'*An. gambiae s.l.* étudiées en Afrique de l'Ouest. La mutation *kdr* L1014S est également présente en Afrique de l'Ouest mais sa fréquence est relativement faible (WHO 2018d). C'est en 2017 que cette mutation a été rapportée pour la première fois en Côte d'Ivoire (Chouaïbou *et al*. 2017). Quant à la mutation *kdr* L1014F, elle est proche de la fixation dans le pays (Koffi *et al*. 2013; Sadia-Kacou *et al*. 2017; Camara *et al*. 2018b; Zoh *et al*. 2018).

La mutation *ace-1,* située sur le gène qui code pour l'acétylcholinestérase (G119S), confère une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés. Il s'agit d'une substitution de la glycine sur le codon 119 par la sérine (G119S). Elle est répandue en Afrique de l'Ouest mais retrouvée généralement à des fréquences plus faibles que celles de *kdr* L1014F. Ceci est dû notamment au fort coût de l'allèle *ace-1* (Djogbénou *et al*. 2010). Cependant la présence de l'allèle dupliquée ace-1D chez le vecteur réduit considérablement ce coût (Djogbenou *et al*. 2008; Assogba *et al*. 2015). Notons que l'allèle dupliqué est présent en Côte d'Ivoire (Djogbénou *et al*. 2009; Koffi *et al*. 2013).

1.6.2 La résistance métabolique

La résistance métabolique est due à l'accroissement de l'activité des enzymes qui interviennent dans la détoxification des insecticides. Trois enzymes sont fortement associées à la résistance des vecteurs de *Plasmodium spp.* aux insecticides : les oxydases à cytochrome P-450, les estérases et les glutathion-S-transférases (GST). La surproduction des oxydases a été associée à la résistance aux pyréthrinoïdes (Wondji *et al*. 2012; Edi *et al*. 2014) et celle des estérases à la résistance aux organophosphorés et aux pyréthrinoïdes (Brogdon *et al*. 1999; Vulule *et al*.

1999). La surproduction des GST a été impliquée dans la résistance au DDT (Ranson *et al*. 2001; Riveron *et al*. 2014). Il convient de noter que l'expression accrue de ces enzymes peut entrainer une détoxification d'une gamme plus large d'insecticides. Ces trois enzymes de détoxification ont été surexprimées chez de nombreuses populations d'*An. gambiae s.l.* de la Côte d'Ivoire (Camara *et al*. 2018b; Zoh *et al*. 2018).

1.6.3 La résistance comportementale

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

1.6.2 La résistance cuticulaire

La résistance cuticulaire (diminution de la pénétration) s'explique par une réduction de l'absorption de l'insecticide due à des modifications de la cuticule externe du vecteur. Des études récentes ont montré son implication dans la résistance phénotypique d'*An. funestus* et d'*An. gambiae s.l.* aux pyréthrinoïdes (Wood *et al*. 2010; Balabanidou *et al*. 2016; Yahouédo *et al*. 2017). Néanmoins les informations sur ce type de résistance sont encore trop rares.

1.7 Les stratégies de gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides

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

• Pilier I : planifier et appliquer des stratégies de gestion de la résistance aux insecticides dans les pays endémiques.

• Pilier II : veiller au suivi entomologique en temps utile, à la surveillance de la résistance et à une gestion efficace des données.

• Pilier III : élaborer des outils novateurs de lutte antivectorielle.

• Pilier IV : combler les lacunes de connaissances au niveau des mécanismes de résistance aux insecticides et de l'impact des stratégies actuelles de gestion de la résistance.

• Pilier V : veiller à mettre en place des mécanismes (plaidoyer, ressources humaines et financières) créant des conditions favorables.

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

• La rotation des insecticides : deux insecticides ou plus à modes d'action différents sont utilisés en alternance dans le temps (en général chaque année).

• Les mosaïques : deux insecticides ou plus à modes d'action différents sont utilisés selon une alternance spatiale. Un insecticide est utilisé contre les populations vectrices dans une zone alors qu'un autre insecticide est appliqué contre les vecteurs de la zone adjacente.

• Les mixtures : deux insecticides ou plus à modes d'action différents sont mélangés en une formulation.

• La combinaison d'interventions : deux interventions ou plus à base d'insecticides à mode d'action différents sont déployées simultanément dans une même zone.

1.8 Problématique

Le contexte actuel d'expansion de la résistance des vecteurs aux insecticides et de ralentissement des progrès relance l'intérêt d'évaluer des stratégies complémentaires de lutte

intégrée contre le paludisme. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un essai contrôlé randomisé (ClinicalTrials.gov : NCT03074435) mené en Côte d'Ivoire et au Burkina-Faso pour évaluer l'efficacité additionnelle de quatre stratégies de lutte complémentaires aux MILDA : une stratégie renforcée de l'IEC au sein des populations, la PID à base de pirimiphos-méthyl, la LAL à base de *Bti* et l'ivermectine administrée aux animaux domestiques. Les deux sites choisis pour l'essai étaient les districts sanitaires de Korhogo (Nord de la Côte d'Ivoire) et de Diébougou (Sud-Ouest du Burkina-Faso). La PID et l'IEC ont été conjointement évaluées à Korhogo et à Diébougou. La LAL et l'ivermectine ont été respectivement évaluées à Korhogo et à Diébougou. La présente thèse qui fait partie intégrante du volet entomologique de l'essai mené à Korhogo a pour objectif principal d'évaluer l'impact additionnel de l'IEC, de la PID et de la LAL sur les indicateurs entomologiques du paludisme au Nord de la Côte d'Ivoire. Pour atteindre nos objectifs, nous avons d'abord évalué en conditions semi-naturelles une nouvelle formulation de biolarvicides contre les larves d'*An. gambiae s.s.* dans le but d'étudier la possibilité de l'utiliser pour l'essai. Nous avons ensuite mis à jour le profil entomologique du paludisme (bionomie des anophèles vecteurs, mécanismes de résistance aux insecticides et l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.),* puis identifié et caractérisé les gîtes larvaires d'anophèles à Korhogo, avant la mise en place des interventions de lutte. Enfin, nous avons déployé les stratégies de lutte et mené quatre enquêtes entomologiques pour comparer l'efficacité des combinaisons à l'utilisation de MILDA seules.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1 Description de la zone d'étude

2.1.1 Situation géographique et climatique

L'étude a été menée dans le district sanitaire de Korhogo, situé au Nord de la Côte d'Ivoire en Afrique de l'Ouest. Le Nord de la Côte d'Ivoire est frontalier du Sud du Mali et du Sud-Ouest du Burkina-Faso. Au total, 28 villages du district sanitaire de Korhogo ont été inclus dans l'étude selon des critères démographique (taille de la population de 200-500 habitants), géographique (distance minimale de 2 km entre deux villages) et d'accessibilité en saison pluvieuse.

Le district sanitaire de Korhogo est une zone de savane où la végétation est fonction de la pluviométrie. Les précipitations annuelles varient en moyenne entre 1200 et 1400 mm. Elles entretiennent une savane tantôt arborée dense, tantôt arbustive dégradée. Le climat est de type soudanien avec une alternance de saison sèche (Décembre à Avril) et de saison pluvieuse (Mai à Novembre). La saison sèche est marquée par le vent d'harmattan qui souffle entre Décembre et Janvier et par des pointes de chaleur de Mars à Avril. La température annuelle moyenne varie de 21°C à 35°C mais les températures minimales peuvent descendre jusqu'à 16°C en période d'harmattan.

2.1.2 Hydrographie

La zone d'étude est alimentée par des affluents du fleuve Bandama que sont notamment le Naramou et le Solomougou. Long de 1050 km, le fleuve Bandama prend sa source dans le Nord de la Côte d'Ivoire, à l'Ouest de la ville de Korhogo et s'oriente droit vers le Sud. Le régime des cours d'eau de la zone d'étude est fonction des précipitations.

2.1.3 Activités économiques

La population du district sanitaire de Korhogo, hormis celle de la ville de Korhogo, vit essentiellement de l'agriculture. Elle cultive des produits vivriers comme le riz, le maïs, le mil, le sorgho mais également des cultures commerciales comme le coton et l'anacarde. Le riz est en général cultivé pendant la saison des pluies sur les sols inondés mais il est parfois planté pendant la saison sèche dans les zones irriguées à proximité des barrages. Des cultures

maraîchères telles que les aubergines, le piment, les tomates sont également pratiquées pour la vente. L'élevage est généralement une activité secondaire dans la région et est couramment confié aux bergers peuls.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Étude en conditions semi-naturelles de l'efficacité résiduelle d'une nouvelle formulation de larvicide à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* contre le vecteur majeur des *Plasmodium spp.* en Afrique, *Anopheles gambiae s.s.* (Chapitre 3)

2.2.1.1 Matériel biologique

Les tests ont été réalisés avec les larves d'*An. gambiae s.s.* de la souche Kisumu. Cette souche est originaire du Kenya et ne présente aucun mécanisme de résistance aux insecticides (Shute 1956). Elle a été maintenue pendant des années en conditions contrôlées (température (27 ± 2 °C) et humidité relative (70-80%)) dans l'insectarium de l'Institut Pierre Richet (IPR) à Bouaké, au centre de la Côte d'Ivoire.

2.2.1.2 Formulation larvicide

La formulation testée, ci-après nommée BTBSWAX (ISCA Technologies, Riverside, CA, USA), contient 83,3 g de *B. thuringiensis israeliensis* (serovar H14, *Bti*) et 83,3 g de *B. sphaericus* (serotype H5a5b, strain 2362, *Bs*) par kilogramme. Le BTBSWAX a la consistance du mastic et a pour particularité de flotter à la surface de l'eau et de relarguer progressivement les bactéries après traitement. Il est similaire à la formulation commercialisée SPLAT (Specialized Pheromone & Lure Application Technology), à la seule différence qu'il ne contient pas d'attractant.

2.2.1.3 Dispositif expérimental

L'étude a été conduite du 11 Mars au 4 Avril 2017 dans une zone ouverte, au sein de l'IPR. Nous avons mené deux expérimentations en utilisant respectivement des larves d'*An. gambiae s.s. (*souche Kisumu) du premier stade (L1) et du deuxième stade (L2). Les expérimentations se sont déroulées dans trente-deux (32) plots (30 cm de profondeur x 50 cm de long x 50 cm de large) espacés entre eux de 50 cm. Chaque plot a été protégé avec une section de moustiquaire non imprégnée d'insecticide pour empêcher l'accumulation de débris et les moustiques femelles

sauvages d'y pondre. Le dispositif expérimental, inspiré de celui utilisé par Djènontin *et al.,* a été conçu pour évaluer l'efficacité de la nouvelle formulation larvicide et mesurer l'impact de l'exposition au soleil sur la rémanence du larvicide en conditions semi-naturelles (Djènontin *et al*. 2014). La modification la plus importante apportée au dispositif réalisé par Djènontin *et al.* a été l'utilisation d'auvents (35 x 90 cm de long et 35 cm de haut ; voir Figure 9) pour couvrir la moitié des plots (soit 16 des 32 plots). Nous avons couvert la moitié des plots dans le but d'étudier la variable « ensoleillement direct » compte tenu de la photosensibilité des toxines de *Bti* et *Bs.* Dans chaque expérimentation, nous avons évalué l'efficacité de BTBSWAX à trois doses (1 g/m², 1,5 g/m² et 2 g/m²) dans des plots couverts (non exposés au soleil) et dans des plots non couverts (exposés au soleil).

Ainsi les traitements testés pour chaque expérimentation ont été :

- Témoin (non traité) dans 4 plots couverts
- Témoin (non traité) dans 4 plots non couverts
- BTBSWAX à 1 g/m² dans 4 plots couverts
- BTBSWAX à 1 g/m² dans 4 plots non couverts
- BTBSWAX à 1,5 g/m² dans 4 plots couverts
- BTBSWAX à 1,5 g/m² dans 4 plots non couverts
- BTBSWAX à 2 g/m² dans 4 plots couverts
- BTBSWAX à 2 g/m² dans 4 plots non couverts

Avant chaque expérimentation, les différents traitements ont été attribués au hasard aux 32 plots en utilisant l'application http://www.randomization.com.



Figure 9 : Dispositif expérimental, Institut Pierre Richet, Bouaké, Côte d'Ivoire.

2.2.1.4 Protocole expérimental

Avant chaque expérimentation, tous les plots ont été remplis avec 37,5 litres d'eau du robinet. L'eau du robinet utilisée avait été stockée dans des récipients à l'air libre pendant 24 h pour faire évaporer le chlore. Le niveau d'eau initial a été maintenu dans les plots durant toute la période d'essai. En fonction de la dose, la quantité de BTBSWAX à appliquer dans chaque plot a été pesée (250 mg, 375 mg et 500 mg correspondant respectivement à des doses respectives de 1 g/m², 1,5 g/m² et 2 g/m²). Les quantités de BTBSWAX pesées ont ensuite été séchées à température ambiante à l'obscurité pendant 5 jours. Nous avons ensuite traité manuellement chaque plot suivant les résultats des tirages au sort. Pour la première expérimentation, 50 larves de premier stade ont été lâchées dans chaque plot 0, 6 et 12 jours après traitement. Pour la deuxième expérimentation, nous avons lâché des larves de deuxième stade 0, 10 et 21 jours après traitement. Cinquante larves (50) ont été lâchées dans chaque plot 0 et 21 jours après traitement alors que 30 larves ont été lâchées dans chaque plot 10 jours après traitement en raison du nombre limité de larves disponibles dans l'insectarium. A chaque expérimentation, la fréquence des lâchers dépendait de la durée de développement larvaire dans les plots et de la disponibilité des larves à l'insectarium. Après chaque lâcher, 0,5 g de Tetramin© Baby a été mis dans chaque plot pour servir de nourriture aux larves durant toute la période de suivi. Chaque jour, nous avons vérifié la présence de nymphes dans les plots le matin (à partir de 9 h) et dans l'après-midi (à partir de 16 h). A chaque fois, les nymphes ont été collectées, comptées et mises dans des gobelets en plastique contenant de l'eau du robinet. Les gobelets en plastique étaient

recouverts d'un morceau de moustiquaire non imprégnée d'insecticide jusqu'à l'émergence des moustiques adultes. Ils ont été conservés à la température ambiante dans le laboratoire de l'IPR. Le nombre de moustiques adultes issus de chaque gobelet, donc de chaque plot, a été quotidiennement enregistré. En parallèle au suivi des larves, nous avons mesuré quotidiennement (entre 9h et 12 h du matin) la température et le pH de l'eau dans chaque plot. Les thermomètres (Canac® 7080052, Québec, Canada, précision 1°C ± 0,2%) et les bandes réactives (Mel® 9800- 6pk, Alon, Belgique, précision 1) ont été utilisés respectivement pour les mesures de la température et du pH.

2.2.1.5 Analyses des données

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (R Core Team). Le jeu de données a été structuré de façon à renseigner pour chaque larve le statut final (1 = émergé ; 0 = pas émergé) et le temps (jour après traitement) pendant lequel ce statut a été observé. Le nombre d'adultes compté à un jour x après le lâcher indiquait le nombre de larves ayant le statut « émergé » et le temps x. Le nombre de larves dont le statut est « non émergé » dans chaque cohorte et dans chaque plot a été obtenu en soustrayant le nombre total d'adultes du nombre de larves lâchées. Les données ont été censurées à droite pour que le temps associé aux larves dont le statut était « non émergé » corresponde au temps du suivi (le temps pendant lequel la dernière nymphe a été observée). Pour chaque expérimentation, le risque d'émergence a été analysé à l'aide d'un modèle à effets mixtes de Cox en utilisant le temps, l'exposition au soleil (couvert ou non couvert), le traitement (témoin, 1 g/m², 1,5 g/m² ou 2 g/m²) et l'interaction entre l'exposition au soleil et le traitement comme effets fixes et les plots comme effet aléatoire. Pour ces analyses, la fonction « Coxme » du package « coxme » dans 'R' a été utilisée (Therneau 2018). Les courbes de suivi des larves ont été réalisées à l'aide de la fonction 'survfit' dans la bibliothèque 'survival'.

Nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes (fonction « lmer », package « lme4 ») pour comparer la température de l'eau dans les plots couverts à celle mesurée dans les plots non couverts (Bates *et al*. 2015).

2.2.2 Étude des espèces vectrices, des mécanismes de résistance aux insecticides et de l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires (Chapitre 4)

2.2.2.1 Collecte des moustiques

Nous avons mené 4 enquêtes transversales entomologiques dont 2 en saison pluvieuse (21 Septembre au 10 Octobre 2016, 11 au 29 Avril 2017) et 2 en saison sèche (18 Novembre au 6 Décembre 2016, 14 Février au 4 Mars 2017) dans les 28 villages sélectionnés pour l'étude. A chaque enquête et dans chaque village, les moustiques ont été collectés par capture sur sujet humain (CSH) de 17 heures à 9 heures du matin à l'intérieur et à l'extérieur de 4 maisons habitées (sites de capture). Au total, 32 personnes divisées en deux groupes ont capturé les moustiques à chaque enquête dans un village. Le premier groupe a capturé de 17 heures à 1 heure du matin et le deuxième groupe de 1 heure à 9 heures du matin. Au niveau de chaque site de capture, les binômes ont fait une rotation entre l'intérieur et l'extérieur toutes les heures. Ces rotations ont été organisées pour minimiser les biais liés aux différences d'attractivité pour les moustiques entre les individus. A chaque enquête et dans chaque village, les captures ont été effectuées sous la supervision d'un technicien de l'IPR et de deux agents locaux. Les techniciens ont collecté des données à chaque heure sur la qualité de la capture à l'aide d'un questionnaire (Annexe 1) installé sur des tablettes. Les moustiques ont été collectés durant une nuit par village et par enquête.

L'étude a reçu l'accord du comité national d'éthique (N° 063/MSHP/CNER-kp). Tous les captureurs et superviseurs ont donné leur consentement éclairé pour participer à l'étude. Ils ont été tous vaccinés contre la fièvre jaune. Les captureurs qui étaient diagnostiqués du paludisme durant la période de l'étude ont été traités gratuitement selon les recommandations nationales.



Figure 10 : Un superviseur et un capteur au cours d'une enquête. (Barnabas ZOGO 2016)

2.2.2.2 Traitement des anophèles femelles

Tous les moustiques capturés ont été identifiés sous la loupe binoculaire à l'aide de clés de détermination taxonomique (Gillies and de Meillon 1968; Gillies and Coetzee 1987). Tous les anophèles vecteurs (*An. gambiae s.l.*, groupe *An. funestus* et *An. nili s.l.*) ont été conditionnés individuellement à -20°C dans des tubes eppendorf (1,5 ml) contenant un dessicateur, le gel de silice.

Au laboratoire, nous avons tiré au sort six villages (Tahouelékaha, Koungniguékaha, Lablokaha, Felékaha, Noufré et Karafiné) parmi les 28 villages. A chaque enquête, nous avons choisi au hasard un individu par tranche horaire et par point de capture (intérieur et extérieur). Nous avons analysé tous les vecteurs autres qu'*An. gambiae s.l.* (groupe *An. funestus* et *An. nili s.l.*). Ce sous-échantillonnage a été réalisé à cause du très grand nombre de moustiques *An. gambiae s.l.* collectés.

Nous avons extrait l'ADN de la tête-thorax de chacun des moustiques du sous-échantillon de vecteurs (*An. gambiae s.l.*, groupe *An. funestus* et *An. nili s.l.*) en suivant le protocole décrit par Livak (Livak1984). Nous avons identifié les espèces du complexe *An. gambiae* par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Scott *et al*. 1993; Favia *et al*. 2001). La détermination du génotype des moustiques *An. gambiae s.l.* pour les mutations *kdr* L1014F et *ace-1*^{R} G119S et

la recherche des vecteurs porteurs du sporozoïte de *P. falciparum* ont été faites grâce à la technique de PCR quantitative (qPCR) (Bass *et al*. 2007; Essandoh, Yawson, and Weetman 2013; Boissière *et al*. 2013). Tous les protocoles utilisés ont été détaillés à l'Annexe 2.

2.2.2.3 Analyse des données

La densité agressive (m.a) des vecteurs a été exprimée en nombre de piqûres d'anophèles vecteurs (*An. gambiae s.l*., groupe *An*. *funestus* et *An. nili* s.*l.*) par homme et par nuit. Elle a été calculée en divisant le nombre total de vecteurs capturés (*An. gambiae s.l*., groupe *An*. *funestus* et *An. nili* s.*l.*) par le nombre d'hommes-nuits. L'indice sporozoïtique a été le rapport du nombre de vecteurs avec l'ADN de *P. falciparum* dans la tête-thorax sur le nombre total de vecteurs testés. Le taux d'inoculation entomologique pour chaque enquête a été calculé en multipliant la densité agressive des vecteurs par l'indice sporozoïtique. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel R (R Core Team).

Pour comparer la densité agressive entre les enquêtes et entre la position du captureur (intérieur/extérieur), nous avons analysé les vecteurs capturés (tous les anophèles vecteurs) à l'aide d'un modèle binomial négatif à effets mixtes (function 'glmer' du package lme4) (Brooks *et al*. 2017). Les variables fixes étaient l'enquête, la position du captureur (intérieur/extérieur) et leur interaction. Nous avons en plus introduit dans le modèle un effet aléatoire au niveau village et le point de capture comme un effet aléatoire niché au sein du village.

L'indice sporozoïtique a été comparé entre les enquêtes, les espèces vectrices et la position du captureur (intérieur/extérieur) en utilisant un modèle binomial à effets mixtes (fonction 'glmer' du package lme4). L'enquête, l'espèce vectrice et la position du captureur étaient les variables fixes et nous avons tenu compte d'un effet aléatoire au niveau village.

Pour les deux modèles, les variables ont été sélectionnées par "backward stepwise deletion" (on retire du modèle une à une les variables les moins significatives sans que cela n'affecte la qualité prédictive du modèle). Le test post hoc de Tukey a permis de comparer le nombre de vecteurs capturés entre les enquêtes en utilisant le modèle final. Pour comparer les activités de piqûres d'*An. gambiae s.l.* en fonction des enquêtes, nous avons comparé la distribution des temps de collecte en utilisant les tests de Kruskall-wallis et de comparaisons multiples de Dunn (fonction « dunn Test » du package VIA dans R).

Les comparaisons des fréquences alléliques des gènes *kdr* et *ace-1^R* entre *An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii*, entre les enquêtes et entre les villages ont été faites en utilisant le test exact de Fisher à l'aide du logiciel Genepop (version 4.7) qui a été exécuté dans R (Raymond and Rousset 1995). Pour chaque allèle (*kdr* et *ace-1^R*), à chaque enquête et dans chaque village, les fréquences génotypiques observées chez chaque espèce du complexe *An. gambiae* ont été comparées aux proportions attendues sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg en utilisant les tests exacts contenus dans le logiciel Genepop 4.7 (Raymond and Rousset 1995).

2.2.3 Identification et caractérisation des gîtes larvaires d'*Anopheles spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires (Chapitre 5)

2.2.3.1 Prospection, identification des gîtes larvaires d'anophèles et mesure de leur productivité en larves d'anophèles et en nymphes

Nous avons mené deux enquêtes de prospections larvaires dans chacun des villages de la zone d'étude : 1 pendant la saison pluvieuse (du 28 Octobre au 8 Novembre 2016) et 1 en saison sèche (du 16 au 27 Mars 2017). Les prospections ont été réalisées dans un rayon de 2 km autour de chacun des villages. A chaque enquête, la recherche des stades immatures de moustiques (larves et/ou nymphes) a été faite par la méthode de « dipping » (WHO 1992). Cette méthode consiste à plonger délicatement la louche dans l'eau du gîte et à transvaser le contenu dans un récipient pour y rechercher les larves et/ou les nymphes. Avant les plongées, 1 à 2 minute (s) ont été nécessaires pour permettre aux larves et nymphes, si elles étaient présentes, de remonter à la surface de l'eau. En fonction de la surface du gîte, nous avons réalisé 2 à 10 plongées de louche à différents endroits du gîte. Un gîte a été considéré comme positif quand il y avait au moins une larve d'anophèle. Les larves collectées ont été identifiées morphologiquement au niveau du genre puis dénombrées (Gillies and Coetzee 1987). Nous avons ensuite enregistré les moyennes des densités larvaires et nymphales obtenues dans chaque gîte. Les techniciens ont été assistés dans chaque village par 2 agents locaux qui ont servi de guides et ont facilité l'identification des collections d'eau.



Figure 11 : Un technicien collectant les larves au cours d'une enquête. (Barnabas ZOGO 2016)

2.2.3.2 Caractérisation des gîtes larvaires d'anophèles

Les coordonnées géographiques de tous les gîtes positifs rencontrés au cours des deux enquêtes ont été enregistrées en utilisant des tablettes (Samsung Galaxy version 7.0 Plus) dotées d'un GPS (Geographical Positioning System) intégré. Chaque gîte positif a été décrit visuellement suivant des variables environnementales et physiques. Les techniciens ont été formés pendant 3 sessions pour assurer l'uniformité et la cohérence de la méthode de travail. Ainsi, pour chaque gîte larvaire positif, le type de gîte (rizière, mare, flaque, canal d'irrigation, pompe villageoise, drain, trace de pas, marigot) a été précisé et la surface a été classée dans l'une des trois catégories suivantes : i) petite surface (< 1 m²) ou ii) surface moyenne (1–10 m²) ou iii) grande surface (> 10 m²). Le gîte larvaire a été considéré comme i) transparent quand l'eau était claire ou ii) boueux, quand le fond de la louche était visible malgré la présence de la boue ou iii) très boueux, quand le fond de la louche n'était pas visible. La distance de la zone habitée a été estimée et classée dans l'un des trois groupes suivants : i) ≤ 100 m ou ii) 101–500 m ou (iii) > 500 m. L'entourage du gîte larvaire a été apprécié et décrit comme : i) habitat dense, quand plus de 20 habitations se trouvaient dans un rayon de 50 m autour du gîte ou ii) habitat peu dense, quand moins de 20 habitations se trouvaient dans un rayon de 50 m autour du gîte ou iii) zone verte, quand aucune habitation ne se trouvait dans un rayon de 50 m autour du gîte. Le niveau d'exposition au soleil a été décrit comme i) ensoleillé, quand au moins le 3/4 du gîte larvaire

était exposé au soleil ou ii) ombragé, quand moins du 1/4 du gîte larvaire était exposé au soleil ou iii) partiellement ombragé, quand plus du 1/4 et moins du 3/4 du gîte larvaire était exposé au soleil. Le type de culture (riz, maïs, coton, etc.) qui entoure le gîte larvaire, le mouvement de l'eau (stagnant ou courant), la densité des larves de *Culex spp.* la densité des larves de *Aedes spp.*, la présence des autres insectes, de poissons, de têtards, de déchets solides et de déchets liquides ont été enregistrées. Toutes ces données ont été recueillies sur des tablettes sous forme de formulaires à l'aide du logiciel Open Data Kit (ODK).

2.2.3.3 Analyses des données

Nos résultats ont été analysés avec le logiciel R (R Core Team). Pour chaque variable d'intérêt (type de gîte, surface, turbidité, exposition au soleil, distance de la zone habitée, entourage et la cohabitation avec *Culex spp.*), nous avons effectué un test de khi-carré pour comparer la distribution des gîtes larvaires dans les différentes catégories entre la saison sèche et la saison pluvieuse. Le test de khi-carré de Pearson avec une p-value obtenue par simulation (2000 répliques) a été utilisé lorsque les conditions n'étaient pas remplies pour faire un test de khi-carré.

Pour analyser la densité des larves d'anophèles dans les gîtes en fonction des variables à expliquer, nous avons utilisé un modèle binomial négatif mixte tronqué en zéro (fonction 'glmmadmb' du package *glmmADMB* (Skaug *et al*. 2012). Un modèle tronqué en zéro a été utilisé car seuls les gîtes positifs à *Anopheles spp.* ont été décrits. Dans le modèle, la variable « village » a été introduite comme un effet aléatoire pour gérer l'autocorrélation spatiale entre les gîtes larvaires d'une même zone tampon. Les variables dans le modèle final ont été sélectionnées par "backward stepwise deletion". Nous avons utilisé la même approche pour analyser la présence (avec un modèle binomial, fonction 'glmer' du package 'lme4'(Bates *et al*. 2015)) et la densité des nymphes (avec un modèle binomial négatif, fonction 'glmmadmb').

Nous avons effectué des regroupements de classes pour certaines variables (type de gîte, prédateur et turbidité) pour supprimer les modalités qui étaient très peu représentées. Ainsi, les flaques et les mares ont été regroupées dans une modalité commune nommée : « gîtes naturels de tailles variables ». Les tranchées agricoles, les drains et les canaux d'irrigation ont été regroupés dans la modalité nommée « gîtes larvaires, autres que les casiers de riz qui sont causés par l'agriculture ». Les pas des hommes et les pattes d'animaux, les abreuvoirs et les

pompes villageoises ont été regroupés dans la modalité nommée « gîtes anthropiques ». Nous avons également créé une catégorie qui regroupe tous les prédateurs potentiels (têtards, poissons, mollusques, autres insectes, etc.) présents dans les gîtes larvaires. Les modalités « boueux » et « très boueux » ont été aussi regroupées.

2.2.4 Impact des combinaisons d'interventions (MILDA + IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL) sur la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo (Chapitre 6)

2.2.4.1 Recensement des populations de la zone d'étude

Nous avons mené une enquête dans 35 villages présélectionnés du district sanitaire de Korhogo du 02 au 19 Août 2016 pour actualiser les données de recensement et pour identifier chaque unité de couchage. L'enquête a été menée pour permettre de sélectionner les 28 villages pour l'essai et pour servir de base pour la campagne de distribution des MILDA. Les agents recenseurs, au nombre de 10 au total, ont d'abord été formés avant d'être déployés par groupes de deux dans les villages. Dans chaque village, ils ont été accompagnés d'un guide local, un agent de santé communautaire (ASC) si c'était possible. Ils ont visité tous les ménages et avec le consentement des chefs de ménage, ont collecté et enregistré des informations dont le nombre d'habitants, leurs âges, le nombre de couchages habituels, le nombre de moustiquaires imprégnées présentes. Les données ont été collectées sur des tablettes à l'aide d'un formulaire utilisant le logiciel Open Data Kit (ODK).

2.2.4.2 Constitution des bras de traitement

Les quatre interventions ou bras (MILDA + IEC, MILDA + PID, MILDA + LAL et MILDA seules) de l'essai ont été aléatoirement attribués aux 28 villages selon le plan présenté dans le tableau 2. Pour ce faire, nous avons effectué un tirage aléatoire direct en attribuant un chiffre tiré au hasard à chaque village. Les villages ont ensuite été classés par ordre croissant dans les différents bras.

Tableau 2 : Nombre de villages randomisé par bras

Bras	Nombre de villages
Témoin	8
Larvicides	8
PID	6
IEC	6
Total	28

2.2.4.3 Distribution des MILDA

Nous avons distribué les moustiquaires imprégnées de deltaméthrine (PermaNet®2.0) du 26 Mai au 6 Juin 2017 dans les 28 villages. Avant la distribution, les populations de chaque village ont été informées par les agents de santé communautaire (ASC) des dates de visite. Les moustiquaires ont été distribuées à raison d'une moustiquaire par unité de couchage. Le recensement de la population réalisé par notre équipe du 02 au 19 Août 2016 avait permis de déterminer le nombre théorique de moustiquaires (4237) nécessaires pour couvrir entièrement chaque ménage dans chaque village. Un site de distribution a été choisi par les autorités de chaque village. Dans chaque village, l'équipe de distribution a été constituée de 2 personnes de l'IPR appuyées par un agent de santé communautaire (ASC) du village qui servait d'interprète. Les moustiquaires ont été octroyées aux chefs de ménage (ou leurs représentants). Nous avons déchiré les emballages avant la remise des moustiquaires aux populations pour décourager la vente de l'outil. Les MILDA ont également été distribuées aux ménages et aux couchages non enregistrés pendant le recensement. Au total, nous avons distribué 4705 moustiquaires dans les 28 villages.



Figure 12 : Une femme d'un village de l'étude recevant des MILDA PermaNet®2.0 au cours de la campagne de distribution. (Barnabas ZOGO 2017)

2.2.4.4 Mise en place de la stratégie renforcée de l'IEC au sein des populations

La stratégie renforcée d'IEC a été menée du 1 Septembre 2017 au 31 Août 2018 par une organisation non gouvernementale (ONG), l'Association Ivoirienne pour le Progrès (AIP), sous-récipiendaire du Fonds Mondial sous la supervision de l'ONG « Save The Children », récipiendaire principal du Fonds Mondial pour le volet communautaire en Côte d'Ivoire. Cette stratégie a utilisé les mêmes approches de communication de proximité que celles utilisées par le PNLP de la Côte d'Ivoire pour sensibiliser les populations à l'utilisation correcte et régulière des MILDA. Ces approches sont notamment des entretiens individuels à travers des visites à domiciles, des causeries interpersonnelles avec les chefs de famille et des causeries de groupe. La seule différence majeure entre la stratégie renforcée de l'IEC implémentée et évaluée dans cette étude et celle mise en œuvre par le PNLP réside dans le nombre de relais communautaires déployés par village. En effet, la stratégie renforcée de l'IEC a consisté à former et déployer un relais communautaire pour au plus 35 ménages alors qu'en général, à l'échelle nationale et dans notre zone d'étude, un relais communautaire a à sa charge au moins un village mais le plus fréquemment il est en charge de plusieurs villages. Au total 13 relais communautaires ont été déployés dans les 6 villages sélectionnés. Ils ont été formés pendant 3 jours (24-26 Août 2017) à Korhogo par un agent d'AIP. Ils ont été suivis par ce même formateur accompagné d'un superviseur (AIP) pendant les premières semaines. Chaque relais était chargé de mener en

moyenne 15 visites à domicile, 20 causeries interpersonnelles avec les chefs de ménage et 1 causerie de groupe chaque mois. Le superviseur a poursuivi son travail pendant toute la durée de l'intervention jusqu'en Août 2018 en envoyant un rapport de supervision mensuel à la coordination générale du projet. Il convient de noter que je n'ai pas été impliqué dans la mise en œuvre de cette stratégie.



Figure 13 : Un relais communautaire au cours d'une séance de causeries de groupe. (Josué KRAMO KOUAKOU 2017)

2.2.4.5 Mise en place des pulvérisations intradomiciliaires

La formulation insecticide utilisée pour traiter les murs a été l'Actellic 300 CS (Syngenta, Suisse) à base du pirimiphos-méthyl à 300 g/l. Nous avons traité les murs une seule fois à la dose cible de 1 g a.i/m² du 4 au 7 Octobre 2017 dans les 6 villages. Pour parvenir à cette dose sur les murs, une bouteille d'Actellic® 300 CS (833 ml) a été diluée dans 10 litres d'eau et le mélange a été appliqué sur une surface d'environ 250 m^2. Les traitements ont été faits à l'aide d'un pulvérisateur HudsonX-pert (Chicago, États-Unis), recommandé par l'OMS. D'une capacité de 11,4 litres, le pulvérisateur HudsonX- permet de pulvériser à une pression de 4,3 bars. Les pulvérisations ont été faites par 24 opérateurs bien formés et régulièrement employés par le PNLP du Burkina-Faso pour les PID. Ceux-ci avaient utilisé l'équipement de protection (masque, chapeau, gants, lunettes, combinaison, bottes) nécessaire pour l'opération (photo 6). Avant les pulvérisations, les populations ont été informées et instruites quant aux précautions à prendre. Les principales précautions consistaient à sortir la nourriture, la vaisselle, les vêtements et les récoltes des maisons avant les pulvérisations. A la fin de chaque journée, les

équipements de protection et le matériel utilisé ont été lavés dans les aires de lavage construites dans le cadre de l'essai.



Figure 14 : Un opérateur traitant un mur. (Barnabas ZOGO 2017)

2.2.4.6 Les traitements larvicides

Les gîtes larvaires ont été traités avec le *Bacillus thuringiensis israelensis* commercial en granulés dispersibles, VectoBac®WG (Valent BioSciences Corporation, IL, USA). Les traitements ont été effectués toutes les semaines du 16 Novembre 2017 au 15 Avril 2018 à la dose de 200 g/ha dans chaque village. Ils ont été effectués par 3 techniciens formés pour traiter les collections d'eau à une vitesse de 54 mètres/minute et suivant une largeur de bande de 10 mètres (Fillinger *et al*. 2008). Le nombre de techniciens déployé par village dépendait du nombre et de la surface de gîtes à traiter. Les traitements ont été faits à l'aide d'un pulvérisateur IK vector control qui a été conçu spécialement pour être utilisé dans la lutte antivectorielle. Le pulvérisateur IK vector control est muni d'un régulateur de pression qui permet de maintenir constant les principaux paramètres de pulvérisation (pression, angle, débit, taille des gouttelettes) pendant l'application. Pour faciliter l'identification des collections d'eau à traiter, les techniciens étaient munis de GPS dans lesquels avaient été préalablement enregistrées les coordonnées géographiques des collections d'eau potentielles à traiter. Ces collections d'eau potentielles étaient constituées de tous les gîtes larvaires identifiés pendant les enquêtes préliminaires et des bas-fonds supplémentaires que nous avions identifiés grâce à l'application

« Google Earth ». Les techniciens ont également été assistés dans chaque village par 3 agents locaux qui indiquaient les autres collections d'eau présentes dans le village. Notons que seules les collections d'eau peu profondes (<20 cm de profondeur) qui se retrouvaient dans un rayon de 2 km autour de chaque village ont été traitées. Des tampons de 2 km autour des villages avaient été transférés dans les GPS pour servir de balise sur la zone à traiter.



Figure 15 : Un technicien traitant un gîte. (Barnabas ZOGO 2017)

2.2.4.7 Contrôle de la qualité de la stratégie renforcée de l'IEC au sein des populations

A la fin de chaque mois, les relais communautaires ont réalisé des entretiens avec les chefs de ménage ou leurs représentants afin de capturer l'utilisation des MILDA au sein des populations. Pendant ces entretiens, ils ont collecté les informations sur tous les membres de chaque foyer. Les données recueillies incluaient notamment l'âge, le sexe et l'utilisation ou non de MILDA la veille.

2.2.4.8 Contrôle de la qualité des pulvérisations intradomiciliaires

Pour évaluer la qualité des traitements, nous avons tiré au sort deux villages parmi les 6 qui ont reçu le traitement PID. Dans chacun de ces villages, six maisons dont 3 en ciment et 3 en banco ont été choisies au hasard. Les supports ciment et banco ont été choisis car ils constituent les deux principaux types de mur dans la zone d'étude. Nous avons posé deux papiers Whatman

(10 cm x 10 cm) sur chacune des surfaces intérieures des quatre murs des maisons choisies avant la pulvérisation. Un des deux papiers posés sur chaque surface de mur avait un côté plastifié pour tester l'hypothèse selon laquelle l'interaction avec le mur diminue la concentration de l'insecticide sur le papier après la pulvérisation (Moiroux *et al*. 2018). Tous les papiers posés sur les surfaces des murs ont été récupérés 48 heures après la pulvérisation. Ils ont été individuellement étiquetés et emballés dans du papier aluminium. Les échantillons emballés ont été stockés dans un réfrigérateur à +4°C avant d'être envoyés à Gembloux, en Belgique, pour les analyses chimiques.

2.2.4.9 Contrôle de la qualité des traitements larvicides

Chaque semaine, nous avons tiré au sort 3 des 8 villages de l'étude qui ont reçu le traitement larvicide pour évaluer la qualité des traitements. Un technicien qui n'était pas impliqué dans les traitements des gîtes était chargé de cette activité. Le lendemain des traitements dans un village tiré au sort, il prélevait 1 L d'eau de deux gîtes (collections d'eau de moins de 20 cm de profondeur) choisis au hasard. Les tests de contrôle-qualité ont consisté à exposer 20 larves de la population locale d'*An. gambiae s.l.*, de stade L2 à 15 cl d'eau de chaque gîte prélevé. L'eau de gîtes non traités (prélevée avec les larves de la population locale) a été utilisée comme témoin. La mortalité des larves a été lue après 24 h et 48 h.

2.2.4.10 Mesure de l'impact des stratégies de lutte complémentaires sur les indicateurs entomologiques du paludisme

Nous avons conduit 4 enquêtes entomologiques (Octobre-Novembre 2017, Novembre-Décembre 2017, Janvier 2018 et Mars-Avril 2018) pour évaluer l'efficacité additionnelle des 3 combinaisons (MILDA+ IEC, MILDA+ PID et MILDA+ LAL) sur la transmission des *Plasmodium spp.* La méthode de capture était la même que celle utilisée pendant les enquêtes de pré-intervention.

Au laboratoire, nous avons réalisé un sous-échantillonnage en tirant au sort au plus 70 *An .gambiae s.l.* capturés entre 22h et 6h du matin par village et par enquête. Tous les *An. gambiae s.l.* capturés entre 17 h et 22 h et entre 6 h et 9 h du matin et tous les *Anopheles* autres qu'*An. gambiae s.l.* capturés ont été analysés. Les moustiques ont été analysés en suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour traiter les échantillons de pré-intervention. Il convient de préciser que pour la recherche des vecteurs infectés, nous avons utilisé cette fois-ci une PCR

multiplexe qui permet de détecter la présence des 4 espèces principales du parasite (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) chez le vecteur. Les détails des protocoles utilisés se trouvent en Annexe 2.

2.2.4.11 Analyse des données

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team). Nous avons comparé la concentration de pirimiphos-méthyl entre les types de mur (ciment et banco) et entre les types de papiers filtres (papiers classiques et papiers avec un côté plastifié) en utilisant un modèle linéaire à effet mixte (fonction 'lmer' du package 'lme4') avec le village comme effet aléatoire et la maison comme effet aléatoire niché (Bates *et al*. 2015).

Nous avons modélisé la densité des vecteurs, l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique (TIE) en utilisant la fonction 'glmmTMB du package 'glmmTMB' (Magnusson *et al*. 2017).

Pour chaque enquête et pour les quatre enquêtes combinées, nous avons comparé la densité des vecteurs dans les bras MILDA + IEC et MILDA + PID à celle observée dans le bras MILDA seules à l'aide d'un modèle binomial négatif à effets mixtes avec le village comme effet aléatoire et le point de capture comme effet aléatoire niché au sein du village. Nous avons inséré dans le modèle, la densité moyenne obtenue à chaque poste de capture pendant la période de pré-intervention comme une variable explicative. Nous avons procédé de la même manière pour comparer la densité des vecteurs entre les bras MILDA + LAL et MILDA seules, à la seule différence que nous n'avons considéré que les trois enquêtes qui ont eu lieu après le démarrage des traitements anti-larvaires.

Pour les quatre enquêtes combinées, nous avons comparé l'indice sporozoïtique observé dans les bras MILDA + IEC et MILDA + PID à celui observé dans le bras MILDA seules en utilisant un modèle binomial avec l'enquête et le village comme des effets aléatoires. Pour comparer l'indice sporozoïtique entre le bras MILDA + LAL et MILDA seules, nous avons considéré les trois enquêtes qui ont été menées après le démarrage des traitements anti-larvaires et nous avons procédé comme précédemment.

Pour analyser le TIE, nous avons d'abord prédit (fonction 'predict') pour chaque individu de vecteur capturé la probabilité d'être infecté à l'aide des modèles de l'indice sporozoïtique car

nous n'avons analysé au laboratoire qu'un sous-échantillon de vecteurs. Nous avons ensuite modélisé le logarithme de la nouvelle variable avec un modèle linéaire à effet mixte.

2.2.4.12 Synthèse des activités de terrain : Chronogramme

Pour conclure cette partie méthodologique du manuscrit, le chronogramme des activités de terrain que j'ai menées peut être résumé de la façon suivante : collectes de données entomologiques avant les interventions, mise en place des interventions et collectes de données après les interventions (Figure 16).

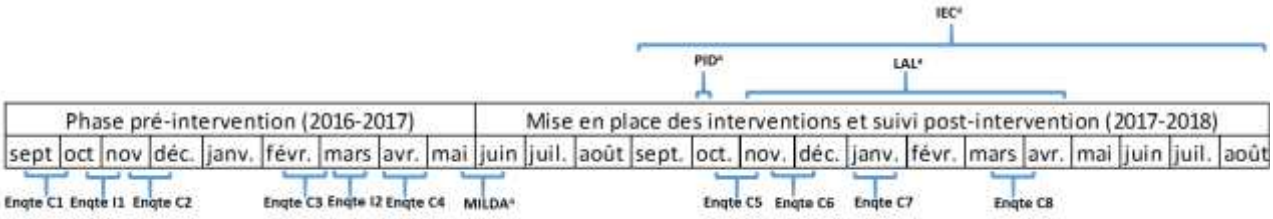

Figure 16 : Chronogramme des activités de collecte de données et de mise en place des interventions. Enqte C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 et C8 représentent les enquêtes de collecte des moustiques ; Enqte I1 et Enqte I2 représentent les enquêtes d'identification et de caractérisation des gîtes larvaires ; [a] représente la mise en place de l'intervention.

Chapitre 3. Étude en conditions semi-naturelles de l'efficacité résiduelle d'une nouvelle formulation de larvicide à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* contre le vecteur majeur des *Plasmodium spp.* en Afrique, *Anopheles gambiae s.s.*

Depuis la découverte de leur potentiel larvicide contre les moustiques vecteurs de pathogènes, *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) et *Bacillus sphaericus* (*Bs*) ont été utilisés dans plusieurs pays car ils sont d'origine biologique et sont très spécifiques (Bukhari *et al*. 2013). Malheureusement, l'émergence rapide de populations vectrices résistantes au *Bs* a freiné son utilisation (Adak *et al*. 1995; Rao *et al*. 1995; Poopathi *et al*. 1999; Chevillon *et al*. 2001). A l'opposé, la résistance au *Bti* n'a jamais été rapportée malgré son utilisation intensive sur plusieurs années (Becker and Ludwig 1993; Vasquez *et al*. 2009). La probabilité de développement de résistance au *Bti* est très faible car elle implique le développement de mécanismes de résistance contre chacune des quatre toxines (Cyt, Cry4A, Cry4B, et Cry11A) responsables des propriétés insecticides de la bactérie. Il a été également montré que la toxine Cyt agit en synergie avec les toxines Cry4A, Cry4B, et Cry11A pour supprimer la résistance croisée aux toxines Cry. Ceci s'explique par le fait que la toxine Cyt ne nécessite pas de récepteur spécifique sur la membrane intestinale du moustique et peut servir de récepteur membranaire pour les toxines Cry (Bravo *et al.* 2007). Cependant, des auteurs ont rapporté une sensibilité réduite au *Bti* chez des populations d'*Aedes*, de *Culex* et même d'*Anopheles* après de multiples applications (Hongyu *et al*. 2004; Paul *et al*. 2005; Boyer *et al*. 2012).

Pour réduire les risques de résistance aux larvicides biologiques, le mélange du *Bti* et du *Bs* est apparu comme une option de choix. En effet, il s'est révélé plus efficace pour empêcher l'apparition de la résistance aux biolarvicides que la rotation du *Bs* avec le *Bti* (Zahiri and Mulla 2003). Les études au laboratoire ont aussi révélé que l'ajout des toxines Cyt aux toxines de *Bs* (Bin) augmente l'efficacité du mélange car les toxines Cyt du *Bti* peuvent servir de récepteurs pour les toxines Bin (Georghiou and Wirth 1997). L'ajout du *Bs* au *Bti* présente également un avantage particulier dans les gîtes larvaires turbides où les toxines du *Bs* persistent plus longtemps que celles du *Bti* (Nicolas 1990). La plus longue persistance des toxines du *Bs* dans l'eau turbide s'expliquerait par le fait que le cristal du *Bs* est fortement lié à la spore par un exosporium qui offrirait au complexe spore/cristal une protection contre les facteurs environnementaux (Nicolas 1990).

De nos jours, les biolarvicides sont développés sous des formulations variées (poudre mouillable, suspension concentrée, granulés, granulés dispersables dans l'eau, tablettes effervescentes, etc.) qui sont adaptées à divers types de gîtes larvaires. Cependant, la durée d'efficacité de ces formulations est généralement faible (<10 jours) sur le terrain (Davidson *et al*. 1981; Skovmand and Sanogo 1999; Fillinger *et al*. 2003). Ceci peut s'expliquer par des facteurs tels que la température, les rayons ultaviolets, le pH qui influent négativement sur les bactéries. Par conséquent, des traitements réguliers et donc des coûts opérationnels conséquents, sont requis pour obtenir une bonne efficacité des biolarvicides sur le terrain. Sachant que le *Bti* et le *Bs* sédimentent rapidement après les traitements, une formulation qui les maintient en surface pourrait optimiser leur efficacité contre les larves d'anophèles. Malheureusement, la technologie pour exploiter cette possibilité a été longtemps recherchée, mais sans grand succès.

Une nouvelle formulation, ci-après dénommée BTBSWAX, à base du mélange de *Bti* et *Bs* a été récemment développée. Elle se présente sous la forme d'une émulsion de matrice et de cire et a pour particularités de flotter à la surface de l'eau et de relarguer progressivement les bactéries. L'évaluation au laboratoire d'une formulation similaire contre *Culex quinquefasciatus* a donné des résultats très intéressants, avec notamment une durée d'efficacité de plus de 5 semaines contre des larves de premier stade (Schorkopf *et al*. 2016). La présente étude a pour objectif d'évaluer en conditions semi-naturelles l'efficacité et l'activité résiduelle de la formulation BTBSWAX contre le vecteur majeur des *Plasmodium spp.* en Afrique, *An. gambiae s.s.*. Pour ce faire, nous avons mené deux expérimentations en exposant respectivement des larves d'*An. gambiae s.s.* du premier stade (L1) et du deuxième stade (L2) à trois doses du BTBSWAX (1 g/m², 1,5 g/m² et 2 g/m²). Dans chaque expérimentation, les larves ont été exposées dans des plots couverts (non exposés au soleil) et dans des plots non couverts (exposés au soleil) pour mesurer l'effet du facteur environnemental « exposition au soleil » sur l'activité résiduelle de BTBSWAX. La nouvelle formulation a été évaluée dans le but d'étudier la possibilité de l'utiliser dans les villages de Korhogo pour l'essai contrôlé randomisé. Les résultats ont montré que la formulation BTBSWAX était efficace contre les larves d'*An. gambiae s.s.* mais sa rémanence à la dose évaluée la plus élevée (2g/m²) dans les plots couverts et non couverts n'a pas excédé 10 jours. L'exposition au soleil a réduit l'activité larvicide du BTBSWAX contre les larves L1 d'*An. gambiae s.s.* d'au moins 6 jours. Une tendance à une efficacité de BTBSWAX supérieure contre les larves exposées au premier stade

que contre celles exposées au deuxième stade a été observée. Ces résultats montrent que l'efficacité résiduelle de BTBSWAX est comparable à celle des formulations actuellement recommandées par l'OMS. Ils démontrent aussi l'importance de développer des formulations protégeant les bactéries biologiques des rayons du soleil. Pour ce qui concerne l'essai contrôlé randomisé, nous avons choisi la formulation Vectobac WG qui est recommandée par l'OMS et qui est bien adaptée aux traitements des gîtes larvaires d'anophèles sur le terrain (Bukhari *et al* 2013). Cette formulation a été utilisée dans de nombreuses études menées à l'échelle communautaire (Majambere *et al*. 2007; Fillinger *et al*. 2009).

Zogo *et al. Malar J* (2019) 18:55
https://doi.org/10.1186/s12936-019-2687-0

Malaria Journal

RESEARCH Open Access

Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*

Barnabas Zogo[1,2,3*], Bertin N'Cho Tchiekoi[1], Alphonsine A. Koffi[1], Amal Dahounto[2,4], Ludovic P. Ahoua Alou[1], Roch K. Dabiré[4], Lamine Baba-Moussa[3], Nicolas Moiroux[2,4] and Cédric Pennetier[1,2]

Abstract

Background: Biotic and abiotic factors have been reported to affect the larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) and *Bacillus sphaericus* (*Bs*), although the extent to which they are affected has been poorly documented. This paper studies the effect of sunlight exposure on the efficacy of a new larvicide formulation based on both *Bti* and *Bs*, herein after referred to as BTBSWAX, applied against two different larval stages.

Methods: The emergence of inhibition exhibited by BTBSWAX at three different dosages (1 g/m^2, 1.5 g/m^2, and 2 g/m^2) was monitored under semi-field conditions using a total of 32 containers comprising 16 that were covered and 16 that were uncovered. Two experiments were conducted using first- and second-instar larvae of *Anopheles gambiae*, respectively.

Results: BTBSWAX at 2 g/m^2 in covered containers exhibited high emergence inhibition (> 80%) when larvae were exposed from 1st instar on day-6 post-treatment, whereas the emergence inhibition was only 28% in uncovered containers. For larvae exposed from 1st instar on day-12 post-treatment, the emergence inhibition was moderate (70%) in covered containers but was low (< 20%) in uncovered containers. For larvae exposed from 2nd instar on day-10 post-treatment, the emergence inhibition was moderate (31%) in covered containers but was very low (< 10%) in uncovered containers. Moreover, the residual efficacy of BTBSWAX was markedly affected by environmental stresses, including sunlight exposure (Hazard ratio (HR) = 0.12, $p < 0.001$ and HR = 0.63, $p = 0.033$ for BTBSWAX at 2 g/m^2 against 1st and 2nd instar larvae, respectively).

Conclusion: These findings emphasize the impact of environmental variables (e.g., sunlight exposure) on the residual efficacy of *Bti* and *Bs* biolarvicides in the field. They hence highlight the need to take these factors into account for larvicide formulation development processes. Moreover, studies of the ecology of *Anopheles* larvae in targeted areas are also crucial for the integration of larval control strategies into malaria transmission plans devised by national malaria control programmes of endemic countries.

Keywords: *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, Residual efficacy, Sunlight, Larval instars

*Correspondence: barnabas.zogo@ird.fr
[2] MIVEGEC, IRD, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Vector control is a key component of the malaria control strategies that have led to the remarkable achievements made over the past decade [1]. However, the core vector control tools, namely insecticide-treated nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS) have clear limitations due to the increasing insecticide and behavioural resistance in vector populations [2–5]. According to the recent World Malaria Report, progress in malaria control has stalled in some areas since 2014 and additional tools are desperately needed if control is to result in elimination [6]. In Africa, the use of larval source management (LSM) as an additional tool for integrated vector management (IVM) has become increasingly relevant in recent years. LSM could be a valuable supplement to front-line tools, especially for the control of resistant vector populations. It has been an integral part of the vector control arsenal used worldwide to successfully eliminate malaria [7]. LSM strategies encompass habitat modification, habitat manipulation, biological control, and larviciding. Larviciding is a vector control intervention that consists of a regular application of chemical or biological insecticides in order to kill mosquito larvae.

Bacillus thuringiensis var *israelensis* (*Bti*) and *Bacillus sphaericus* (*Bs*) are the two potential biological insecticides that have been used for mosquito control since their discoveries during the mid-1970s. They are highly selective and are therefore environmentally safe to non-target organisms [8]. Moreover, to become resistant to *Bti*, an individual must develop resistance mechanisms to each of the four toxins, namely Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1A [9]. The probability of development of resistance to *Bti* in the field is, therefore, very low, as opposed to virtually all of the single-target insecticides. To date, there have been no reports of resistance to *Bti* in mosquito populations despite it having been applied for decades in several countries [9, 10]. Laboratory studies have shown that Cyt1A proteins interact synergistically with Cry4A, Cry4B, and Cry11A and that they suppress cross-resistance to Cry toxins [11]. However, three studies have reported a reduced susceptibility to *Bti* in *Aedes*, *Culex,* and even *Anopheles* populations [12–14]. Unlike *Bti*, which requires clean water to be effective, *Bs* can provide good control of larvae in polluted habitats [15]. Therefore, there is a considerable advantage to use *Bs* as there is increasing evidence that *Anopheles gambiae* larvae are able to breed and develop in dirty and polluted habitats, especially in urban areas [15]. However, there have been several reports of high resistance to *Bs* in many areas [16–21], indicating that resistance management strategies are needed in operational programmes that use *Bs*. A mixture of *Bti* and *Bs* may represent a potentially effective approach and may prevent resistance to biolarvicides as insects are less likely to develop resistance to a mixture of toxins than to a single toxin [22]. The use of a mixture of *Bti* and *Bs* is also particularly useful for general mosquito abatement programmes, since the insecticidal activity of the two bacterial larvicides varies according to the mosquito species [23].

Several formulations of *Bti* and *Bs* such as water dispersible powder (WDP), wettable powder (WP), flowable concentrate (FC), emulsified concentrate (EC), dust, granules, and microencapsulated forms have been developed and tested under laboratory and field conditions [24–29]. Unfortunately, *Bti* and *Bs* quickly settle to the bottom after application, which reduces the quantity of larvicide present in the larval feeding zone [30]. Although the residual efficacy differs between formulations, biolarvicides—especially *Bti*—generally have a short residual efficacy in the field and hence their use requires frequent reapplication, thereby resulting in high operational costs [27, 31]. Some biotic and abiotic factors such as the mosquito species, the rate of ingestion, the density and age of the larvae, the temperature, the turbidity, and the organic matter content have been reported to affect the efficacy of biolarvicide formulations in the field [23, 32]. There has been a paucity, however, of trials that simultaneously assessed the effect of these factors on the efficacy of novel biolarvicide formulations. In this study, we assessed the effect of an environmental variable (e.g., sunlight exposure) on the residual efficacy of a new formulation mixing *Bti* and *Bs.*

Methods

Mosquito strain

The Kisumu strain of *An. gambiae* sensu stricto was used for this study. It is collected in Kenya and it is free of any detectable insecticide resistance mechanism [33]. This strain has been maintained for many years at controlled temperature (27 ± 2 °C) and relative humidity (70–80%) in the insectary of the Institut Pierre Richet (IPR) in Bouaké, central Côte d'Ivoire.

Biolarvicide formulation

BTBSWAX (ISCA Technologies, Riverside, CA, USA) contains 83.3 g of *B. thuringiensis* Berliner 1915 subsp. *israelensis* (serovar H14, henceforth *Bti*) and 83.3 g of *B. sphaericus* (serotype H5a5b, strain 2362, henceforth *Bs*) per kilogramme of formulation. The wax has been manufactured with the same technology as SPLAT but it does not contain any pheromone lure nor any attractant. BTBSWAX floats on the water surface and hence does not settle to the bottom after application. Prior to application, the dollops were dried for 5 days in darkness at room temperature to prevent the development of an oily film on the water surface after treatment.

Study design

The study was carried out between March 11th and April 4th, 2017 in an open sunlit area of IPR. Two experiments were conducted, each exposing either first- or second-instar larvae of *An. gambiae*. A total of 32 artificial cement containers (i.e., trays that were 30 cm deep × 50 cm long × 50 cm wide) that were spaced 50 cm from each other were used in the experiments. They were protected by a section of mosquito netting to prevent oviposition by wild female mosquitoes and the accumulation of debris. The study was designed according to the experimental set up of Djènontin et al. [24], with modifications to assess the effect of exposure to sunlight on the residual efficacy of the larvicide. The most important modification was the use of special stools (35 high × 90 cm long × 90 cm wide) draped with black plastic sheeting to cover 16 containers. Three dosages of fresh BTBSWAX (1 g/m^2, 1.5 g/m^2, and 2 g/m^2) were evaluated in the uncovered containers (i.e., exposed to sunlight) and the covered containers (i.e., not exposed to sunlight). Overall, each experiment included the following treatments:

- Control (untreated) in four covered containers
- Control (untreated) in four uncovered containers
- BTBSWAX at 1 g/m^2 in four covered containers
- BTBSWAX at 1 g/m^2 in four uncovered containers
- BTBSWAX at 1.5 g/m^2 in four covered containers
- BTBSWAX at 1.5 g/m^2 in four uncovered containers
- BTBSWAX at 2 g/m^2 in four covered containers
- BTBSWAX at 2 g/m^2 in four uncovered containers

For each experiment, the various treatments were randomly assigned to the 32 containers (i.e., four per treatment) using the website Randomization.com.

Experimental protocol

All of the containers were thoroughly cleaned, dried, and half-filled with 37.5 l of dechlorinated tap water prior to each experiment. The initial water level in the containers was maintained throughout the trial period. The appropriate amount of BTBSWAX (i.e., 250 mg, 375 mg, and 500 mg, corresponding to dosages of 1 g/m^2, 1.5 g/m^2, and 2 g/m^2, respectively) was manually applied to the water surface. Freshly made dollops have a putty-like consistency. After weighing, the dollops were dried for 5 days in darkness at room temperature. In the first experiment, batches of 50 first-instar larvae were released in each container on day-0, 6, and 12 post-treatment, respectively. In the second experiment, second-instar larvae were released in each container on day-0, 10, and 21 post-treatment, respectively. Batches of 50 larvae were released on day-0 and 21 post-treatment and 30 larvae were released on day-10 post-treatment due to the limited number of larvae in the insectary. In each experiment, the frequency of the releases depended on the larval development period in the containers and the availability of larvae. Larvae were supplied with food (0.5 g of Tetramin© Baby per container) after they were released. After the treatment, all of the containers were checked twice on a daily basis (i.e., in the morning and in the afternoon) for the presence of pupae. All of the pupae were collected, counted, and placed into plastic cups with dechlorinated tap water. The plastic cups were covered with a section of netting until adult emergence. They were kept in the laboratory of IPR at room temperature until adult emergence. The number of adult mosquitoes collected from each plastic cup was recorded. The temperature and the pH of the water were monitored in each container on a daily basis (starting from 9 a.m.) using thermometers (Canac® 7080052, Quebec, Canada; accuracy 1 °C ± 0.2%) and reactive strips (Mel® 9800-6pk, Alon, Belgique; accuracy 1), respectively.

Data analysis

The emergence rates of anopheles cohorts that had been exposed to the larvicide in the containers were compared to measure the residual efficacy of BTBSWAX. Statistical analyses were carried out with R software [34]. The variables were container-dependent. Two-tailed p values and a 5% significance level were used. The Emergence Inhibition Rates (% EIR) for each treatment were determined using the following formula:

$$\%EIR = ((C - T)/C) \times 100$$

where C is the emergence rate in the control and T is the emergence rate in the treated containers at the same point in time [35].

For each experiment, a dataset was created to be used for survival analysis (Additional files 1 and 2). This dataset had one line per larvae released with the final status of the larvae (1 = emerged; 0 = not emerged) and the time at which this status was recorded. The number of pupae counted on day x post release indicated the number of larvae with status "emerged" and time x. The number of larvae with status "not emerged" was obtained by subtracting, in each container and for each release, the total number of pupae counted to the number of larvae released. The data were right-censored such as larvae with status "not emerged" were associated with a time corresponding to the time of follow-up (i.e., for each release, the time at which the last pupae was observed). For each experiment (i.e. each larval instar tested), the risk of emergence was analysed using a Cox's proportional hazards mixed-effect model with time after treatment, sunlight exposure (covered or uncovered), treatment

(Control, 1 mg/m^2, 1.5 mg/m^2 or 2 mg/m^2) and the interaction between sunlight exposure and treatment as fixed effects and containers random effect (random intercept). The "Coxme" function from the "coxme" package in 'R' was used [36, 37]. Kaplan–Meier plots of emergence were generated using the 'survfit' function in the library 'survival' (Additional file 3).

A linear mixed-effect model (function "lmer", package "lme4") was used to compare the water temperature in the covered versus the uncovered containers [38].

Results

Characteristics of the water

The water had a pH of 7 in all containers throughout both of the experimental periods (i.e. 1216 measures). During the first experiment, the measured temperatures ranged from 26 to 32 °C in the uncovered containers and the covered containers. During the second experiment, the measured temperatures ranged from 25 to 30 °C in the uncovered containers and from 25 to 29 °C in the covered containers. The linear mixed-effect model ("608 measures in covered containers *versus* 608 measures in uncovered containers") showed that the water temperature was significantly higher in the uncovered containers than in the covered containers (df = 4636.01, 95% CI 0.40–0.51, $p < 0.001$) (Table 1).

Residual efficacy of BTBSWAX

In the two experiments, the emergence rates of larvae in the negative control (untreated containers) were high, ranging from 98 to 100% and 83 to 100%, respectively (Tables 2, 3). In both of the experiments, BTBSWAX at 1.5 g/m^2 and 2 g/m^2 inhibited the emergence by more than 80% after exposure of larvae on day-0 post-treatment in covered and uncovered containers (Tables 2, 3). In covered containers, BTBSWAX at 2 g/m^2 caused emergence inhibition of more than 80% after exposure of first-instar larvae released on day-6 post-treatment, whilst the emergence inhibition was only 28% in uncovered containers (Fig. 1). For first-instar larvae released on day-12 post-treatment, BTBSWAX resulted in a low level

Table 1 Summary of the temperatures measured during the experiments

Experiment	Instar	Containers	Minimum	Mean ± standard deviation	Maximum
1	2nd	Uncovered	26	28.6 ± 1.34	32
		Covered	26	27.9 ± 1.02	32
2	1st	Uncovered	25	27.9 ± 0.75	30
		Covered	25	27.7 ± 0.69	29

Table 2 Emergence and emergence inhibition rates after exposure of first-instar larvae of *Anopheles gambiae* to the treatments

N day post-treatment	Covered containers				Uncovered containers			
	Control	1 g/m^2	1.5 g/m^2	2 g/m^2	Control	1 g/m^2	1.5 g/m^2	2 g/m^2
0								
N	200	200	200	200	200	200	200	200
NE	200	17	10	14	200	118	33	10
ER (% [95% CI])	100 [98–100]	9 [5–13]	5 [3–7]	7 [4–10]	100 [98–100]	59 [52–66]	17 [12–22]	5 [2–8]
EIR (%)	–	92	95	93	–	42	84	95
6								
N	200	200	200	200	200	200	200	200
NE	200	21	40	32	200	186	110	145
ER (% [95% CI])	100 [98–100]	11 [7–15]	20 [15–25]	16 [12–20]	100 [98–100]	93 [89–97]	55 [48–62]	73 [66–80]
EIR (%)	–	90	80	84	–	7	45	28
12								
N	200	200	200	200	200	200	200	200
NE	200	88	92	60	200	195	182	161
ER (% [95% CI])	100 [98–100]	44 [37–51]	46 [39–53]	30 [24–36]	100 [98–100]	98 [94–100]	91 [86–96]	81 [74–88]
EIR (%)	–	56	54	70	-	3	9	20

N the number of larvae, *NE* the number of larvae emerged, *ER* the emergence rate, *EIR* the emergence inhibition rate

Table 3 Emergence and emergence inhibition rates after exposure of second-instar larvae of *Anopheles gambiae* to the treatments

N day post-treatment	Covered containers				Uncovered containers			
	Control	1 g/m^2	1.5 g/m^2	2 g/m^2	Control	1 g/m^2	1.5 g/m^2	2 g/m^2
0								
N	200	200	200	200	200	200	200	200
NE	191	23	20	18	171	40	25	1
ER (% [95% CI])	96 [92–100]	12 [8–16]	10 [7–13]	9 [6–12]	86 [80–92]	20 [15–25]	13 [9–17]	1 [0–2]
EIR (%)	–	88	90	91	–	77	85	100
10								
N	120	120	120	120	120	120	120	120
NE	108	76	56	74	106	98	100	110
ER (% [95% CI])	90 [83–97]	63 [54–72]	47 [38–56]	62 [53–71]	88 [81–95]	82 [74–90]	83 [76–90]	92 [85–99]
EIR (%)	–	30	48	31	–	8	6	0
21								
N	200	200	200	200	200	200	200	200
NE	189	183	177	180	200	195	186	196
ER (% [95% CI])	95 [91–99]	92 [88–96]	89 [85–93]	90 [86–94]	100 [98–100]	98 [96–100]	93 [91–95]	98 [95–100]
EIR (%)	–	3	6	5	–	3	8	3

N the number of larvae, *NE* the number of larvae emerged, *ER* the emergence rate, *EIR* the emergence inhibition rate

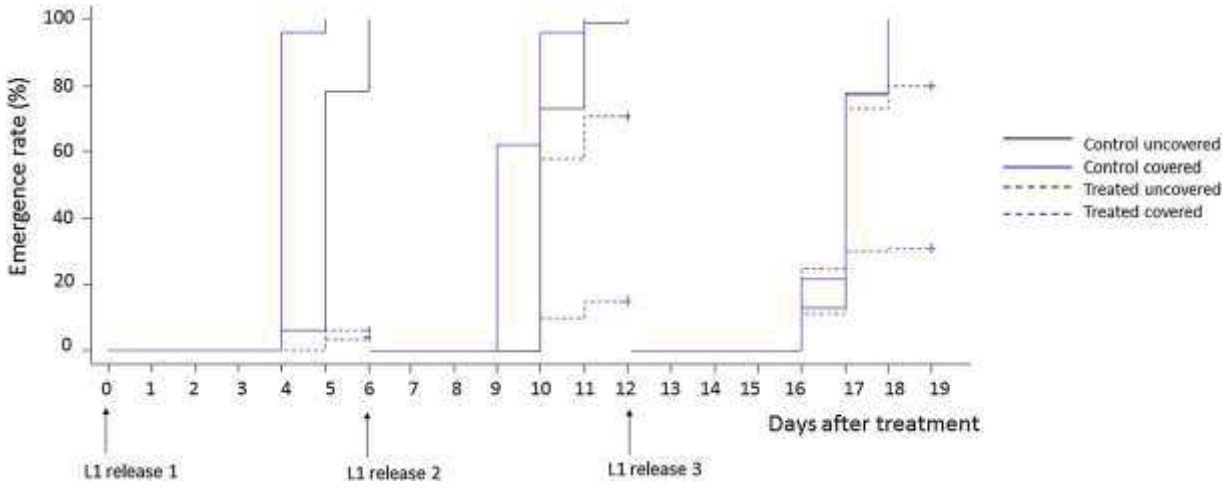

Fig. 1 Emergence curves of first-instar larvae of *Anopheles gambiae* in treated (BTBSWAX at 2 g/m^2) and control containers for the analysis of the effect of sunlight exposure. *L1* first-instar larvae

of emergence inhibition (EIR of 20%) in uncovered containers but still provided a high level of control (EIR of 70%) in covered containers (Fig. 1).

When second-instar larvae were exposed on day-10 post-treatment, the emergence inhibition was moderate (31%) in covered containers but was very low (< 10%) in uncovered containers. There were no significant differences in the emergence rates between treated and untreated containers after exposure of second-instar larvae on day-21 post-treatment (Fig. 2).

The Cox's proportional hazards mixed-effect models ("12 control pools versus 12 test pools") showed that sunlight exposure decreased significantly the emergence probability of larvae in containers treated with BTBSWAX at 1.5 g/m^2 (Hazard ratio (HR) = 0.18, P < 0.001 and HR = 0.70, P = 0.020 against 1st and 2nd instar larvae, respectively) and 2 g/m^2 (HR = 0.12, P < 0.001 and HR = 0.63, P = 0.033 against 1st and 2nd instar larvae, respectively) (Tables 4, 5) both with first-instar larvae and second-instar larvae (Figs. 1, 2).

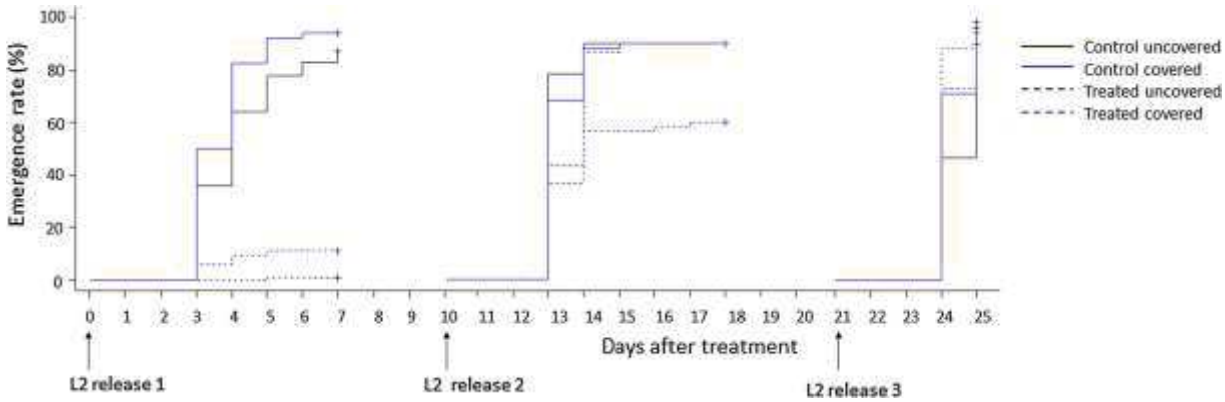

Fig. 2 Emergence curves of second-instar larvae of *Anopheles gambiae* in treated (BTBSWAX at 2 g/m^2) and control containers for the analysis of the effect of sunlight exposure. *L2* second-instar larvae

Table 4 Cox's proportional hazards model analyses of the emergence of larvae exposed from first instar

	Estimate (se)	Hazard ratio	P value
Treatments			
Dosage 1 g/m^2	−0.15 (0.31)	0.86	6.3e−01
Dosage 1.5 g/m^2	−0.97 (0.31)	0.38	1.6e−03**
Dosage 2 g/m^2	−1 (0.31)	0.37	1.1e−03**
Protection from sunlight exposure	0.54 (0.31)	1.72	7.9e−02
Days after treatment	0.02 (0)	1.02	5.9e−06***
Interactions between treatments and protection from exposure			
Dosage 1 g/m^2 in covered containers	−2.6 (0.44)	0.07	3.6e−09***
Dosage 1.5 g/m^2 in covered containers	−1.69 (0.44)	0.18	1.3e−04***
Dosage 2 g/m^2 in covered containers	−2.08 (0.45)	0.12	3.2e−06***

** P < 0.01, *** P < 0.001

Table 5 Cox's proportional hazards model analyses of the emergence of larvae exposed from second instar

	Estimate (se)	Hazard Ratio	P value
Treatments			
Dosage 1 g/m^2	−0.39 (0.18)	0.68	0.031*
Dosage 1.5 g/m^2	−0.29 (0.18)	0.75	0.11
Dosage 2 g/m^2	−0.38 (0.18)	0.68	0.040*
Protection from sunlight exposure	0.25 (0.18)	1.28	0.17
Days after treatment	0.08 (0)	1.08	0.000***
Interactions between treatment and protection from exposure			
Dosage 1 g/m^2 in covered containers	−0.4 (0.26)	0.86	0.13
Dosage 1.5 g/m^2 in covered containers	−0.6 (0.26)	0.70	0.020*
Dosage 2 g/m^2 in covered containers	−0.55 (0.26)	0.63	0.033*

* P < 0.05, *** P < 0.001

It is noteworthy that the emergence of first instar larvae exposed 12 days after treatment was more inhibited (relative to the control) than the emergence of second instar larvae exposed 10 days after treatment (Tables 2, 3).

Discussion

The residual efficacy of BTBSWAX at 2 g/m^2 against larvae exposed from first and second instars was less than 10 days in uncovered containers. This result fits well with

those from previous studies that reported short residual efficacies of *Bti* and *Bs* [24, 27]. *Bti* products are expected to provide a shorter residual efficacy than *Bs* products since the spores of *Bs* persist longer under field conditions and may recycle in the gut of mosquito larvae after they die [39]. However, the recycling capacity of *Bs* has been shown to depend on the formulation, the mosquito species, and environmental factors [40]. Compared to our results, a much longer effective period of a similar formulation (> 5 weeks after treatment) was observed against *Culex quinquefasciatus* larvae in a recent laboratory study [41]. Sedimentation of spores out of larval feeding areas had been reported to contribute to the short residual efficacy of biolarvicides against *Anopheles* larvae [24]. This is unlikely, however, since BTBSWAX formulation floats on the water surface after application. These results may be explained by the fact that *Culex* larvae are generally more susceptible to biolarvicide products than *Anopheles* larvae, although the susceptibility of mosquito species to *Bti* and *Bs* appears to vary between formulations [42].

Young larvae are known to be much more susceptible to *Bti* and *Bs* than late larvae [42]. A trend similar to these literature results was found in this study but this might also be explained by the longer exposure period of first-instar larvae compared to second-instar larvae as only the emergence rate was measured. The experimental design used in the present study did not allow to test statistically this hypothesis because (1) the semi-field conditions (cement plots) did not allow to discriminate alive and dead larvae impeding a release of larvae batches at a higher frequency (i.e. every 2 days) or (2) first and second instar larvae were not exposed to treatments in the same experiment at the same time.

Since several larval instars often prevail in natural breeding habitats, a difference in the susceptibility between larval instars should be taken into account in a potential control strategy using biolarvicides. By doing so, it would be possible to tune the frequency of retreatments and/or the dosages in order to kill late larvae and hence maintain a good efficacy of *Bti* and *Bs* in the field [43]. It should be noted that operational costs must be taken into account in such approaches as available funds are limited in all malaria control interventions. Moreover, a mixture of biolarvicide and surface film has also been tested against *Anopheles* larvae and pupae. Surface films killed mosquito larvae and pupae by reducing the surface tension of the water and, unlike biolarvicides, are more effective against late stages [44]. It was reported that the mixture exhibited greater efficacy than each tool on its own [44]. Nevertheless, further evaluations of this tool should be undertaken in various settings to provide more evidence of its efficacy and cost-effectiveness.

Environmental stresses, including sunlight exposure, significantly decreased the residual efficacy of BTBSWAX. The residual efficacy of BTBSWAX against larvae exposed from first instar was reduced by > 6 days in uncovered containers compared to that in covered containers. Solar gamma radiation and ultraviolet (UV) light have been shown to affect the spore viability of biolarvicides. Among the UV components, UV-A (320–400 nm) and UV-B (280–320 nm) have been identified as being responsible for the photodegradation and loss of activity of biolarvicides under field conditions [45]. Furthermore, a previous study has proven that solar radiation exposure decreases the efficacy of *Bs* by 30% [46]. Therefore, there is considerable interest in the development of technologies that provide protection of biolarvicides against environmental damage, especially for the control of *An. gambiae*, which mainly breed in sunlight-exposed habitats [47]. A number of adjuvants such as a fluorescent whitening agent, Congo red, folic acid, molasses, lignin, cellulose, alginate, shellac, and yeast have been shown to help achieve better protection from UV light [29]. However, these adjuvants appear to affect microbial growth and spore germination and they are also unstable under field conditions. Moreover, some ultraviolet light absorbents such as dyes and fluorescent agents are possible carcinogens [29]. More promising is a report that a new mixture of *Bti* and *Bs* formulation is effective for 4–6 months after application under semi-field conditions [48]. This result is very encouraging since longer residual efficacy would result in lower operational costs. Nonetheless, the effectiveness of biolarvicides does not only depend on their residual efficacy. The efficacy of biolarvicides is known to be affected by other factors, such as the dynamics of the breeding sites and their colonization [24]. As an example, biolarvicides are readily washed away by rain, and hence even a longer residual efficacy is unlikely to improve their efficacy during the rainy season [49].

This study has some limitations. The use of mosquito netting to cover all containers (in order to avoid oviposition by wild mosquitoes) may have interfered with sunlight irradiance in uncovered containers and then could have lessened the impact of sunlight exposure on the residual efficacy of BTBSWAX. Furthermore, the study design did not allow to measure precisely the temperature (temperature variation during the day) with only one measurement per day in the morning, when difference between different water bodies are likely to be the lowest during the day. Consequently, negative results about the temperature influence on treatment efficacies must be interpreted with caution. Another improvement for future experiments on *Bti* or *Bs* based products would be to measure precisely solar irradiance.

In order to devise a LSM strategic plan, *Anopheles* larval habitats need to be identified and characterized at a local scale. Breeding habitats are known to be very numerous, especially in rural areas of Africa, and their productivity and distribution vary in space and time. The hypothesis underlying LSM strategy is that "treating the most productive breeding sites in conjunction with LN universal coverage will impact malaria transmission". To do so, identification and characterization of the most predominant and productive habitats is crucial. Knowledge of their dynamics will help with devising a targeted approach in order to get the best cost-effectiveness trade-off [50]. After this ecological study step, operational research on the effectiveness of long-lasting biolarvicides in different areas is critical for providing evidence of their impact on malaria transmission and for providing the most relevant strategy for their use.

Conclusions

This study confirms that *Bti* and *Bs* are highly potent against *An. gambiae* larvae, although they have a short residual efficacy. Furthermore, environmental stresses, including sunlight exposure, significantly decreased the residual efficacy of BTBSWAX. Studies of the ecology of *Anopheles* larvae in targeted areas are also crucial for the integration of larval control strategies into malaria transmission plans devised by national malaria control programmes of endemic countries.

Additional files

Additional file 1. Dataset of the first experiment using first instar larvae.

Additional file 2. Dataset of the second experiment using second instar larvae.

Additional file 3. Codes for the data analysis and figures.

Abbreviations

Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*; *Bs*: *Bacillus sphaericus*; *An.*: *Anopheles*; ITNs: insecticide-treated nets; IRS: indoor residual spraying; LSM: larval source management; IVM: integrated vector management; WDP: water dispersible powder; WP: wettable powder; FC: flowable concentrate; EC: emulsified concentrate; UV: ultraviolet; IPR: Institut Pierre Richet; SPLAT: Specialized Pheromone and Lure Application Technology; EIR: emergence inhibition rates; N: number of larvae; NE: number of larvae emerged; ER: emergence rate.

Authors' contributions

BZ, AAK, LBM, NM and CP conceived and designed the experiments. BZ and BNT performed the experiments. NM, CP and AD analyzed the data. BZ wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

[1] Institut Pierre Richet (IPR), Bouaké, Côte d'Ivoire. [2] MIVEGEC, IRD, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France. [3] Faculté des Sciences et Techniques/Université d'Abomey Calavi, Abomey-Calavi, Benin. [4] Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

Acknowledgements

We thank Koné Aboubacar, Dosso Youssouf, Lingue Norbert, Traoré Alain, Konaté Sara for their technical assistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets used during this article are available at the Institut Pierre Richet in Bouaké, Côte d'Ivoire and will be made easily available on request, when required.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Funding

This work was part of the REACT project, funded by the French Initiative 5%—Expertise France (No 15SANIN213).

Publisher's Note

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

Received: 19 August 2018 Accepted: 21 February 2019
Published online: 26 February 2019

References

1. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature. 2015;526:207–11.
2. Mwangangi JM, Mbogo CM, Orindi BO, Muturi EJ, Midega JT, Nzovu J, et al. Shifts in malaria vector species composition and transmission dynamics along the Kenyan coast over the past 20 years. Malar J. 2013;12:13.
3. Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin 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;206:1622–9.
4. WHO. Control of residual malaria parasite transmission. Geneva: World Health Organization; 2014.
5. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African Anopheles mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. Trends Parasitol. 2016;32:187–96.
6. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2017.
7. WHO. Larval source management—a supplementary measure for malaria vector control An operational manual. Geneva: World Health Organization; 2013.
8. Ketseoglou I, Koekemoer LL, Coetzee M, Bouwer G. The larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against five African Anopheles (Diptera: Culicidae) species. Afr Entomol. 2011;19:146–50.
9. Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and methoprene. J Med Entomol. 2009;46:881–7.
10. Becker N, Ludwig M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. J Am Mosq Control Assoc. 1993;9:221–4.
11. Georghiou GP, Wirth MC. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Appl Environ Microbiol. 1997;63:1095–101.
12. Hongyu Z, Changju Y, Jingye H, Lin L. Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biocontrol Sci Technol. 2004;14:321–5.

13. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21:305–9.
14. Boyer S, Paris M, Jego S, Lempérière G, Ravanel P. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). Biol Control. 2012;62:75–81.
15. Walker K, Lynch M. Contribution of Anopheles larvae control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. Med Vet Entomol. 2007;21:2–21.
16. Chevillon C, Bernard C, Marquine M, Pasteur N. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. J Med Entomol. 2001;38:657–64.
17. Zahiri NS, Su T, Mulla MS. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. J Med Entomol. 2002;39:513–20.
18. Nielsen-Leroux C, Charles JF, Thiéry I, Georghiou GP. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. Eur J Biochem. 1995;228:206–10.
19. Poopathi S, Mani TR, Rao DR, Baskaran G, Kabilan L. Cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex quinquefasciatus* resistant to *B sphaericus* 1593M. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999;30:477–81.
20. Rao DR, Mani TR, Rajendran R, Joseph AS, Gajanana A, Reuben R. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:1–5.
21. Adak T, Mittal PK, Raghavendra K, Subbarao SK, Ansari MA, Sharma VP. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* Say 1823. Curr Sci. 1995;69:695–8.
22. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B, et al. Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. Emerg Infect Dis. 2008;14:1707–14.
23. Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23:133–63.
24. Djènontin A, Pennetier C, Zogo B, Soukou KB, Ole-Sangba M, Akogbéto M, et al. Field efficacy of vectobac GR as a mosquito larvicide for the control of anopheline and culicine mosquitoes in natural habitats in Benin, West Africa. PLoS One. 2014;9:e87934.
25. Fillinger U, Bv I, Becker N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. Trop Med Int Health. 2003;8:37–47.
26. Davidson EW, Sweeney AW, Cooper R. Comparative field trials of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *B. thuringiensis* var. *israelensis* commercial powder formulations. J Econ Entomol. 1981;74:350–4.
27. Skovmand O, Sanogo E. Experimental formulations of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. J Med Entomol. 1999;36:62–7.
28. Gunasekaran K, Prabakaran G, Balaraman K. Efficacy of a floating sustained release formulation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* in controlling *Culex quinquefasciatus* larvae in polluted water habitats. Acta Trop. 2002;83:241–7.
29. Zhang L, Zhang X, Zhang Y, Wu S, Gelbič I, Xu L, et al. A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. Sci Rep. 2016;6:39425.
30. Mittal PK. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. J Vect Borne Dis. 2003;40:20–32.
31. Fillinger U, Ndenga B, Githeko A, Lindsay SW. Integrated malaria vector control with microbial larvicides and insecticide-treated nets in western Kenya: a controlled trial. Bull World Health Organ. 2009;87:655–65.
32. Becker N, Zgomba IM, Ludwig M, Petric D, Rettich F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. J Am Mosq Control Assoc. 1992;8:285–9.
33. Shute GT. A method of maintaining colonies of East African strains of *Anopheles gambiae*. Ann Trop Med Parasitol. 1956;50:92–4.
34. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. https://www.R-project.org/. 2018.
35. WHO Communicable Disease Control Prevention and Eradication. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: World Health Organization; 2005.
36. Therneau T. Coxme. Mixed effects cox models. R package version 2.2-10; 2018. https://CRAN.R-project.org/package=coxme. Accessed 18 June 2018.
37. Therneau T. A package for survival analysis in S, version 2.38; 2015. https://CRAN.R-project.org/package=survival. Accessed 18 June 2018.
38. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw. 2015;67:1–48.
39. Becker N, Zgomba M, Petric D, Beck M, Ludwig M. Role of larval cadavers in recycling processes of *Bacillus sphaericus*. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:329–34.
40. Mwangangi JM, Kahindi SC, Kibe LW, Nzovu JG, Luethy P, Githure JI, et al. Wide-scale application of Bti/Bs biolarvicide in different aquatic habitat types in urban and peri-urban Malindi, Kenya. Parasitol Res. 2011;108:1355–63.
41. Schorkopf DLP, Spanoudis CG, Mboera LEG, Mafra-Neto A, Ignell R, Dekker T. Combining attractants and larvicides in biodegradable matrices for sustainable mosquito vector control. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0005043.
42. Charles JF, Nielsen-LeRoux C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(Suppl 1):201–6.
43. Mulla MS, Darwazeh HA, Zgomba M. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. Bull Soc Vector Ecol. 1995;15:166–75.
44. Bukhari T, Takken W, Koenraadt CJM. Biological tools for control of larval stages of malaria vectors—a review. Biocontrol Sci Technol. 2013;23:987–1023.
45. Manasherob R, Ben-Dov E, Xiaoqiang W, Boussiba S, Zaritsky A. Protection from UV-B damage of mosquito larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* expressed in Anabaena PCC 7120. Curr Microbiol. 2002;45:217–20.
46. Rojas JE, Mazzarri M, Sojo M, García-A GY. Effectiveness of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on larvae of *Anopheles nuñeztovari*. Invest Clin. 2001;42:131–46.
47. Minakawa N, Mutero CM, Githure JI, Beier JC, Yan G. Spatial distribution and habitat characterization of anopheline mosquito larvae in western Kenya. Am J Trop Med Hyg. 1999;61:1010–6.
48. Afrane YA, Mweresa NG, Wanjala CL, Gilbreath TM III, Zhou G, Lee M-C, et al. Evaluation of long-lasting microbial larvicide for malaria vector control in Kenya. Malar J. 2016;15:577.
49. Fillinger U, Lindsay SW. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. Trop Med Int Health. 2006;11:1629–42.
50. Gu W, Novak RJ. Habitat-based modeling of impacts of mosquito larval interventions on entomological inoculation rates, incidence, and prevalence of malaria. Am J Trop Med Hyg. 2005;73:546–52.

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Chapitre 4. Étude des espèces vectrices, des mécanismes de résistance aux insecticides et de l'intensité de la transmission de *Plasmodium falciparum* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires

La lutte contre le paludisme en Côte d'Ivoire repose essentiellement sur : i) le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIp) par la sulfadoxine-pyriméthamine, ii) le diagnostic précoce et un traitement efficace à l'aide des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) et iii) la lutte antivectorielle (LAV) par la distribution gratuite de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA). Malgré les succès obtenus ces dernières années grâce à ces outils, le paludisme demeure un problème de santé publique dans le pays où il est à l'origine de plus de 40% des consultations. La prévalence moyenne de l'infection à *Plasmodium spp.* varie de 64 à 75% en Côte d'Ivoire et la principale espèce parasitaire est *P. falciparum* qui est présente dans 95 à 99% des cas (PNLP 2014). Les *Plasmodium spp.* sont principalement transmis en Côte d'Ivoire par cinq espèces : *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii*, *An. funestus s.s.*, *An. nili s.s*. et *An. melas* (Koffi *et al*. 2009). A l'échelle nationale, *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii* et *An. funestus s.s*. sont les trois principaux vecteurs mais *An. nili s.s.* et *An. melas* peuvent jouer des rôles importants dans certaines zones du pays (Koffi *et al*. 2009; Adja *et al*. 2011). Ces espèces vectrices ne sont donc pas uniformément réparties dans le pays et leur capacité vectorielle varie aussi énormément en fonction des localités et du temps (Dossou-Yovo *et al.* 1998, Ouattara *et al*. 1994; Doannio *et al*. 2002; Koudou *et al*. 2010; Adja *et al*. 2011).

Ces dernières années, l'utilisation massive des insecticides chimiques en agriculture et en santé publique a favorisé l'émergence et la diffusion de divers mécanismes de résistance chez les vecteurs présents en Côte d'Ivoire. Chez *An. gambiae s.l.*, le complexe d'espèces le plus étudié, les mutations *kdr* L1014F et *ace-1*^{R} G119S, de même que les mécanismes de résistance métabolique sont très répandus mais retrouvés à des fréquences ou des niveaux variables dans le pays (Koffi *et al*. 2013; Sadia-Kacou *et al*. 2017; Camara *et al*. 2018b; Zoh *et al*. 2018). Comme dans d'autres pays endémiques, des mécanismes d'adaptation comportementale en réponse à l'utilisation des outils de lutte antivectorielle pourraient également être présents chez les populations vectrices (Fornadel *et al*. 2010; Moiroux *et al*. 2012; Ojuka *et al*. 2015). Ces mécanismes pourraient se traduire par une exophagie élevée, une activité de piqûre précoce ou tardive, ou une zoophagie partielle pour diminuer le contact avec les MILDA. L'existence de

tels mécanismes chez les vecteurs en Côte d'ivoire est mal connue car on a très peu d'informations sur les comportements de piqûres des vecteurs et leurs variations dans le temps. Les suivis longitudinaux n'ont pas été rendus possibles du fait du contexte politique difficile traversé par le pays entre 2002 et 2011.

La présente étude vise à actualiser les données sur la bionomie des vecteurs, les mécanismes de résistance aux insecticides et l'intensité de la transmission de *P. falciparum* à Korhogo. Elle a été menée dans le but de produire les données de base pour l'essai, avant la mise en place des stratégies complémentaires. Pour ce faire, nous avons mené quatre enquêtes entomologiques à Korhogo dont deux en saison pluvieuse (21 Septembre au 10 Octobre 2016 et du 11 au 29 Avril 2017) et deux en saison sèche (18 Novembre au 6 Décembre 2016 et 14 Février au 04 Mars 2017). Les résultats ont montré que les vecteurs majeurs de *P. falciparum* à Korhogo sont *An. gambiae s.s.* suivis d'*An. coluzzii*, quelle que soit la saison. Toutefois, la densité agressive d'*An. gambiae s.l.* a énormément varié en fonction des saisons et était notamment plus de 200 fois plus élevée en Septembre-Octobre (saison pluvieuse) qu'en Février-Mars 2017 (saison sèche). Le groupe *An. funestus* et *An. nili s.l.* sont les vecteurs secondaires présents dans la zone, représentant moins de 10% de l'ensemble des vecteurs collectés. L'intensité de la transmission de *P. falciparum* a été en moyenne de 2,46 pi/h/n mais a atteint 9 pi/h/n en Septembre-Octobre. Les vecteurs (*An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii*, groupe *An. funestus* et *An. nili s.l*) étaient préférentiellement exophages au cours des deux saisons. Un pic d'agressivité d'*An. gambiae s.l.* significativement plus tardif a été noté en Septembre-Octobre (4-5h) que pendant les autres enquêtes (1-4h). La fréquence allélique de la mutation *kdr* a été très élevée chez *An. gambiae s.l.* (55.6% à 100%) au cours des quatre enquêtes. Quant à la mutation *ace-1*^{R}, sa fréquence allélique a été relativement modérée chez *An. gambiae s.l.* (0–30.05%) au cours des quatre enquêtes. Les mutations *kdr* et *ace-1*^{R} étaient plus fréquentes chez *An. gambiae s.s.* que chez *An. coluzzii.* En conclusion, ces résultats nous ont permis de mettre à jour le profil entomologique de la zone d'étude. Ils ont aussi révélé le besoin d'améliorer les stratégies de lutte antivectorielle dans la zone afin de réduire l'intensité de la transmission et donc le fardeau du paludisme.

Parasite **26**, 40 (2019)
© B. Zogo et al., published by EDP Sciences, 2019
https://doi.org/10.1051/parasite/2019040

PARASITE

Available online at:
www.parasite-journal.org

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Anopheles bionomics, insecticide resistance mechanisms, and malaria transmission in the Korhogo area, northern Côte d'Ivoire: a pre-intervention study

Barnabas Zogo[1,2,3,*], Dieudonné Diloma Soma[4,5], Bertin N'Cho Tchiekoi[1], Anthony Somé[4], Ludovic P. Ahoua Alou[1], Alphonsine A. Koffi[1], Florence Fournet[2], Amal Dahounto[2], Baba Coulibaly[1,2], Souleymane Kandé[1], Roch Kounbobr Dabiré[4], Lamine Baba-Moussa[3], Nicolas Moiroux[2,4], and Cédric Pennetier[1,2]

[1] Institut Pierre Richet (IPR), Institut National de Santé Publique (INSP), BP 1500 Bouaké, Côte d'Ivoire
[2] Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Univ Montpellier, CNRS, IRD, BP 64501, Montpellier, France
[3] Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi, BP 1604, Cotonou, Benin
[4] Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), BP 545, Bobo Dioulasso, Burkina Faso
[5] Institut Supérieur des Sciences de la Santé, Université Nazi Boni, BP 1091, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Received 29 March 2019, Accepted 21 June 2019, Published online 12 July 2019

Abstract – A better understanding of malaria transmission at a local scale is essential for developing and implementing effective control strategies. In the framework of a randomized controlled trial (RCT), we aimed to provide an updated description of malaria transmission in the Korhogo area, northern Côte d'Ivoire, and to obtain baseline data for the trial. We performed human landing collections (HLCs) in 26 villages in the Korhogo area during the rainy season (September–October 2016, April–May 2017) and the dry season (November–December 2016, February–March 2017). We used PCR techniques to ascertain the species of the *Anopheles gambiae* complex, *Plasmodium falciparum* sporozoite infection, and insecticide resistance mechanisms in a subset of *Anopheles* vectors. *Anopheles gambiae s.l.* was the predominant malaria vector in the Korhogo area. Overall, more vectors were collected outdoors than indoors ($p < 0.001$). Of the 774 *An. gambiae s.l.* tested in the laboratory, 89.65% were *An. gambiae s.s.* and 10.35% were *An. coluzzii*. The frequencies of the *kdr* allele were very high in *An. gambiae s.s.* but the *ace-1* allele was found at moderate frequencies. An unprotected individual living in the Korhogo area received an average of 9.04, 0.63, 0.06 and 0.12 infected bites per night in September–October, November–December, February–March, and April–May, respectively. These results demonstrate that the intensity of malaria transmission is extremely high in the Korhogo area, especially during the rainy season. Malaria control in highly endemic areas such as Korhogo needs to be strengthened with complementary tools in order to reduce the burden of the disease.

Key words: Malaria, Vectors, Resistance, Intensity of transmission.

Résumé – Bionomique des Anophèles, mécanismes de résistance aux insecticides et transmission du paludisme dans la région de Korhogo, dans le nord de la Côte d'Ivoire : une étude pré-intervention. Une meilleure connaissance de la transmission du paludisme à l'échelle locale est essentielle pour élaborer et mettre en œuvre des stratégies de lutte efficaces. Dans le cadre d'un essai contrôlé randomisé, nous avons pour objectifs de fournir une description actualisée de la transmission du paludisme dans la zone de Korhogo, au nord de la Côte d'Ivoire, et de collecter les données de base pour l'essai. Nous avons capturé les moustiques sur des volontaires humains dans 26 villages de la zone de Korhogo pendant la saison pluvieuse (septembre–octobre 2016, avril–mai 2017) et la saison sèche (novembre–décembre 2016, février–mars 2017). À l'aide des techniques de PCR, nous avons déterminé les espèces au sein du complexe *Anopheles gambiae*, les infections par *Plasmodium falciparum* au stade sporozoïte et les mécanismes de résistance aux insecticides dans un sous-échantillon d'anophèles vecteurs. *Anopheles gambiae s.l.* est de loin le vecteur majoritaire du paludisme dans la zone de Korhogo. Au total, plus de vecteurs ont été collectés à l'extérieur des habitations qu'à l'intérieur ($p < 0.001$). Des 774 *An. gambiae s.l.* analysés au laboratoire, 89,65 % étaient *An. gambiae s.s.* et 10,35 % *An. coluzzii*. Les fréquences alléliques du gène *kdr* étaient très élevées chez *An. gambiae s.s.* alors que les fréquences alléliques du gène *ace-1* étaient modérées. Une personne non protégée vivant à Korhogo reçoit chaque nuit en moyenne 9,04 piqûres infectantes (pi) en septembre–octobre, 0,63

*Corresponding author: barnabas.zogo@ird.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

pi en novembre–décembre, 0,06 pi en février-mars et 0,12 pi en avril–mai. Ces résultats démontrent que l'intensité de la transmission du paludisme est très élevée dans la zone de Korhogo, particulièrement en saison pluvieuse. La lutte contre le paludisme dans les zones de forte endémicité comme Korhogo doit être renforcée par des outils complémentaires afin de réduire le fardeau de la maladie.

Introduction

Malaria parasites are transmitted to humans by infected female mosquitoes of the genus *Anopheles*, which comprises more than 500 species. About 70 of these species are reported to be vectors of human malaria parasites [38]. The intensity of malaria transmission is exceptionally high in Africa, largely because of the high vectorial capacity of the major vector species, namely *Anopheles gambiae s.s.*, *Anopheles coluzzii, Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus s.s.* These species display strong anthropophilic host-seeking behavior, and have a long life expectancy, and therefore cause large numbers of secondary malaria cases from one infected individual [41]. The entomological inoculation rate (EIR) that represents the average number of infected bites per person per unit time is generally used to measure the intensity of malaria transmission [39]. The EIR in Africa varies greatly between countries and even within small geographical areas [35]. This heterogeneity needs to be considered when planning and implementing vector control strategies.

Long-lasting insecticidal nets (LLINs) are the main vector control tool used in Côte d'Ivoire to reduce malaria transmission [41]. They are developed to provide physical and chemical barriers against vectors which enter houses to bite humans at night [21]. Consequently, the effectiveness of LLINs may depend on parameters such as the susceptibility of vectors to pyrethroids and their biting behavior. Unfortunately, resistance to the four insecticide classes used for public health (pyrethroids, organochlorines, carbamates, and organophosphates) is common in the main malaria vector species across Côte d'Ivoire [6, 24, 36, 43]. This resistance involves multiple mechanisms such as metabolic and target site resistance. *Kdr* (responsible for dichlorodiphenyltrichloroethane and pyrethroid resistance) and *ace-1* mutations (responsible for organophosphate and carbamate resistance) are widespread, but are found at variable frequencies across the country [6, 24, 36, 43]. However, there is very little recent information on the biting behavior of malaria vector species in many areas of Côte d'Ivoire. Studies in several settings across Africa have shown changes in vector biting behaviors by feeding either mainly outdoors, or in the early morning or in the early evening to avoid contact with insecticide-based tools [14, 29, 32].

Understanding malaria transmission at a local scale by determining the main malaria vector species, their abundance, biting behavior, frequencies of insecticide resistance alleles, and EIRs is a prerequisite for developing and implementing effective control and elimination strategies. The present study was conducted as part of a randomized controlled trial (RCT) in the framework of a project called REACT. The project, which was conducted in 26 villages in northern Côte d'Ivoire (Korhogo area) and 27 villages in southwestern Burkina Faso (Diébougou area), was designed to investigate whether the use of vector control strategies in combination with long-lasting insecticidal mosquito nets in areas with intense pyrethroid-resistance provides additional protection against malaria. In this study, we present the results of one year of entomological investigations in the villages of the Korhogo area in Côte d'Ivoire, with the aim of providing an updated description of malaria transmission and obtaining baseline data for the trial. A preprint of this work was published on March 28, 2019 [42].

Materials and methods

Study area

The study area included 26 villages of the department of Korhogo (between 9°10′ and 9°40′ N and between 5°20′ and 5°60′ W) located in northern Côte d'Ivoire, West Africa (Fig. 1). The villages were selected based on an average population size of 300 inhabitants, a distance between two villages of at least 2 km, and accessibility during the rainy season. The Korhogo area is characterized by a Sudanese climate with a unimodal rainfall regimen from May to November. The annual rainfall varies from 1200 to 1400 mm, while the mean annual temperature ranges from 21 to 35 °C. The minimum temperatures can drop to 16 °C due to the Harmattan wind during December and January. The natural vegetation is mainly a mixture of savannah and open forest characterized by trees and shrubs that are approximately 8–15 m in height. The Korhogo area is fed by tributaries of the Bandama River such as the Naramou and Solomougou rivers, which dry up in the dry season. Nevertheless, the area has a high density of water dams that allow agriculture to be practiced throughout the year [17]. Therefore, in areas where the soil is highly conducive to agriculture, most of the local inhabitants are farmers and their staple crops include rice, maize, and cotton. Rice is mainly cultivated during the rainy season in flooded soils although it is also occasionally planted in the dry season in irrigated areas in the vicinity of dams. The main malaria vector control intervention in Korhogo is LLINs which are freely distributed by the government every 3–4 years [33]. The last distribution before this study was performed in 2014. According to surveys conducted within the framework of the REACT project, the mean proportion of households with at least one Insecticide Treated Net (ITN) for every two people in the area was 24% in 2016. Indoor residual spraying and larviciding have so far not been implemented in Côte d'Ivoire.

Mosquito sampling

We performed human landing collections (HLCs) in the 26 villages during four surveys: two in the rainy season (from September 21 to October 10, 2016 and from April 11 to April 29, 2017), and two in the dry season (from November 18 to December 6, 2016 and February 14 to March 04, 2017).

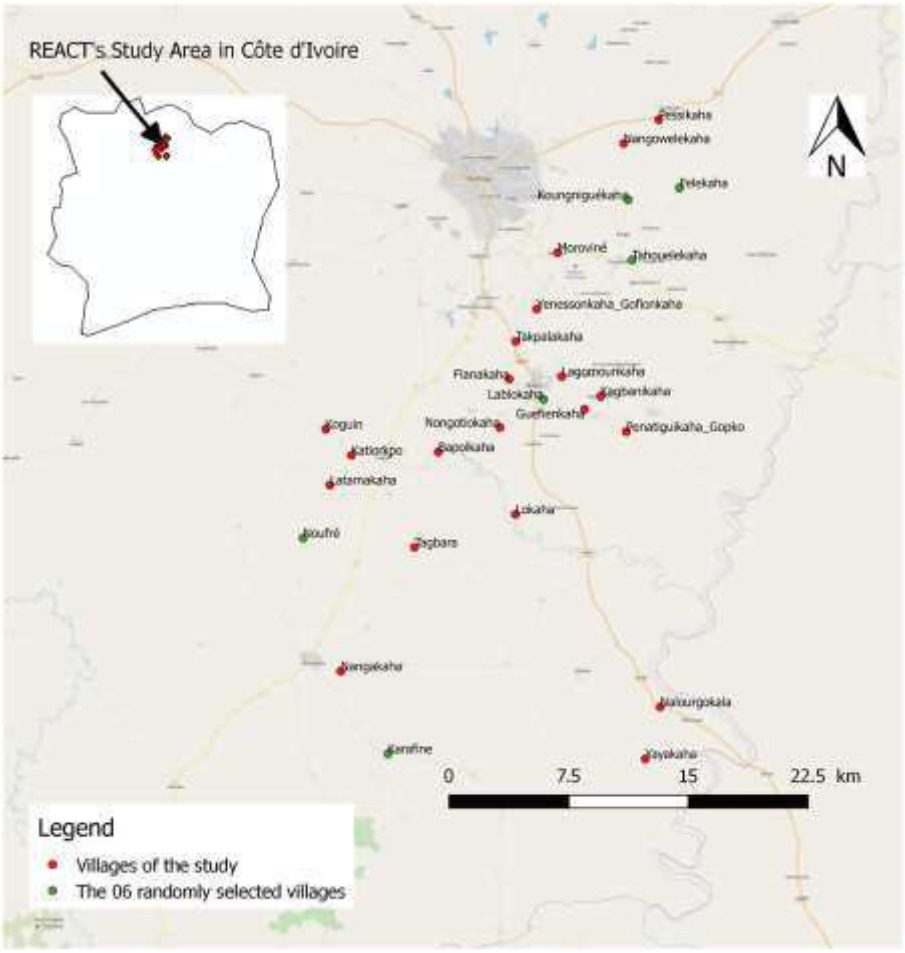

Figure 1. Map of the study area.

In each village, we collected host-seeking mosquitoes during one night per survey from 17:00 to 09:00 in four randomly selected houses. Each selected house had one collector indoors and one collector outdoors. They were rotated between indoor and outdoor collection sites every hour at each selected house to reduce potential collector bias. Collectors were organized into two teams of eight persons in each village; the first group collected from 17:00 to 01:00 and the second from 01:00 to 09:00. Each night of collection, one technician from the Institut Pierre Richet (IPR) assisted by two local supervisors supervised the mosquito collections in each village to ensure that they were performed properly. The details of the indicators used for quality control are given in Supplementary material.

Anopheles vector processing

After collections, we morphologically identified in the field all the mosquitoes to species or species complex level according to established taxonomic keys [16, 17]. Only *Anopheles* spp. mosquitoes were kept and were stored individually in labeled tubes with silica gel at −20 °C for molecular analysis. Due to the very large numbers of vectors collected, we analyzed in the laboratory a subsample of *Anopheles* spp. vectors from six villages (Tahouelékaha, Koungniguékaha, Lablokaha, Felékaha, Noufré, and Karafiné) randomly chosen out of the 26 villages included in the study (Fig. 1). From the vectors collected in these six villages, we randomly selected one individual of *Anopheles gambiae s.l.* per hour per collection site during each survey. We analyzed all the *Anopheles nili* complex individuals and all the members of the Funestus Group collected in the six villages. We extracted DNA from the head and thorax of each specimen of the subsample using the Livak method [25]. We identified sibling species of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction (PCR) [13, 37]. Quantitative PCR (qPCR) was performed to investigate the presence of *kdr* L1014F and *ace-1* G119S mutations in the individuals belonging to the *Anopheles gambiae* complex [2, 12], and to screen all the selected *Anopheles* spp. mosquitoes for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection [4].

Ethics approval

Ethical clearance for the study was granted by the national ethics committee (No. 063/MSHP/CNER-kp). We received

Table 1. Diversity and abundance of mosquito species in the 26 villages in the Korhogo area during the four surveys.

Mosquito species	Number of individual mosquitoes collected per survey				
	September–October 2016	November–December 2016	February–March 2017	April–May 2017	Total
Anopheles gambiae s.l.	24,831	1344	289	2314	28,778
Anopheles funestus group	458	11	0	0	469
Anopheles nili complex	75	96	0	6	177
Anopheles pharoensis	35	1	1	2	39
Anopheles ziemanni	8	2	0	0	10
Anopheles coustani	6	1	0	0	7
Aedes aegypti	18	14	4	18	54
Aedes africanus	4	0	0	0	4
Aedes furcifer	3	0	0	0	3
Aedes hirsutus	1	0	0	0	1
Aedes luteocephalus	37	0	0	0	37
Aedes vittatus	2	0	0	0	2
Culex annuloris	8	0	0	0	8
Culex antennatus	9	6	15	78	108
Culex cinereus	119	0	3	0	122
Culex decens	4	3	2	0	9
Culex ingrami	180	71	40	35	326
Culex nebulosus	21	1	1	51	74
Culex quinquefasciatus	8	0	0	3	11
Culex tigripes	2	0	0	0	2
Mansonia africana	221	149	27	5	402
Mansonia uniformis	126	549	5	0	680
Uranotaenia balfouri	0	1	0	0	1
Total	26,176	2249	387	2512	31,324

Table 2. *Anopheles gambiae* complex species in a subset analyzed.

Survey	Species	Number of individuals analyzed	
		Indoor (%)	Outdoor (%)
September–October	*Anopheles gambiae s.s.*	197 (96.10)	211 (99.06)
	Anopheles coluzzii	8 (3.90)	2 (0.94)
November–December	*Anopheles gambiae s.s.*	74 (96.10)	86 (97.73)
	Anopheles coluzzii	3 (3.90)	2 (2.27)
February–March	*Anopheles gambiae s.s.*	19 (63.33)	24 (61.54)
	Anopheles coluzzii	11 (36.67)	15 (38.46)
April–May	*Anopheles gambiae s.s.*	24 (54.55)	32 (66.67)
	Anopheles coluzzii	20 (45.45)	16 (33.33)
Total	*Anopheles gambiae s.s.*	314 (88.20)	353 (90.98)
	Anopheles coluzzii	42 (11.80)	35 (9.02)
	Total	**356**	**388**

community agreement before the beginning of the study, and we obtained written informed consent from all the mosquito collectors and supervisors. Yellow fever vaccines were administered to all the field staff. Collectors were treated free of charge when they were diagnosed with malaria during the study period. They were also free to withdraw from the study at any time without any consequences.

Data analysis

The human biting rate (HBR) for all malaria vector species was calculated as the number of *Anopheles* vectors (*An. gambiae s.l.*, *An. funestus* group, *An. nili* complex) collected per person per night. The *P. falciparum* sporozoite rate (SR) in each vector species population was calculated as the number of vectors positive for sporozoites over the number of vectors tested. For each survey, the daily EIR was calculated by multiplying the mean HBR for all malaria vector species by the *P. falciparum* SR in all malaria vector species. Statistical analyses were performed using R software [34].

In order to compare HBRs between surveys and between collection positions (indoors or outdoors), we analyzed counts of *Anopheles* vectors (all species) using a negative binomial mixed effect model (function "glmer" from the package lme4) [5]. The fixed variables were the survey, the collection position (indoors/outdoors), and their interaction. Villages and collection houses were used as random intercepts.

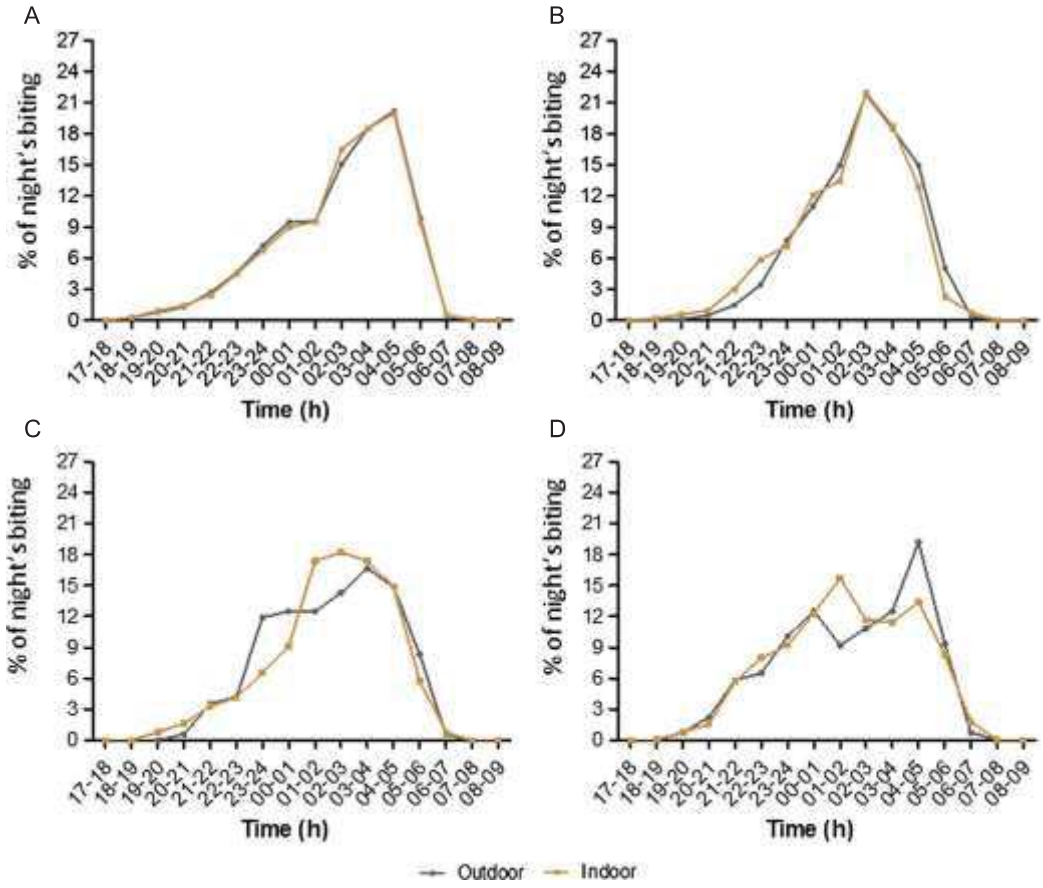

Figure 2. Mean hourly biting activity profiles of *Anopheles gambiae s.l.* mosquitoes in September–October 2016 (A), November–December 2016 (B), February–March 2017 (C), and April–May 2017 (D).

We compared the SR between surveys, species, and collection positions (indoors/outdoors) using a binomial mixed effect model (function "glmer" from the package lme4). The fixed variables were the surveys, the *Anopheles* species, and the collection position (indoors/outdoors). Villages were set as random intercepts.

For both the HBR and SR models, we performed backward stepwise deletion of the fixed terms followed by likelihood ratio tests. We used the Tukey's *post-hoc* test to compare *Anopheles* counts among surveys according to the final model. Rates ratios, odds ratios and their 95% confidence intervals were computed.

In order to compare night biting activity profiles of *An. gambiae s.l.* among surveys, we compared the distribution of collection times using a Kruskal-Wallis rank sum test, followed by a multiple comparison Dunn's *post-hoc* test.

We used the G-test [18] implemented in GenePOP 4.7 and run in R [15] to compare gene frequencies at the *kdr* and *ace-1* loci between *An. gambiae s.s.* and *An. coluzzii*, among surveys, and among villages [34]. We tested the distribution of genotypes at the *kdr* and *ace-1* loci for conformity to Hardy-Weinberg equilibrium within both species of the *An. gambiae* complex, in each survey, and in each village, using exact tests as implemented in GenePOP [34].

Results

We collected a total of 31,324 female mosquitoes belonging to 5 genera (*Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*, and *Uranotaenia*), and 23 species or species complexes/groups in the 26 villages during the four surveys. *Anopheles gambiae s.l.* represented a large proportion of the mosquito species collected, accounting for 94.86%, 59.76%, 74.68%, and 92.12% of the total collected in September–October 2016, November–December 2016, February–March 2017 and April–May 2017, respectively. All the mosquitoes identified as members of the *Funestus* Group and the *An. nili* complex represented less than 2% of the total mosquitoes collected (Table 1). Speciation was successful for 97% of the 764 *An. gambiae s.l.* genotyped to species by PCR. Out of the 356 *An. gambiae s.l.* collected indoors and successfully tested, 314 (88.20%) were *An. gambiae s.s.*, and 42 (11.80%) were *An. coluzzii*. Of the 388 *An. gambiae s.l.* collected outdoors and successfully tested, 353 (90.98%) were *An. gambiae s.s.*, and 35 (9.02%) were *An. coluzzii.* In total, 89.65% of *An. gambiae s.l.* collected and successfully tested were *An. gambiae s.s.*, and 10.35% were *An. coluzzii* (Table 2).

The mean HBR for all malaria vector species (*An. gambiae s.l.*, *Funestus* Group, *An. nili* complex) in the study area was

Table 3. *Plasmodium falciparum* sporozoite rates in a subset of *Anopheles* vectors according to taxonomic groups.

Survey	Species, group or complex	No. positive for Pf	No. tested	SR (%) [95% CI]
September–October 2016	*Anopheles gambiae s.s.*	29	408	7.14 [5.02–10.07]
	Anopheles coluzzii	1	10	10.00 [0.51–40.42]
	Funestus Group	8	47	17.02 [8.89–30.14]
	Anopheles nili complex	1	63	1.59 [0.08–8.46]
	Total	**39**	**528**	**7.39 [5.45–9.94]**
November–December 2016	*Anopheles gambiae s.s.*	14	160	8.75 [5.28–14.15]
	Anopheles coluzzii	1	5	20.00 [1.03–62.45]
	Funestus Group	0	1	0.00 [0.00–94.87]
	Anopheles nili complex	0	1	0.00 [0.00–94.87]
	Total	**15**	**167**	**8.98 [5.52–14.29]**
February–March 2017	*Anopheles gambiae s.s.*	3	43	6.98 [2.40–18.61]
	Anopheles coluzzii	0	26	0.00 [0.00–12.87]
	Funestus Group	–	0	–
	Anopheles nili complex	–	0	–
	Total	**3**	**69**	**4.35 [1.49–12.02]**
April–May 2017	*Anopheles gambiae s.s.*	0	55	0.00 [0.00–6.53]
	Anopheles coluzzii	1	36	2.78 [0.14–14.17]
	Funestus Group	–	0	–
	Anopheles nili complex	–	0	–
	Total	**1**	**91**	**1.10 [0.06–5.96]**

No.: number of mosquitoes; Pf: *Plasmodium falciparum*; SR: Sporozoite rate; [95% CI]: 95% Wilson's confidence interval.

Table 4. *Plasmodium falciparum* sporozoite rates in a subset of *Anopheles* vectors according to locations (indoors and outdoors).

	Location	No. positive	No. tested	SR (%) [95% CI]
September–October	Indoor	17	238	7.14 [4.51–11.14]
	Outdoor	22	290	7.59 [5.06–11.22]
	Total	**39**	**528**	**7.39 [5.45–9.94]**
November–December	Indoor	7	77	9.09 [4.47–17.60]
	Outdoor	8	90	8.89 [4.57–16.57]
	Total	**15**	**167**	**8.98 [5.52–14.29]**
February–March	Indoor	2	30	6.67 [1.85–21.32]
	Outdoor	1	39	2.56 [0.13–13.18]
	Total	**3**	**69**	**4.35 [1.49–12.02]**
April–May	Indoor	0	44	0.00 [0.00–8.03]
	Outdoor	1	47	2.13 [0.11–11.11]
	Total	**1**	**91**	**1.10 [0.06–5.96]**

No.: number of mosquitoes; SR: Sporozoite rate; [95% CI]: 95% Wilson's confidence interval.

Table 5. *Kdr* mutation frequencies in a subset of *Anopheles gambiae s.l.*

		RR	RS	SS	Total	Allelic frequency (%) [95% CI]
September–October	*Anopheles gambiae s.s.*	402	1	0	403	99.88 [99.30–99.99]
	Anopheles coluzzii	9	1	0	10	95 [76.39–99.74]
November–December	*Anopheles gambiae s.s.*	160	0	0	160	100 [98.81–100]
	Anopheles coluzzii	5	0	0	5	100 [72.25–100]
February–March	*Anopheles gambiae s.s.*	37	4	2	43	90.70 [82.70–95.21]
	Anopheles coluzzii	11	11	4	26	63.46 [49.87–75.20]
April–May	*Anopheles gambiae s.s.*	52	2	2	56	94.64 [88.80–97.52]
	Anopheles coluzzii	12	16	8	36	55.56 [44.09–66.46]

RR: homozygous resistant; RS: heterozygote; SS: homozygous susceptible; [95% CI]: 95% Wilson's confidence interval.

35.37 bites per human per night (interquartile range (IQR): 0.00–42.25) during the four surveys. The mean HBR for all malaria vector species was 121.94 (IQR: 68.50–156.50), 6.98 (IQR: 1.00-8.25), 1.39 (IQR: 0.00–1.00), and 11.15 (IQR: 0.00–9.00) bites per human per night in September–October 2016, November–December 2016, February–March 2017 and

April–May 2017, respectively. According to the count model, the HBR for all malaria vector species varied significantly between surveys (χ^2 = 1746.8, df = 3, $p < 0.001$). It was significantly higher in September–October 2016 than in November–December 2016 (OR [95% CI] = 23.82 [18.78, 30.20]), February–March 2017 (OR = 208.60 [155.25, 280.28]), and April–May 2017 (OR = 28.91 [22.07, 37.87]).

Biting patterns of malaria vector populations

More vectors were collected outdoors than indoors (OR [95% CI] = 1. 26 [1.16–1.37], $p < 0.001$), and the outdoor biting rate did not vary significantly between the surveys (χ^2 = 3.24, df = 3, $p = 0.3693$). During the four surveys, indoor and outdoor biting activities of *An. gambiae s.l.* occurred from dusk to dawn. Both indoor and outdoor biting activities of *An. gambiae s.l.* peaked between 04:00 and 05:00 in September–October 2016 and between 02:00 and 03:00 in November–December 2016 (Fig. 2A and B). In February–March 2017, the majority of indoor and outdoor bites by *An. gambiae s.l.* occurred between 01:00 and 04:00 and between 03:00 and 04:00, respectively (Fig. 2C). In the April–May 2017 survey, both the indoor and outdoor biting activity curves of *An. gambiae s.l.* showed a bimodal shape. Indoors, there was one peak between 01:00 and 02:00, and a smaller one between 04:00 and 05:00. Outdoors, there was one peak between 00:00 and 01:00, and a higher one between 04:00 and 05:00 (Fig. 2D). The biting activity profiles of *An. gambiae s.l.* differed significantly between surveys (Kruskal–Wallis chi-squared = 217.76, df = 3, *p*-value < 0.001), with activity during the first survey (September–October 2016) peaking later than during the other surveys (Dunn Test *p*-values < 0.001).

Infection with *P. falciparum* sporozoites and EIRs

Plasmodium falciparum sporozoite infection rates per species and surveys are presented in Table 3. The *P. falciparum* sporozoite rate in malaria vector populations was 7.41% (95% IC: 5.47–9.98), 8.98% (95% IC: 5.52–14.29), 4.41% (95% IC: 1.51–12.18), and 1.10% (95% IC: 0.06–5.96) in September–October 2016, November–December 2016, February–March 2017, and April–May 2017, respectively (Table 3). There were no significant differences in the *P. falciparum* sporozoite rates between malaria vector species (χ^2 = 7.5, df = 3, $p = 0.057$) and surveys (χ^2 = 4.9, df = 3, $p = 0.179$). *Plasmodium falciparum* sporozoite infection rates in malaria vector populations according to location (indoors and outdoors) are presented in Table 4. The *P. falciparum* sporozoite rates did not differ significantly depending on whether malaria vectors were collected indoors or outdoors (χ^2 = 0.0796, df = 1, $p = 0.78$).

Overall, an unprotected individual living in the Korhogo area was estimated to receive an average of 9.04, 0.63, 0.06 and 0.12 infected bites per night in September–October 2016, November–December 2016, February–March 2017, and April–May 2017, respectively. In September–October 2016, an estimated 0.69 infected bites per night (i.e., 20.7 per month) occurred between 17:00 and 22:00. The average EIR recorded in this study was 2.46 infected bites per person per night.

Frequencies of the *kdr* and *ace-1* alleles

The frequency of the *kdr* allele in the *An. gambiae s.s.* population (frequency range: 90.70–100%) was very high throughout the study periods (Table 5). It was significantly higher in September–October 2016 than in February–March 2017 ($p < 0.001$) and April–May ($p < 0.001$). The frequency of the *kdr* allele in the *An. gambiae s.s.* population in September–October 2016 did not differ from that of November–December 2016 ($p = 1.00$). The frequency of the *kdr* allele in the *An. coluzzii* population ranged from 55.6% to 100% during the four surveys (Table 5). It was significantly higher in September–October 2016 than in February–March 2017 ($p < 0.001$) and April–May 2017 ($p < 0.001$). The frequency of the *kdr* allele in the *An. coluzzii* population did not vary significantly between September–October 2016 and November–December 2016 ($p = 1.00$). The *kdr* allele was more frequent in the *An. gambiae s.s.* than in the *An. coluzzii* population ($p < 0.001$). We found significant variations in the frequency of the *kdr* allele in the *An. gambiae s.s.* ($p < 1 \times 10^{-4}$) and *An. coluzzii* ($p = 0.020$) populations among the six villages. For each survey, genotype frequencies of *kdr* in the *An. gambiae s.s* and *An. coluzzii* populations from each of the six villages were not different from the Hardy–Weinberg expectations ($p > 0.05$).

The *ace-1* frequency in the *An. gambiae s.s.* population ranged from 15.18 to 30.05% throughout the study periods (Table 6). The frequency of the *ace-1* allele in the *An. gambiae s.s.* population was significantly higher in September–October

Table 6. *Ace1* mutation frequencies in a subset of *Anopheles gambiae s.l.*

		RR	RS	SS	Total	Allelic frequency (%) [95% CI]
September–October	*Anopheles gambiae s.s.*	41	156	199	396	30.05 [26.96–33.33]
	Anopheles coluzzii	0	1	9	10	5 [0.26–23.61]
November–December	*Anopheles gambiae s.s.*	15	43	101	159	22.96 [18.67–27.88]
	Anopheles coluzzii	0	0	5	5	0 [0–27.75]
February–March	*Anopheles gambiae s.s.*	2	12	29	43	18.60 [11.79–28.10]
	Anopheles coluzzii	0	0	26	26	0 [0–6.88]
April–May	*Anopheles gambiae s.s.*	3	11	42	56	15.18 [9.70–22.97]
	Anopheles coluzzii	0	1	35	36	1.39 [0.07–7.46]

RR: homozygous resistant; RS: heterozygote; SS: homozygous susceptible; [95% CI]: 95% Wilson's confidence interval.

2016 than in November–December 2016 ($p = 0.021$), February–March 2017 ($p = 0.026$) and April–May 2017 ($p < 0.001$). The frequency of the *ace-1* allele in the *An. coluzzii* population (frequency range: 15.18–30.05%) did not vary significantly among the four surveys ($p = 0.278$). The *ace-1* allele was significantly more frequent in the *An. gambiae s.s.* than in *An. coluzzii* population ($p < 1 \times 10^{-4}$). The frequency of the *ace-1* allele in the *An. gambiae s.s.* population varied significantly among the six villages ($p < 1 \times 10^{-4}$). The frequency of the *ace-1* allele in the *An. coluzzii* population did not vary significantly among the six villages ($p = 0.211$). For each survey, genotype frequencies of *ace-1* in the *An. gambiae* and *An. coluzzii* populations from each of the six villages did not differ from the Hardy–Weinberg proportions ($p > 0.05$).

Discussion

Anopheles gambiae s.l. is by far the main malaria vector in the Korhogo area, irrespective of the season, but its abundance varied significantly according to the season. The risk of being bitten by malaria vector mosquitoes was found to be up to 200-fold higher in September–October 2016 (rainy season) than in February–March 2017 (dry season). These results are consistent with the bionomics of *An. gambiae s.s*. Indeed, the breeding habitats of this species are known to increase in number and productivity during the rainy season but almost disappear during the dry season [30]. In September–October 2016 (rainy season), an unprotected individual in the Korhogo area received an estimated nine infected bites per night (i.e., 270 per month). Korhogo is a rural area where several crops including rice are cultivated. Rice paddies are strongly associated with very high densities of malaria vectors [20]. In this study, we found a mean annual EIR of 897.9 infected bites per person per year. Research conducted so far in Africa has reported mean annual EIRs ranging from <1 to >1000 infected bites per person per year [3]. Therefore, Korhogo ranks at the top level among malaria endemic areas in terms of the intensity of transmission.

Our results revealed that malaria vector populations were significantly exophagic in both the rainy and dry seasons, with no significant difference in outdoor biting rates between seasons. Furthermore, we found that indoor and outdoor biting activities of *An. gambiae s.l.* peaked later (4–5 am) in September–October 2016 than in the other three surveys. The influence of genetic factors in the biting behaviors of malaria vectors remains poorly understood [26]. However, some studies have shown that *Anopheles* vectors can adjust their biting behavior in response to a small change in environmental parameters such as temperature [9, 31]. During the four surveys, we recorded environmental data (temperature, humidity, atmospheric pressure, and light intensity) at all the sites during collection. These data would help establish a possible link between environmental variables and the biting behaviors of vectors. It is more and more obvious that LLINs alone are unable to eliminate malaria in high malaria burden countries [19]. In this study, we found that an estimated 0.69 infected bites (i.e., 20.7 per month) occurred daily in September–October 2016 between 17:00 and 22:00 when human populations are potentially unprotected by ITNs. Nonetheless, our results need to be adjusted to the behaviors of the local human populations in terms of sleeping hours, outdoor activities and ITN use in order to more accurately measure human exposure to *Plasmodium* sp.-infected mosquito bites in the Korhogo area [28]. We will address this research question in another publication using additional data collected in the framework of the REACT project.

Consistent with recent studies carried out in the Korhogo area [6, 24], we found very high frequencies of the *kdr* mutation in the *An. gambiae* complex population during the four surveys. The *kdr* mutation has almost reached fixation in *An. gambiae s.s.* population across Côte d'Ivoire [6]. We identified the *ace-1* allele in the *An. gambiae* complex populations at frequencies ranging from 0 to 30.05% during the four surveys. A recent study has shown that *An. gambiae s.l.* mosquitoes from Korhogo are highly resistant to pyrethroids, organochlorides, and carbamates, but susceptible to organophosphates [6]. Accordingly, the use of organophosphates may represent a valuable strategy for the control of this high insecticide resistant vector population. However, this approach would select genotypes bearing *ace-1* mutations which display resistance to organophosphates although the *ace-1* mutation confers a lower resistance level to organophosphates than carbamates [11]. In our study, we found spatial and temporal variations of the *kdr* and *ace-1* frequencies in the *An. gambiae* complex population. The frequencies of insecticide resistance alleles in malaria vector populations are known to be influenced by the selective pressures from insecticides used in agriculture and public health, as well as by the fitness costs associated with resistance alleles in the absence of insecticide [1, 10, 23, 27, 40]. Both the *kdr* and *ace-1* alleles were significantly more frequent in the *An. gambiae s.s.* than in the *An. coluzzii* population. These differences in *kdr* and *ace-1* frequencies between *An. gambiae s.s.* and *An. coluzzii* have been observed in many areas of Africa [7, 8, 12].

This study demonstrated that malaria vectors were more likely to feed outdoors than indoors, and the frequencies of the *kdr* allele were very high in *An. gambiae s.l.* populations. Moreover, we found that the risk of malaria transmission was significant when people are potentially active. Therefore, malaria transmission would still continue in the Korhogo area even with full coverage of LLINs. A large-scale multi-country study published recently showed conclusively that LLINs are still protective against malaria despite widespread resistance to pyrethroids [22]. However, malaria control in high endemic areas such as Korhogo needs to be strengthened with complementary tools to alleviate the burden of the disease. Therefore, efforts need to be dedicated to evaluating the effectiveness of promising tools to be used in combination with LLINs in high endemic areas. The REACT project will provide data on the impact of four potential strategies on clinical malaria and transmission in two high endemic areas of Burkina-Faso and Côte d'Ivoire. Two of these strategies, i.e., larviciding with *Bti* and use of ivermectin in cattle and other small ruminants, are in late stages of development, while the two others, i.e., intensive communication for human behavioral changes and indoor residual spraying of insecticide, are already available in the vector control arsenal against malaria.

Conclusions

Malaria transmission in the Korhogo area was mainly due to *An. gambiae s.s.* and *An. Coluzzii*, while *An. funestus* group species and *An. nili* complex species played minor roles. The frequencies of the *kdr* mutation in the *An. gambiae* complex population were very high, whereas *ace-1* frequencies were moderate. Malaria vectors in Korhogo were more exophagic. The intensity of malaria transmission is extremely high in the Korhogo area, especially during the rainy season. Malaria control in such highly endemic areas needs to be strengthened with complementary tools in order to reduce the burden of the disease.

Acknowledgements. We thank all the mosquito collectors and supervisors for their commitment in the field. We also thank Aboubacar Koné, Akoliba Patrice Azaibou, Youssouf Dosso, Serges Koffi, Koffi Guillaume Konan and Rosine Wolie for their technical assistance.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Funding

This work was part of the REACT project, funded by the French Initiative 5% – Expertise France (No. 15SANIN213).

Author contributions

BZ, AAK, NM and CP conceived and designed the study. BZ oversaw the surveys under the supervision of LPAA, AAK and CP. NM, CP, AD and BZ analyzed the data. BZ drafted the manuscript which was revised by the co-authors. All authors read and approved the final manuscript.

Supplementary material

Supplementary materials are available at https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2019040/olm.

References

1. Awolola TS, Oduola AO, Oyewole IO, Obansa JB, Amajoh CN, Koekemoer LL, Coetzee M. 2007. Dynamics of knockdown pyrethroid insecticide resistance alleles in a field population of *Anopheles gambiae s.s.* in southwestern Nigeria. Journal of Vector Borne Diseases, 44, 181–188.
2. Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, Williamson MS, Ranson H, Ball A, Vontas J, Field LM. 2007. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. Malaria Journal, 6, 111.
3. Beier JC, Killeen GF, Githure JI. 1999. Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61, 109–113.
4. Boissière A, Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambéné PH, Nsango SE, Morlais I. 2013. Application of a qPCR Assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the m and s molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. PLoS One, 8, e54820.
5. Brooks ME, Kristensen K, van Benthem KJ, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, Skaug HJ, Mächler M, Bolker BM. 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. The R Journal, 9(2), 378–400.
6. Camara S, Koffi AA, Ahoua ALP, Koffi K, Kabran J-PK, Koné A, Koffi MF, N'Guessan R, Pennetier C. 2018. Mapping insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (s.l.) from Côte d'Ivoire. Parasites & Vectors, 11, 19.
7. Dabiré KR, Diabaté A, Namontougou M, Djogbenou L, Kengne P, Simard F, Bass C, Baldet T. 2009. Distribution of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae s.l.* populations from Burkina Faso (West Africa). Tropical Medicine and International Health, 14, 396–403.
8. Dabiré RK, Namountougou M, Diabaté A, Soma DD, Bado J, Toé HK, Bass C, Combary P. 2014. Distribution and frequency of kdr mutations within *Anopheles gambiae* s.l. populations and first report of the ace.1g119 s mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). PLoS One, 9, e101484.
9. Dao A, Yaro AS, Diallo M, Timbine S, Huestis DL, Kassogue Y, Traore AI, Sanogo ZL, Samake D, Lehmann T. 2014. Signatures of aestivation and migration in Sahelian malaria mosquito populations. Nature, 516, 387–390.
10. Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akogbeto M, Guiguemde TR, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small GJ, Hougard JM. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 67, 617–622.
11. Djogbénou L, Weill M, Hougard JM, Raymond M, Akogbéto M, Chandre F. 2007. Characterization of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): resistance levels and dominance. Journal of Medical Entomology, 44, 805–810.
12. Essandoh J, Yawson AE, Weetman D. 2013. Acetylcholinesterase (Ace-1) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae s.s.* and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana. Malaria Journal, 12, 404.
13. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I, Louis C. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* Insect Molecular Biology, 10, 19–23.
14. Fornadel CM, Norris LC, Glass GE, Norris DE. 2010. Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern Zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 83, 848–853.
15. François R, Jimmy Lopez KB. 2017. Population genetic data analysis using genepop. (R package version 1.0.5).
16. Gillies MT. 1987. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). Publications of the South African Institute for Medical Research, 55, 1–143.
17. Gillies M, Meillon D. 1968. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 54, 1–343.
18. Goudet J, Raymond M, de Meeüs T, Rousset F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. Genetics, 144, 1933–1940.
19. Griffin JT, Hollingsworth TD, Okell LC, Churcher TS, White M, Hinsley W, Bousema T, Drakeley CJ, Ferguson NM, Basáñez M-G, Ghani AC. 2010. Reducing *Plasmodium*

falciparum malaria transmission in Africa: a model-based evaluation of intervention strategies. PLoS Medicine, 7, e1000324.
20. Ijumba JN, Lindsay SW. 2001. Impact of irrigation on malaria in Africa: paddies paradox. Medical and Veterinary Entomology, 15, 1–11.
21. Killeen GF. 2014. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. Malaria Journal, 13, 330.
22. Kleinschmidt I, Bradley J, Knox TB, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, Ismail BA, Bigoga JD, Adechoubou A, Raghavendra K, Cook J, Malik EM, Nkuni ZJ, Macdonald M, Bayoh N, Ochomo E, Fondjo E, Awono-Ambene HP, Etang J, Akogbeto M, Bhatt RM, Chourasia MK, Swain DK, Kinyari T, Subramaniam K, Massougbodji A, Okê-Sopoh M, Ogouyemi-Hounto A, Kouambeng C, Abdin MS, West P, Elmardi K, Cornelie S, Corbel V, Valecha N, Mathenge E, Kamau L, Lines J, Donnelly MJ. 2018. Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: a WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. Lancet Infectious Diseases, 18, 640–649.
23. Kliot A, Ghanim M. 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Management Science, 68, 1431–1437.
24. Koffi AA, Ahoua Alou LP, Kabran JPK, N'Guessan R, Pennetier C. 2013. Re-visiting insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire: a nation-wide informative survey. PLoS One, 8, 1–10.
25. Livak KJ. 1984. Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. Genetics, 107, 611–634.
26. Maliti DV, Marsden CD, Main BJ, Govella NJ, Yamasaki Y, Collier TC, Kreppel K, Chiu JC, Lanzaro GC, Ferguson HM, Lee Y. 2016. Investigating associations between biting time in the malaria vector *Anopheles arabiensis* Patton and single nucleotide polymorphisms in circadian clock genes: support for sub-structure among *An. arabiensis* in the Kilombero valley of Tanzania. Parasites & Vectors, 9, 109.
27. Mathias DK, Ochomo E, Atieli F, Ombok M, Nabie Bayoh M, Olang G, Muhia D, Kamau L, Vulule JM, Hamel MJ, Hawley WA, Walker ED, Gimnig JE. 2011. Spatial and temporal variation in the kdr allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in Western Kenya. Malaria Journal, 10, 10.
28. Moiroux N, Damien GB, Egrot M, Djenontin A, Chandre F, Corbel V, Killeen GF, Pennetier C. 2014. Human exposure to early morning *Anopheles funestus* biting behavior and personal protection provided by long-lasting insecticidal nets. PLoS One, 9, e104967.
29. Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin A, Chandre F, Djègbé I, Guis H, Corbel V. 2012. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. Journal of Infectious Diseases, 206, 1622–1629.
30. Mourou J-R, Coffinet T, Jarjaval F, Cotteaux C, Pradines E, Godefroy L, Kombila M, Pagès F. 2012. Malaria transmission in Libreville: results of a one year survey. Malaria Journal, 11, 40.
31. Ngowo HS, Kaindoa EW, Matthiopoulos J, Ferguson HM, Okumu FO. 2017. Variations in household microclimate affect outdoor-biting behaviour of malaria vectors. Wellcome Open Research, 2, 102.
32. Ojuka P, Boum Y, Denoeud-Ndam L, Nabasumba C, Muller Y, Okia M, Mwanga-Amumpaire J, De Beaudrap P, Protopopoff N, Etard JF. 2015. Early biting and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles* might compromise the effectiveness of vector control intervention in Southwestern Uganda. Malaria Journal, 14, 1–8.
33. PNLP: Programme National de Lutte Contre le Paludisme en Côte d'Ivoire. 2014. Plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2012–2015 (période replanifiée 2014–2017). Approche stratifiée de mise à l'échelle des interventions de lutte contre le paludisme en Côte d'Ivoire et consolidation des acquis. Abidjan: Ministère de La Santé et l'Hygiène Publique. 149 p.
34. Raymond MRF. 1995. GENEPOP Version 1.2. A population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity, 26, 248–249.
35. Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC. 2003. Malaria transmission in urban subsaharian Africa. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 68, 169–176.
36. Sadia-Kacou CMA, Alou LPA, Edi AVC, Yobo CM, Adja MA, Ouattara AF, Malone D, Koffi AA, Tano Y, Koudou BG. 2017. Presence of susceptible wild strains of *Anopheles gambiae* in a large industrial palm farm located in Aboisso, South-Eastern of Côte d'Ivoire. Malaria Journal, 16, 157.
37. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 49, 520–529.
38. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. 2012. A global map of dominant malaria vectors. Parasites & Vectors, 5, 69.
39. Trape JF, Tall A, Sokhna C, Ly AB, Diagne N, Ndiath O, Mazenot C, Richard V, Badiane A, Dieye-Ba F, Faye J, Ndiaye G, Diene Sarr F, Roucher C, Bouganali C, Bassène H, Touré-Baldé A, Roussilhon C, Perraut R, Spiegel A, Sarthou JL, da Silva LP, Mercereau-Puijalon O, Druilhe P, Rogier C. 2014. The rise and fall of malaria in a west African rural community, Dielmo, Senegal, from 1990 to 2012: a 22 year longitudinal study. Lancet Infectious Diseases, 14, 476–488.
40. Verhaeghen K, Van Bortel W, Roelants P, Okello PE, Talisuna A, Coosemans M. 2010. Spatio-temporal patterns in kdr frequency in permethrin and DDT resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Uganda. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 82, 566–573.
41. WHO. 2018. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization.
42. Zogo B, Soma DD, Tchiekoi BN, Somé A, Alou LPA, Koffi AA, Fournet F, Dahounto A, Coulibaly B, Kandé S, Dabiré RK, Baba-Moussa L, Moiroux N, Pennetier C. 2019. *Anopheles* bionomics, insecticide resistance mechanisms and malaria transmission in the Korhogo area, northern Côte d'Ivoire: a pre-intervention study. BioRxiv, 589556.
43. Zoh DD, Ahoua Alou LP, Toure M, Pennetier C, Camara S, Traore DF, Koffi AA, Adja AM, Yapi A, Chandre F. 2018. The current insecticide resistance status of *Anopheles gambiae (s.l.)* (Culicidae) in rural and urban areas of Bouaké, Côte d'Ivoire. Parasites & Vectors, 11, 118.

Cite this article as: Zogo B, Soma DD, Tchiekoi BN, Somé A, Ahoua Alou LP, Koffi AA, Fournet F, Dahounto A, Coulibaly B, Kandé S, Dabiré RK, Baba-Moussa L, Moiroux N Pennetier C. 2019. *Anopheles* bionomics, insecticide resistance mechanisms, and malaria transmission in the Korhogo area, northern Côte d'Ivoire: a pre-intervention study. Parasite **26**, 40.

PARASITE

An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.
All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
http://parasite.edmgr.com/

Chapitre 5. Identification et caractérisation des gîtes larvaires d'*Anopheles spp.* à Korhogo avant le déploiement des stratégies de lutte complémentaires

La lutte anti-larvaire (LAL) vise les stades immatures du vecteur dans les gîtes où il est le plus vulnérable car il est incapable d'échapper aux interventions de lutte. Toutefois, la LAL est très spécifique du lieu et des espèces vectrices présentes. Elle nécessite alors, pour être efficace, une connaissance approfondie des gîtes larvaires locaux, notamment ceux qui sont les plus productifs. Ceci implique donc des études préalables à l'échelle locale pour identifier et caractériser les gîtes potentiels des vecteurs majeurs. Malheureusement, depuis les années 1940, la recherche sur l'écologie larvaire des vecteurs des *Plasmodium spp.* en Afrique sub-saharienne a beaucoup été négligée en raison des succès obtenus grâce aux outils dirigés contre les anophèles adultes (Walker and Lynch 2007).

An. gambiae s.s., An. coluzzii, An. nili s.l. et le groupe *An. funestus* ont été identifiés comme responsables de la transmission de *P. falciparum* à Korhogo. Le groupe *An. funestus* et *An. nili s.l.*, les vecteurs secondaires, sont connus pour exploiter des gîtes larvaires peu variés. En effet, les larves du groupe *An. funestus* se développent préférentiellement dans des marais, le long des cours d'eau avec une végétation naturelle et dans des rizières (Gillies and de Meillon 1968; Pages *et al*. 2007). Quant à *An. nili s.l.*, il colonise préférentiellement les cours d'eau à courant rapide et contenant de la végétation et/ou des débris flottants (Gillies and de Meillon 1968; Pages *et al*. 2007). Par contre, *An. gambiae s.l.*, le vecteur majeur de *P. falciparum* à Korhogo, peut exploiter divers types d'habitat, de tailles variables, temporaires, semi-permanents ou permanents (Gillies and de Meillon 1968; Carnevale and Robert 2009). Les données historiques indiquent que les larves d'*An. gambiae s.l.* se développent dans de petites collections d'eau, temporaires, ensoleillées et très peu polluées (Gillies and de Meillon 1968). Cependant, les enquêtes plus récentes révèlent que le complexe d'espèce peut se retrouver dans des gîtes atypiques comme ceux pollués par des matières organiques, des hydrocarbures et des métaux lourds (Oyewole *et al*. 2007; Fournet *et al*. 2010). De plus, *An. gambiae s.l.* s'adapte aux gîtes créés par les activités humaines ou animales comme les zones maraîchères, les réseaux d'irrigation, empreintes de pas ou de sabots, des fossés d'irrigation et d'autres collections d'eau artificielles (Walker and Lynch 2007; Carnevale and Robert 2009).

Dans la présente étude, nous avons identifié les gîtes larvaires potentiels d'anophèles à Korhogo et les avons caractérisés en nous basant sur des variables environnementales et physiques. De plus, nous avons hiérarchisé les gîtes en analysant leur productivité et leur capacité à permettre un développement larvaire complet. L'étude a été menée pendant la saison pluvieuse (28 Octobre au 8 Novembre 2016) et la saison sèche (16 au 27 Mars 2017). Elle visait à servir de guide pour la mise en œuvre de la stratégie anti-larvaire dans le cadre de l'essai contrôlé randomisé. Les résultats ont montré que les anophèles colonisent une grande variété de gîtes larvaires à Korhogo : 11 types différents pendant la saison pluvieuse et 6 pendant la saison sèche. La grande majorité des gîtes larvaires (>90%) étaient localisés dans une zone verte (pas de maison dans un rayon de 50 m). De plus, la densité des larves d'anophèles par unité de surface a été significativement plus élevée dans les gîtes larvaires présentes dans les zones vertes que dans les gîtes larvaires entourés d'habitats denses. Les zones vertes représentent des surfaces cultivées, notamment les rizières qui s'étendent sur plusieurs hectares. En saison pluvieuse, elles couvrent des surfaces très larges, en général des dizaines d'hectares dans un rayon de 2 km autour de chaque village. En saison sèche par contre, les gîtes larvaires dont les rizières, sont moins étendus. Ils seraient plus stables pendant cette saison parce qu'ils étaient plus susceptibles de produire de nymphes par unité de surface que pendant la saison pluvieuse. Ces résultats nous ont poussé à décider de mettre en œuvre les interventions anti-larvaires pendant la période allant de la fin de la saison pluvieuse à la saison sèche pour un meilleur rapport coût/efficacité.

Zogo *et al. Parasites Vectors* (2019) 12:146
https://doi.org/10.1186/s13071-019-3404-0

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Identification and characterization of *Anopheles* spp. breeding habitats in the Korhogo area in northern Côte d'Ivoire: a study prior to a *Bti*-based larviciding intervention

Barnabas Zogo[1,2,3*], Alphonsine A. Koffi[1], Ludovic P. Ahoua Alou[1], Florence Fournet[2,4], Amal Dahounto[2,5], Roch Kounbobr Dabiré[5], Lamine Baba-Moussa[3], Nicolas Moiroux[2,5†] and Cédric Pennetier[1,2†]

Abstract

Background: Although larviciding may be a valuable tool to supplement long-lasting insecticide nets (LLINs) in West Africa in different ecological settings, its actual impact on malaria burden and transmission has yet to be demonstrated. A randomized controlled trial was therefore undertaken to assess the effectiveness of larviciding using *Bacillus thuringiensis israeliensis* (*Bti*) in addition to the use of LLINs. In order to optimally implement such a larviciding intervention, we first aimed to identify and to characterize the breeding habitats of *Anopheles* spp. in the entire study area located in the vicinity of Korhogo in northern Côte d'Ivoire.

Methods: We conducted two surveys during the rainy and the dry season, respectively, in the thirty villages around Korhogo involved in the study. In each survey, water bodies located within a 2 km radius around each village were identified and assessed for the presence of mosquito larvae. We morphologically identified the larvae to the genus level and we characterized all of the habitats positive for *Anopheles* spp. larvae based on a predefined set of criteria.

Results: Overall, 620 and 188 water bodies positive for *Anopheles* spp. larvae were sampled in the rainy and the dry season, respectively. A broad range of habitat types were identified. Rice paddies accounted for 61% and 57% of the habitats encountered in the rainy and the dry season, respectively. In the rainy season, edges of rivers and streams (12%) were the second most abundant habitats for *Anopheles* spp. larvae. More than 90% of the *Anopheles* spp. breeding habitats were surrounded by green areas. Dams, ponds and drains produced higher numbers of *Anopheles* spp. larvae per square meter than rice paddies (RR = 1.51; 95% CI: 1.18–1.94; $P = 0.0010$). The density of *Anopheles* spp. larvae was significantly higher in habitats surrounded by low-density housing (RR = 4.81; 95% CI: 1.84–12.60; $P = 0.0014$) and green areas (RR = 3.96; 95% CI: 1.92–8.16; $P = 0.0002$] than habitats surrounded by high-density housing. Turbid water [RR = 1.42 (95% CI: 1.15–1.76; $P = 0.0012$) was associated with higher densities of *Anopheles* spp. larvae. The likelihood of finding mosquito pupae in *Anopheles* spp. breeding habitats was higher in the dry season (OR = 5.92; 95% CI: 2.11–16.63; $P = 0.0007$) than in the rainy season.

Conclusions: Rice paddies represented the most frequent habitat type for *Anopheles* spp. larvae in the Korhogo area during both the rainy and the dry seasons. *Anopheles* spp. breeding habitats covered a very large and dynamic area

*Correspondence: barnabas.zogo@ird.fr
†Nicolas Moiroux and Cédric Pennetier contributed equally to this work
[2] MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

in the rainy season whereas they were fewer in number in the dry season. In this context, implementing a larviciding strategy from the end of the rainy season to the dry season is presumably the most cost-effective strategy.

Keywords: Malaria, Larvae, Rice, Larviciding, Randomized controlled trial

Background

Following the development of insecticide-based tools such as indoor residual spraying (IRS) and insecticide treated nets (ITN), the focus of malaria vector control has shifted from larval to adult control [1]. These tools that reduce vector survivorship have proved to exhibit a strong impact on vectorial capacity and are accountable for the recent decrease in malaria burden [2, 3]. Nevertheless, with growing concerns of insecticide resistance and a shift to early feeding and outdoor dwelling vectors, the World Health Organization (WHO) has promoted the Integrated Vector Management (IVM) approach. In this approach, multiple control tools are combined to improve their efficacy, cost-effectiveness and sustainability [4]. Accordingly, larval source management (LSM) is now being reappraised in Africa as a supplementary tool for vector control with the objective of targeting *Anopheles* populations including those causing the residual transmission despite high LLIN/IRS coverage [5].

LSM targets the immature stage of mosquitoes, which is more vulnerable to intervention as mosquito larvae are confined to their breeding habitats and are hence unable to avoid being exposed to treatments. This control method has been associated with the malaria eradication successes achieved to date either through modification of larval habitats or through chemical larvicide interventions [6, 7]. In Africa, LSM has so far received scant attention, although the striking success of *Anopheles gambiae* eradication in Brazil by larviciding may now drive its implementation in similar settings in Africa [7]. According to the WHO interim recommendations, LSM is more suitable for urban areas where the number, the type, and the access to larval habitats can allow for adequate coverage [8]. Many studies have provided evidence of the effectiveness of LSM in different settings in Africa, especially in urban areas [5, 9, 10]. Very few studies have been carried out, however, in rural areas of Africa because *Anopheles* spp. habitats are often poorly defined and blanket treatment of all water bodies is clearly technically and financially challenging. It has been shown that when aquatic habitats are too numerous, LSM is likely to fail unless the most productive habitats are targeted and the levels of coverage limited [11]. Interestingly, a model developed by Killeen et al. [12] predicted that ITN combined with larval control that reduces the number of emerging adult vectors by 50% can result in a 15- to 25-fold reduction in the entomological inoculation rate (EIR), even in highly endemic areas. Moreover, a larval control that targets the most productive habitats has been shown to be more cost-effective [11].

Côte d'Ivoire, in West Africa, is among the top 15 countries in the world that account for more than three-quarters of the global malaria burden [3]. Vector control in Côte d'Ivoire, as in most sub-Saharan countries, mainly relies on the use of LLINs. The Korhogo region in northern Côte d'Ivoire is a lowland rice cultivation area where the density of adult vectors has been reported to be very high, especially during the rainy season [13]. It has been hypothesized that rice production may contribute to relieving the burden of malaria by raising living standards, which in turn can make medicines, quality housing and adequate nutrition more affordable [14]. However, rice fields are known to provide suitable breeding habitats for *Anopheles gambiae* (*s.l.*), which is the main malaria vector in sub-Saharan Africa [14].

Unlike adult vector control tools that are implemented almost systematically in homes, *Anopheles* spp. breeding habitats need to be sought out prior to LSM interventions. To date, studies on *Anopheles* spp. larval ecology have been rather limited in Africa, mainly due to the overreliance on adult vector control tools and the difficulty with sampling in areas where larval habitats are numerous and temporary. Historical data on *Anopheles* spp. larval ecology indicate that *An. gambiae* (*s.l.*) larvae develop in freshwater habitats that are small, temporary, clean and sun-exposed [15]. However, there is a growing body of evidence that these larvae may in fact breed in any available water, even in dirty and polluted habitats [1, 16]. In this study, we identified and characterized *Anopheles* spp. breeding habitats in the Korhogo area. Moreover, in order to rank the breeding habitats, we analyzed their productivity and their capacity to allow completion of larval development. We conducted the present study prior to a randomized controlled trial (RCT) in the frame of the project called REACT, which aims to assess the effectiveness of four strategies complementary to ITNs, including larviciding with *Bacillus thuringiensis israeliensis* (*Bti*) in the Korhogo area in northern Côte d'Ivoire. *Bti* has been chosen because it is highly selective and the probability of development of resistance to *Bti* in the field is very low [5].

Methods

Study site

The study area included 30 villages of the department of Korhogo (9°10′–9°40′N, 5°20′–5°60′W) located in northern Côte d'Ivoire, West Africa (Fig. 1). The villages were selected based on an average population size of 300 inhabitants, a distance between two villages of at least 2 km, and accessibility during the rainy season. The Korhogo department is characterized by a Sudanese climate with a unimodal rainfall regimen from May to November. The annual rainfall varies from 1200 to 1400 mm while the mean annual temperature ranges between 21–35 °C. The minimum temperatures can drop to 16 °C in January due to the Harmattan wind during December and January. The vegetation is a mixture of savannah and open forest characterized by trees and shrubs that are approximately 8–15 m in height. The Korhogo department is fed by tributaries of the Bandama River such as the Naramou and the Solomougou, which dry out considerably in the dry season. Nevertheless, the area has a high density of water dams that allow agriculture to be practiced throughout the year [17]. Therefore, in areas where the soil is highly conducive to agriculture, most of the local inhabitants are farmers and their staple crops include rice, maize and cotton. Rice is mainly cultivated during the rainy season in flooded soils although it is also

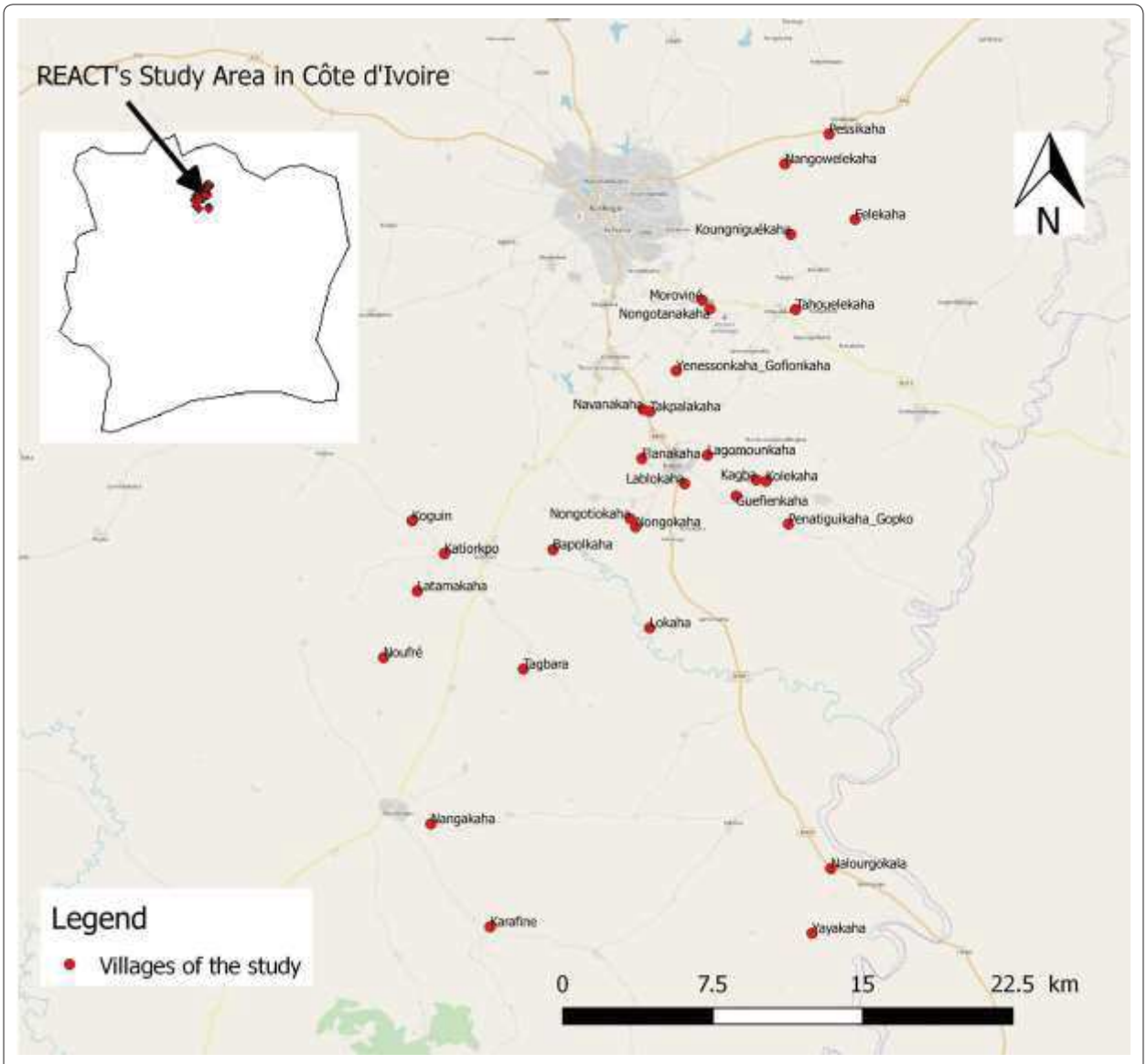

Fig. 1 Map of the study area

occasionally planted in the dry season in irrigated areas in the vicinity of dams.

Larval sampling

Two surveys were conducted from 28th October to 8th November 2016 and from 16th to 27th March 2017 during the rainy and the dry season, respectively. In each of the 30 villages, the field team was made up of one or two experienced technicians from the Institut Pierre Richet (IPR) and two well-trained villagers. Water bodies located within a 2 km radius from each village were identified and subsequently checked for the presence of mosquito larvae. Before sampling, a waiting period of 1–2 min was observed to allow mosquito larvae, if there were any, to rise to the surface. Thereafter, a 350-ml dipper was drawn along the edge of each water body and filled at the end of the stroke according to the standard dipping method [18]. To ascertain the presence or absence of mosquito larvae and to determine the mean larval density per habitat, up to 10 dips were taken at intervals, depending on the size of the water body. The mosquito larvae were morphologically identified to the genus level using reference keys [19]. A given habitat was considered positive when at least one immature *Anopheles* spp. was found. The mosquito larvae were then sorted by genus and counted, and the mean densities of larvae and pupae were recorded.

Characterization of larval habitats

All of the water bodies positive for the presence of *Anopheles* spp. larvae were georeferenced using a global positioning system (GPS) using Android tablets (Samsung Galaxy version 7.0 Plus). They were visually characterized using a questionnaire that was completed using ODK Collect software. The technicians had been trained together for three sessions to achieve uniformity in the estimations. Then, for each *Anopheles* spp. breeding site, the habitat type (i.e. rice paddy, pond, puddle, agricultural trench, dam, animal/human footprints, basin of water, cesspool, troughs attached to village pumps, irrigation canals and drains, village pumps, or edges of rivers and streams) was identified and the surface area of the breeding site was categorized into one of three groups: (i) small habitat area (< 1 m^2); (ii) medium habitat area (1–10 m^2); and (iii) large habitat area (> 10 m^2). The turbidity of the breeding habitats was classified into one of the following categories: (i) transparent; (ii) turbid, when the bottom of the dipper was still visible; or (iii) very turbid, when the bottom of the dipper was invisible. The distance to the nearest human settlement was estimated and classified into one of three groups: (i) ≤ 100 m; (ii) 101–500 m; and (iii) > 500 m. The general surroundings of each larval habitat were also described as follows: (i) high-density housing with more than 20 houses within a 50 m radius from the habitat; (ii) low-density housing with less than 20 houses within a 50 m radius from the habitat; and (iii) green areas with no houses within a 50 m radius from the habitat. The extent of exposure to sunlight was classified as either (i) sunny, when at least three-quarters of the larval habitat was exposed to sunlight; (ii) shaded, when less than one-quarter of the larval habitat was exposed to sunlight; or (iii) partly-shaded, when more than one-quarter and less than three-quarters of the larval habitat was exposed to sunlight. The crop (rice, maize, cotton, etc.) that surrounded each breeding habitat, the water movement (flowing or stagnant), the density of *Culex* sp. larvae, the density of *Aedes* sp. larvae, the presence of other insects, fish, tadpoles, solid wastes, and liquid wastes were also recorded.

Data analysis

Statistical analyses were performed using R software [20]. For each variable (habitat type, size, water turbidity, sunlight exposure, distance from houses, general surroundings, vegetation, and cohabitation with *Culex* species), we used a Chi-square test to compare the distribution of *Anopheles* spp. breeding habitats in the different categories between the rainy and the dry season. A Pearson's Chi-square test with a simulated *P*-value (based on 2000 replicates) was used when conditions did not meet Chi-square test criteria.

We used a zero-truncated negative binomial mixed effect model to analyze the density of *Anopheles* spp. larvae at breeding sites (function 'glmmadmb' from the package *glmmADMB*) [21]. The zero-truncated distribution was used as only breeding sites positive for the presence of *Anopheles* spp. larvae were recorded. The village was used as a random intercept in order to account for possible autocorrelation between breeding sites from the same buffer area. The characteristics recorded to describe the breeding sites were used as a fixed effect. We fitted a full model (with all of the characteristics as covariates) and then performed a backward elimination of the less significant covariates according to deviance analysis. Using the same approach, we analyzed the presence (using a binomial model, function 'glmer' from package '*lme4*') [22] and the density of pupae (using a negative binomial model, function 'glmmadmb').

When the number of breeding sites in a category of predictor was small, this category was pooled with another relevant category of the same predictor. Thus, dams, ponds and puddles were pooled in a common category of size-varying natural waterbodies of habitat types. Agricultural trenches, irrigation canals and drains were pooled in a single category called agriculture-made pools (other than rice paddies). Animal/human

footprints, troughs attached to pumps, and village pumps were pooled in a human-made pools category. A new categorical variable describing the presence of other animals (potential predators) living in the breeding sites was created. It was based on the record of the presence of insects, fish, tadpoles, mollusks, etc. that were converted into one of three categories: (i) absence of predators; (ii) presence of invertebrates (insects and/or mollusks); and (iii) presence of invertebrate and/or vertebrates. The categories 'turbid' and 'very turbid' for the turbidity variable were pooled.

Results

Variability of *Anopheles* spp. breeding habitats between the rainy and the dry season

Of the 808 water bodies positive for *Anopheles* spp. larvae sampled during the study period, 620 (77%) were recorded in the rainy season and 188 (23%) in the dry season (Table 1).

Anopheles spp. breeding habitats were categorized into six types during both the rainy and the dry seasons. Rice paddies (61%), followed by edges of rivers and streams (12%), were the most abundant habitats for *Anopheles* spp. larvae in the rainy season. In the dry season, rice paddies (57%) and puddles (27%) were the most abundant breeding habitats for *Anopheles* spp. larvae (Table 1). The distribution of *Anopheles* spp. breeding sites in the habitat types varied significantly between the dry and the rainy season ($\chi^2 = 12.43$, simulated $P = 5.10^{-4}$).

Out of all the *Anopheles* spp. breeding habitats sampled, 461 (74%) and 130 (69%) were small in size (< 1 m^2) during the rainy and dry season, respectively. Large habitats (> 10 m^2) accounted for 12 and 10% of the habitats sampled in the rainy and dry season, respectively. Small habitats in rice paddies were the most frequent habitats for *Anopheles* spp. larvae during both the rainy and the dry season (Table 1). Medium-sized habitats (1–10 m^2) represented 13.39 and 21.28% of the habitats sampled in the rainy and dry season, respectively. The distribution of *Anopheles* spp. breeding habitats in the three different size classes did not vary significantly between the rainy and the dry season ($\chi^2 = 2.9768$, $df = 2$, $P = 0.2257$).

An average of ~64% of the *Anopheles* spp. breeding habitats were transparent while ~36% were turbid, irrespective of the season (Table 1). There were no significant differences in the turbidity of the *Anopheles* spp. breeding habitats between the rainy and the dry season ($\chi^2 = 0.7412$, simulated $P = 0.7231$).

The majority (> 95%) of the *Anopheles* spp. breeding habitats were exposed to sunlight, irrespective of the season (Table 1). The proportion of *Anopheles* spp. breeding habitats that were exposed to sunlight was significantly higher in the dry season than in the rainy season ($\chi^2 = 5.495$, $df = 1$, $P = 0.01907$).

Anopheles spp. breeding habitats located at a distance > 500 m from houses represented 72% and 64% of the total habitats found in the rainy and the dry season, respectively. Only 4% and 3% of the *Anopheles* spp. breeding habitats were close to houses (i.e. < 100 m) in the rainy and the dry season, respectively (Table 1). There were no significant differences in the distribution of the *Anopheles* spp. breeding habitats in the three classes of distance from human houses between the rainy and the dry season ($\chi^2 = 2.8104$, $df = 2$, $P = 0.2453$).

The majority (> 90%) of the *Anopheles* spp. breeding habitats in both the rainy and the dry seasons were surrounded by green areas, with no houses within a 50 m radius (Table 1). The distribution of *Anopheles* spp. breeding habitats in the three classes of general surroundings did not vary significantly between the rainy and the dry season ($\chi^2 = 3.1011$, simulated $P = 0.2524$).

Culex spp. larvae were present in 28% and 51% of the *Anopheles* spp. breeding habitats sampled in the rainy and the dry season, respectively (Table 1). The proportion of *Anopheles* spp. breeding habitats that contained *Culex* spp. larvae was significantly higher in the dry season than the rainy season ($\chi^2 = 43.72$, $df = 1$, $P < 0.0001$).

More than 95% of the *Anopheles* spp. breeding habitats sampled were found in stagnant water, irrespective of the season. The proportion of *Anopheles* spp. breeding habitats in stagnant water did not differ significantly between the rainy and the dry season ($\chi^2 = 3.4144$, simulated $P = 0.1959$).

Factors determining the density of *Anopheles* spp. larvae

Dams, ponds and drains produced higher numbers of *Anopheles* spp. larvae than rice paddies (RR = 1.51; 95% CI: 1.18–1.94; $P = 0.0010$; Table 2). The density of *Anopheles* spp. larvae was significantly higher in habitats surrounded by low-density housing (RR = 4.81; 95% CI: 1.84–12.60; $P = 0.0014$; Table 2) and green areas (RR = 3.96; 95% CI: 1.92–8.16; $P = 0.0002$; Table 2) than habitats surrounded by high-density housing. Turbid water (RR = 1.42; 95% CI: 1.15–1.76; $P = 0.0012$; Table 3) was associated with a higher density of *Anopheles* spp. larvae (Table 2). Shaded habitats had lower densities of *Anopheles* spp. larvae than sun-exposed habitats (RR = 0.51; 95% CI: 0.31–0.86; $P = 0.0110$; Table 2).

Factors determining the presence of mosquito pupae in *Anopheles* breeding habitats

The likelihood of finding mosquito pupae in the *Anopheles* spp. breeding habitats was higher during the dry season (OR = 5.92; 95% CI: 2.11–16.63; $P = 0.0007$; Table 3) than during the rainy season. Dams, ponds and

Table 1 Characterization of *Anopheles* spp. larval habitats in the Korhogo area in the rainy and the dry seasons

Characteristics	Category	No. (%) of breeding habitats for *Anopheles* spp. mosquitoes		Mean no. of *Anopheles* spp. larvae/350 ml		Mean no. of mosquito pupae/350 ml	
		Rainy season	Dry season	Rainy season	Dry season	Rainy season	Dry season
Habitat type	Dam	0 (0)	15 (7.98)	–	13.87	–	0
	Agricultural trench	2 (0.32)	0 (0)	7.50	0	2.50	0
	Basin of water	1 (0.16)	0 (0)	0	0	0	0
	Cesspool	1 (0.16)	0 (0)	0	0	1.00	0
	Edges of rivers and streams	76 (12.26)	4 (2.13)	7.09	3.25	0.18	0
	Animal/human footprints	49 (7.90)	9 (4.79)	7.00	3.67	0.18	0
	Irrigation canals and drains	47 (7.58)	3 (1.60)	11.15	17.67	0.26	0
	Pond	8 (1.29)	0 (0)	19.63	0	0	0
	Puddle	51 (8.23)	50 (26.60)	11.75	12.26	0.47	0.20
	Rice paddy	380 (61.29)	107 (56.91)	7.67	8.40	0.41	0.26
	Troughs attached to village pumps	1 (0.16)	0 (0)	2.00	0	0	0
	Village pumps	4 (0.65)	0 (0)	6.75	0	0.25	0
	Total	620 (100)	188 (100)	8.00	10.00	0	0
Size (m^2)	< 1	461 (74.35)	130 (69.15)	8.57	8.53	0.42	0.20
	1–10	83 (13.39)	40 (21.28)	8.31	12.90	0.07	0.05
	> 10	76 (12.26)	18 (9.57)	6.37	10.78	0.29	0.56
Water turbidity	Transparent	397 (64.03)	118 (62.77)	6.51	9.15	0.10	0.22
	Turbid	215 (34.68)	69 (36.70)	11.27	10.58	0.85	0.17
	Very turbid	8 (1.29)	1 (0.53)	14.75	9.00	0	0
Distance from houses	< 100 m	26 (4.19)	6 (3.19)	8.46	1.67	1.23	0
	100–500 m	148 (23.87)	61 (32.45)	9.96	7.54	0.99	0.21
	> 500 m	446 (71.94)	121 (64.36)	7.70	11.15	0.09	0.21
Sunlight exposure	Sunny	593 (95.65)	188 (100)	8.45	9.68	0.35	0.20
	Shaded	27 (4.35)	0 (0)	4.19	0	0.44	0.00
	Partly shaded	0 (0)	0 (0)	–	–	–	–
General surroundings	High-density housing	17 (2.74)	2 (1.06)	4.76	0.50	1.41	0
	Low-density housing	10 (1.61)	12 (6.38)	24.80	3.17	0.80	0.17
	Green areas	593 (95.65)	174 (92.55)	8.00	10.23	0	0.21
Culex spp. larvae	Present	172 (27.74)	96 (51.06)	7.60	8.05	0.90	0.26
	Absent	448 (72.26)	92 (48.94)	8.52	11.37	0.15	0.14
Aedes spp. larvae	Present	0 (0)	5 (2.66)	–	9.8	–	0
	Absent	620 (100)	183 (97.34)	8.27	9.67	0.35	0.21
Other insects	Present	421 (67.90)	152 (80.85)	8.02	10.97	0.17	0.19
	Absent	199 (32.10)	36 (19.15)	8.79	4.19	0.74	0.25
Fish	Present	34 (5.48)	1 (0.53)	8.85	12.00	0.47	0
	Absent	586 (94.52)	187 (99.47)	8.23	9.66	0.35	0.20
Tadpoles	Present	32 (5.16)	16 (8.51)	10.16	11.31	0.44	0
	Absent	588 (94.84)	172 (91.49)	8.16	9.52	0.35	0.22
Crop	Rice	380 (61.29)	107 (56.91)	7.67	8.40	0.41	0.26
	Vegetable gardens	95 (15.32)	52 (27.66)	10.63	13.92	0.20	0.15
	Other	80 (12.90)	586 (15.43)	12.00	8.00	0.32	0.32
Water movement	Flowing	26 (4.19)	3 (1.59)	8.81	3.33	1.27	0
	Stagnant	594 (95.81)	185 (98.40)	8.24	9.78	0.31	0.21
Solid waste	Absent	460 (74.19)	21 (11.17)	8.84	10.81	0.46	0.48
	Present	160 (25.81)	167 (88.83)	6.63	9.53	0.06	0.17
Liquid waste	Absent	593 (95.65)	155 (82.45)	8.32	10.61	0.34	0.21
	Present	27 (4.35)	33 (17.55)	7.22	5.30	0.63	0.18

Table 1 (continued)

Characteristics	Category	No. (%) of breeding habitats for *Anopheles* spp. mosquitoes		Mean no. of *Anopheles* spp. larvae/350 ml		Mean no. of mosquito pupae/350 ml	
		Rainy season	Dry season	Rainy season	Dry season	Rainy season	Dry season
Vegetation	Absent	21 (3.38)	11 (5.85)	10.00	3.55	0.38	0.09
	Present	599 (96.61)	177 (94.15)	8.21	10.06	0.35	0.21

Table 2 Multiple regression analysis for factors determining the density of *Anopheles* spp. larvae

Factor	Levels	Rate ratio	95% CI	*P*-value
Habitat type	Rice paddies	1		0.4815
	Irrigation canals and drains	1.17	0.81–1.69	0.4088
	Dams, ponds and puddles	1.51	1.18–1.94	0.0010***
	Edges of rivers and streams	1.02	0.74–1.42	0.8935
	Animal/human footprints	1.43	0.93–2.19	0.1059
	Others	1.47	0.70–3.10	0.3068
General surroundings	High-density housing	1		
	Low-density housing	4.81	1.84–12.60	0.0014**
	Green areas	3.96	1.92–8.16	0.0002***
Water turbidity	Transparent	1		
	Turbid	1.42	1.15–1.76	0.0012**
Sunlight	Sunny	1		
	Shaded	0.51	0.31–0.86	0.0110*

*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$

Table 3 Multiple regression analysis for factors determining the presence of mosquito pupae

Factor	Levels	Odds ratio	95% CI	*P*-value
Season	Rainy season	1		
	Dry season	5.92	2.11–16.63	0.0007***
Habitat type	Rice paddies	1		
	Irrigation canals and drains	1.43	0.35–5.82	0.6151
	Dams, ponds and puddles	0.25	0.08–0.77	0.0155*
	Edges of rivers and streams	0.24	0.05–1.17	0.0775
	Animal/human footprints	0.05	0–1.29	0.0704
	Others	0.22	0.01–4.77	0.3376
General surroundings	High-density housing	1		
	Low-density housing	0.31	0.01–7.58	0.4715
	Green area	0.03	0–0.70	0.0296*
Distance from human houses	100–500 m	1		
	< 100 m	0.28	0.02–3.80	0.3406
	> 500 m	0.25	0.10–0.66	0.0050**
Sunlight	Sunny	1		
	Shaded	0.10	0.01–1.18	0.0671

*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$

Abbreviation: CI, confidence interval

drains were less likely to contain mosquito pupae than rice paddies (OR = 0.25; 95% CI: 0.08–0.77; $P = 0.0155$; Table 3). *Anopheles* spp. habitats located at a distance > 500 m from houses were less likely to contain mosquito pupae than habitats located at a distance of 100–500 m (OR = 0.25; 95% CI: 0.10–0.66; $P = 0.0050$; Table 3). The likelihood of finding mosquito pupae was lower in *Anopheles* spp. habitats surrounded by green areas than habitats surrounded by high-density housing (OR = 0.03; 95% CI: 0.00–0.70; $P = 0.0296$; Table 3).

Discussion

As expected, more *Anopheles* spp. breeding habitats were identified in the rainy season than in the dry season. However, mosquito pupae were more likely to be present in *Anopheles* spp. breeding habitats during the dry season than the rainy season. The temperature in Korhogo, which is generally higher during the dry season than in the rainy season, may explain our finding. This higher temperature in the dry season may lead to a shorter larval development time which may reduce the risk of predation [23]. Furthermore, our result may indicate that habitats are more stable in the dry season than the rainy season as a previous study has shown a positive relationship between habitat stability and pupal productivity [24]. It is well known that *Anopheles* spp. breeding habitats are readily flushed out during the rainy season although their numbers and size increase during this period [23]. By contrast, there are fewer larval breeding habitats in the dry season but they are more stable and larval survivorship increases as a result of several factors such as food availability [25]. LSM is also highly effective in the dry season since there are less *Anopheles* spp. breeding habitats to treat, enhancing the feasibility of such strategy [23].

More than 90% of *Anopheles* spp. breeding habitats were surrounded by green areas and the density of *Anopheles* spp. larvae was significantly higher in habitats surrounded by low-density housing and green areas compared to habitats surrounded by high-density housing. Dams, ponds and puddles were more productive of *Anopheles* spp. larvae than rice paddies. One can hypothesize that the oviposition behavior may be different in each type of habitat. Indeed, rice paddies have numerous small pools that are also in close proximity to each other, thus allowing partial oviposition in contrast with dams, ponds and puddles [24]. We found that the latter were, nonetheless, less likely to harbor mosquito pupae than rice paddies. A previous study showed that pupal productivity decreased with increasing larval density [26]. In light of this negative correlation, our results support the hypothesis of higher mortality rate of *Anopheles* spp. larvae in dams, ponds and puddles than in rice paddies. Therefore, rice paddies could be more likely to produce adult malaria vectors than dams, ponds and puddles.

A particularly important result of the present study is the key role of rice paddies in the production of *Anopheles* spp. larvae in the Korhogo area, as they covered a very large surface area (for example, rice paddies amounted to an area of more than 150 ha within a 2 km radius from Nalourgokaha). In a previous study, *Anopheles* spp. larvae were found in more than 60% of the total surface area of rice paddies [27]. In the Korhogo district, rice paddies are generally located at a considerable distance from houses. Numerous studies have shown that female mosquitoes oviposit in habitats in the vicinity of houses for energy conservation purposes [28]. However, unlike in urban areas, gravid vectors have been reported to have a long flight range in rural areas [27]. Furthermore, the density of malaria vectors was very high in the study area [13] and hence the numerous breeding habitats located far away from houses are likely to be the reason for this. This raises the question of where transmission occurs. Indeed, humans are highly mobile, and they spend quite long periods (i.e. several days) in rice-growing areas during the rainy season, allowing malaria transmission at night within the rice-growing areas. Sociological data must complement the ecological data and entomological sampling (both at the larval and adult stages) in order to better understand the spatio-temporal dynamics of malaria transmission in such areas. The entire data set of the REACT project will allow for such an integrated approach in the mid-term future.

In this study, we described the characteristics of *Anopheles* spp. breeding habitats and a striking finding was that over 95% of the sampled *Anopheles* spp. breeding habitats were exposed to sunlight in both seasons. Habitats that are exposed to sunlight are known to be more appropriate for *An. gambiae* (*s.l.*) larvae [29], although the larvae sampled in this study were not identified down to the species level. Adult collection from the same REACT's project run as a baseline study of malaria transmission confirmed that *Anopheles gambiae* (*s.s.*) was by far the most predominant mosquito species in the Korhogo area, regardless of the season [30]. Unfortunately, this ecological preference, i.e. sunlight exposure, has been shown to negatively impact the efficacy of *Bti* in the field [31]. Indeed, toxins are sensitive to light. Strategies that address this issue will assist with development of the *Bti*-based larvicide strategy for the control of malaria transmission. Ecological studies of immature stages are urgently needed to provide solutions to bypass this issue. For example, treatments carried out in the evening coupled with a frequency adjusted to the recolonization period may help achieve a better immediate performance

[31]. The ecological knowledge must be complemented by technological improvements to develop new formulations that result in longer resistance to exposure to sunlight.

We acknowledge a number of methodological limitations of this study. Indeed, despite a concerted effort to be as thorough as possible, we are nonetheless bound to have missed some *Anopheles* spp. breeding habitats. Moreover, due to the numerous water bodies encountered during the rainy season coupled with the large area inspected (a 2 km radius) around each village, only habitats positive for *Anopheles* spp. larvae were described. Therefore, factors associated with the presence/absence of *Anopheles* spp. larvae were not investigated. Consequently, the results must be interpreted with caution.

To further decipher the environmental determinants of malaria vector larval ecology, additional studies that include (i) identification of malaria vector larvae and pupae at the species level; (ii) comparison with human landing catches; and (iii) even phylogenetic studies are needed to better understand the link between larval ecological data and epidemiologically relevant adult vectors. Finally, year-round surveys are needed to obtain more details on the dynamics of *Anopheles* spp. breeding habitats and their productivity in the Korhogo area.

In terms of the ecological data presented in this study, the large surface area of the *Anopheles* spp. breeding habitats in the rainy season has led us to conclude that the period ranging from the end of the rainy season to the dry season is the most appropriate for achieving a cost-effective impact of *Bti*-based larviciding in the Korhogo area. This is consistent with the WHO position on larviciding, which states that LSM is more effective when breeding habitats are limited [8].

Conclusions

Rice paddies represented the most frequent habitat types for *Anopheles* spp. larvae in the Korhogo area during both the rainy and the dry seasons. *Anopheles* spp. breeding habitats covered large areas during the rainy season, impeding an efficient larviciding activity, whereas they were fewer in number in the dry season. Consequently, we decided to restrict all of the *Bti*-based larviciding efforts to the period ranging from the end of the rainy season to the dry season in this expansive rice-growing area near Korhogo in northern Côte d'Ivoire.

Abbreviations

LLINs: Long-lasting insecticide nets; *Bti*: *Bacillus thuringiensis israeliensis*; IRS: Indoor residual spraying; ITN: Insecticide treated nets; WHO: World Health Organization; IVM: Integrated Vector Management; LSM: Larval source management; RCT: Randomized controlled trial; IPR: Institut Pierre Richet.

Acknowledgements

We thank Koné Aboubacar, Dosso Youssouf and Coulibaly Issa for their technical assistance.

Funding

This work was part of the REACT project, funded by the French Initiative 5% - Expertise France (No. 15SANIN213).

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. The datasets used are available at the Institut Pierre Richet in Bouaké, Côte d'Ivoire and will be made available upon request.

Authors' contributions

BZ, AAK, LBM, NM and CP conceived and designed the study. BZ oversaw the surveys. NM, CP, AD and BZ analyzed the data. BZ wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

Author details

[1] Institut Pierre Richet (IPR), Bouaké, Côte d'Ivoire. [2] MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France. [3] Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey Calavi, Abomey-Calavi, Benin. [4] CEMV, Université Alassane Ouattara, Bouaké, Côte d'Ivoire. [5] Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo Dioulasso, Burkina Faso.

Received: 13 November 2018 Accepted: 20 March 2019
Published online: 27 March 2019

References

1. Walker K, Lynch M. Contribution of *Anopheles* larvae control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. Med Vet Entomol. 2007;21:2–21.
2. Smith DL, McKenzie FE, Snow RW, Hay SI. Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control. PLoS Biol. 2007;5:e42.
3. WHO. World malaria report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
4. World Health Organization. WHO position statement on integrated vector management. Wkly Epidemiol Rec. 2008;83:177–81.
5. Tusting LS, Thwing J, Sinclair D, Fillinger U, Gimnig J, Bonner KE. Mosquito larval source management for controlling malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2013;8:CD008923.
6. Kitron U, Spielman A. Suppression of transmission of malaria through source reduction: antianopheline measures applied in Israel, the United States, and Italy. Rev Infect Dis. 1989;11:391–406.
7. Killeen GF, Fillinger U, Kiche I, Gouagna LC, Knols BGJ. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: Lessons for malaria control in Africa? Lancet Infect Dis. 2002;2:618–27.
8. WHO. Interim position statement: the role of larviciding for malaria control in sub-Saharan Africa. World Health Organization Global Malaria Programme. Geneva: WHO Press; 2012.

9. Fillinger U, Kannady K, William G, Vanek MJ, Dongus S, Nyika D, et al. 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.
10. Geissbühler Y, Kannady K, Chaki PP, Emidi B, Govella NJ, Mayagaya V, et al. Microbial larvicide application by a large-scale, community-based program reduces malaria infection prevalence in urban Dar Es Salaam, Tanzania. PLoS One. 2009;4:e5107.
11. Gu W, Utzinger J, Novak RJ. Habitat-based larval interventions: a new perspective for malaria control. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:2–6.
12. Killeen GF, Tanner M, Mukabana WR, Kalongolela MS, Kannady K, Lindsay SW, et al. Habitat targeting for controlling aquatic stages of malaria vectors in Africa. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:517–8.
13. Briët OJT, Dossou-Yovo J, Akodo E, van de Giesen N, Teuscher TM. The relationship between *Anopheles gambiae* density and rice cultivation in the savannah zone and forest zone of Côte d'Ivoire. Trop Med Int Health. 2003;8:439–48.
14. Ijumba JN, Lindsay SW. Impact of irrigation on malaria in Africa: Paddies paradox. Med Vet Entomol. 2001;15:1–11.
15. Carnevale P, Robert V. Les anophèles: biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. Marseille: IRD Éditions: Didactiques; 2009.
16. Fillinger U, Sonye G, Killeen GF, Knols BGJ, Becker N. The practical importance of permanent and semipermanent habitats for controlling aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu lato* mosquitoes: operational observations from a rural town in western Kenya. Trop Med Int Heal. 2004;9:1274–89.
17. Cecchi P. L'eau en partage. Marseille: IRD Éditions Latitudes 23; 2007.
18. WHO. Entomological field techniques for malaria control. Geneva: World Health Organization; 1992.
19. Gillies MT. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). Publ South African Inst Med Res. 1987;55:1–139.
20. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2018.
21. Skaug H, Fournier D, Bolker B, Magnusson A, Nielsen A. Generalized linear mixed models using AD Model Builder. R package version 0.8.3.3.
22. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using. J Stat Softw. 2014. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01.
23. Kweka EJ, Zhou G, Munga S, Lee M-C, Atieli HE, Nyindo M, et al. Anopheline larval habitats seasonality and species distribution: a prerequisite for effective targeted larval habitats control programmes. PLoS One. 2012;7:e52084.
24. Mutuku FM, Bayoh MN, Gimnig JE, Vulule JM, Kamau L, Walker ED, et al. Pupal habitat productivity of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a rural village in western Kenya. Am J Trop Med Hygiene. 2006;74:54–61.
25. Kweka EJ, Munga S, Himeidan Y, Githeko AK, Yan G. Assessment of mosquito larval productivity among different land use types for targeted malaria vector control in the western Kenya highlands. Parasit Vectors. 2015;8:356.
26. Gimnig AJE, Ombok M, Otieno S, Michael G, Vulule JM, Gimnig JE, et al. Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. J Med Entomol. 2002;39:162–72.
27. Majambere S, Fillinger U, Sayer DR, Green C, Lindsay SW. Spatial distribution of mosquito larvae and the potential for targeted larval control in the Gambia. Am J Trop Med Hyg. 2008;79:19–27.
28. Minakawa N, Seda P, Yan G. Influence of host and larval habitat distribution on the abundance of African malaria vectors in western Kenya. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:32–8.
29. Minakawa N, Mutero CM, Githure JI, Beier JC, Yan G. Spatial distribution and habitat characterization of anopheline mosquito larvae in western Kenya. Am J Trop Med Hyg. 1999;61:1010–6.
30. Zogo B, Tchiekoi B, Kouadio D, Camara S, Dahounto A, Moiroux N, et al. Dynamics of malaria transmission, prevalence infections and prevalence of malaria cases in Korhogo area, northern Côte d'Ivoire. In: 7th MIM Pan-African Malar Conf Dakar, Senegal, April 15–20; 2018.
31. Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F. Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. J Am Mosq Control Assoc. 1992;8:285–9.

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Chapitre 6. Impact des combinaisons d'interventions (MILDA+ IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL) sur la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo

6.1 Introduction

La lutte antivectorielle est une composante majeure de la lutte contre le paludisme en Afrique sub-saharienne. Elle vise à réduire l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* en agissant sur au moins un des paramètres de la capacité vectorielle que sont la densité des vecteurs, le contact homme-vecteur, la longévité des vecteurs et leur compétence vectorielle (Duvallet *et al*. 2017). Les MILDA, l'outil principal de lutte antivectorielle en Afrique sub-saharienne, ont l'avantage exceptionnel de réduire la densité des vecteurs, le contact homme-vecteur et la longévité des vecteurs. Ainsi, elles ont permis de diminuer drastiquement le poids du paludisme entre 2000 et 2015 (Bhatt *et al*. 2015a). Cependant, les progrès ont ralenti ces dernières années, et ce malgré l'augmentation continue de la couverture en MILDA (WHO 2018a). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'emploi massif des pyréthrinoïdes, la seule famille d'insecticide sur les MILDA jusqu'en 2017, a favorisé la diffusion de plusieurs mécanismes de résistance dans les populations vectrices (Hemingway *et al*. 2016). Mais, la faible utilisation des MILDA qui limite le niveau de protection communautaire pourrait aussi contribuer à cette tendance (Olapeju *et al*. 2018). Face à ces défis, l'OMS préconise la lutte antivectorielle dans un concept de gestion vectorielle intégrée qui se définit comme « un processus rationnel de prise de décisions pour l'utilisation optimale des moyens de lutte antivectorielle » (WHO 2011b). Pour cela, divers outils de lutte sont combinés pour augmenter leur efficacité, rapport coût-efficacité et la durabilité de leur impact.

A l'heure actuelle, l'IEC fait partie de l'arsenal de lutte utilisé contre le paludisme en Côte d'Ivoire mais sa mise en œuvre connaît des insuffisances. Les pulvérisations intradomiciliaires (PID) et la lutte anti-larvaire basée sur l'utilisation des larvicides biologiques n'ont, quant à elles, pas encore été déployées dans le pays mais sont inscrites dans le plan stratégique national de lutte contre le paludisme pour la période de 2014 à 2017 (PNLP 2014). A travers un essai contrôlé randomisé dans 28 villages du district sanitaire de Korhogo, Nord de la Côte d'Ivoire, nous avons pour objectif principal de mesurer l'impact additionnel de la stratégie renforcée de l'IEC, du pirimiphos-méthyl en PID et de la lutte anti-larvaire à base de *Bti* sur la transmission des *Plasmodium spp.* Pour cela, après la collecte des données de base, nous avons déployé les

différentes stratégies puis mené quatre enquêtes entomologiques pour comparer l'efficacité des combinaisons à l'utilisation de MILDA seules. Les paramètres mesurés étaient la densité des vecteurs, l'infectivité des vecteurs et le taux d'inoculation entomologique considéré comme un proxy de l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp*.

6.2 Résultats

Les résultats du contrôle de la qualité de chacune des trois stratégies complémentaires évaluées (IEC, PID et LAL) et de leur impact additionnel sur les paramètres entomologiques du paludisme à Korhogo sont les suivants :

6.2.1 Contrôle de la qualité de la stratégie renforcée IEC

Dans les villages du bras MILDA + IEC, le pourcentage moyen de personnes ayant déclaré avoir dormi sous une MILDA la nuit précédente a été de 94,91% (95% IC : 94,52-95,27) pendant toute la période de sensibilisation. Chez les enfants de 0 à 5 ans, il était de 95,36% (94,48-96,11).

6.2.2 Contrôle de la qualité des pulvérisations intradomiciliaires

Les résultats des analyses chimiques ont montré que la concentration moyenne de pirimiphos-méthyl était respectivement de 1215 mg/m^2 (95% IC : 666–1764) et de 1348 mg/m² (95% IC : 799–1897) sur les papiers filtres classiques (pas de côté plastifié) et les papiers plastifiés posés sur les murs en ciment traités. En ce qui concerne les murs en banco traités, la concentration moyenne de pirimiphos-méthyl était respectivement de 1024 mg/m² (95% IC : 475–1573) et de 1036 mg/m² (95% IC : 487–1585) sur les papiers filtres classiques et les papiers plastifiés (Figure 17). La concentration de pirimiphos-méthyl n'a pas varié significativement entre les deux types de papiers posés sur un même support ni entre les deux supports (test de Tukey, P = 0,96).

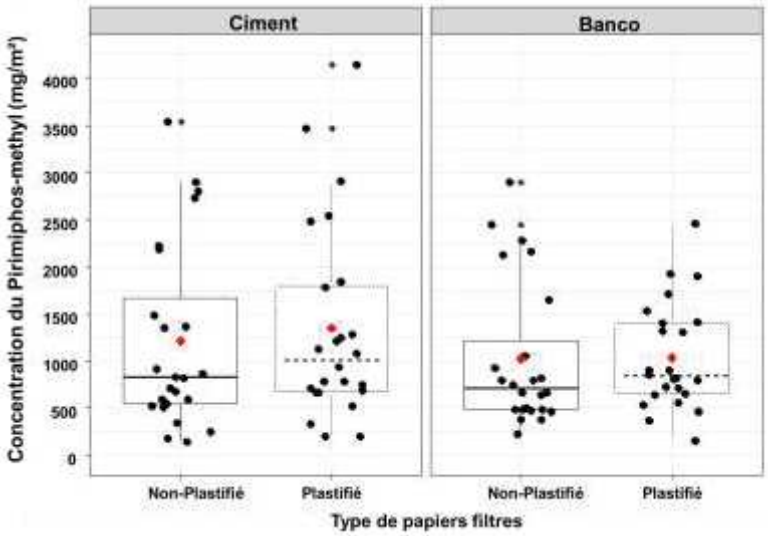

Figure 17 : Concentration de pirimiphos-méthyl (médianes avec intervalle de confiance 95% ; moyennes en rouge) sur les papiers filtres posés sur les murs en ciment et en terre de barre.

6.2.3 Contrôle de la qualité des traitements anti-larvaires

Le taux de mortalité des larves de la population locale d'*Anopheles gambiae s.l.* exposées à l'eau de gîtes des villages traités au *Bti* a été en moyenne de 92,64% (95% IC : 87,03–98,25) durant toute la période de traitement.

6.2.4 Impact des combinaisons sur la densité des vecteurs

Le tableau 3 présente la densité des vecteurs (*An. gambiae s.l.*, groupe *An. funestus* et *An. nili s.l.*) en fonction des traitements et des enquêtes. Ce paramètre a été comparé entre les bras de combinaisons de stratégies et le bras témoin après ajustement sur les données collectées durant la période de pré-intervention.

Au total, 6721 vecteurs ont été capturés au cours des quatre enquêtes entomologiques post-intervention dans les 28 villages.

Au cours de la première enquête post-intervention (en moyenne 8 semaines après le démarrage de l'IEC et 3 semaines après la mise en place de la PID), la densité agressive dans les bras MILDA + IEC et MILDA + PID n'a pas été significativement différente de celle observée dans le bras MILDA seules (Rapport de cote (RC) [IC 95%] = 1,23 [0,66-2,30], P=0,521 pour MILDA + IEC et RC [IC 95%] = 0,67 [0,35-1,30], P=0,237 pour MILDA + PID). Cette enquête a été menée avant le démarrage de la stratégie de lutte anti-larvaire.

Au cours de la deuxième enquête (en moyenne 8 semaines après la mise en place de la PID), la densité agressive a été significativement réduite de 71% dans le bras MILDA + PID (RC [IC 95%] = 0,29 [0,13-0,62], P=0,002) par rapport au bras MILDA seules. Par contre, la densité agressive dans les bras MILDA + IEC et MILDA + LAL n'a pas été significativement différente de celle observée dans le bras MILDA seules ((RC [IC 95%] = 0,54 [0,29-1,01], P=0,053 pour MILDA + IEC et RC [IC 95%] = 0,64 [0,34-1,20], P= 0,164 pour MILDA + LAL) au cours de cette enquête qui a été menée en moyenne 13 semaines après le démarrage de l'IEC et 3 semaines en moyenne après le démarrage de la stratégie anti-larvaire.

Au cours de la troisième enquête c'est-à-dire en moyenne 16 semaines après la mise en place de la PID et respectivement 21 semaines et 11 semaines après le démarrage de l'IEC et la LAL, la densité agressive a été significativement réduite de 69% dans le bras MILDA + IEC (RC [IC 95%] = 0,31 [0,12-0,77], P=0,012), de 69% dans le bras MILDA + PID (RC [IC 95%] = 0,31 [0,10-1,00], P=0,049) et de 95% dans le bras MILDA + LAL (RC [IC 95%] = 0,05 [0,01-0,39], P=0,004) par rapport au bras MILDA seules.

Au cours de la quatrième enquête (en moyenne 24 semaines après la mise en place de la PID et respectivement 29 semaines et 19 semaines après le démarrage de l'IEC et la LAL), nous n'avons mis en évidence aucune différence significative dans la densité des vecteurs entre les bras de combinaisons et le bras MILDA seules (RC [IC 95%] = 1,76 [0,93-3,34], P=0,085 pour MILDA + IEC, RC [IC 95%] = 2,01 [1,00-4,05], P=0,051 pour MILDA + PID et RC [IC 95%] = 0,95 [0,49-1,85], P=0,884 pour MILDA + LAL).

Pour les quatre enquêtes combinées, la densité des vecteurs dans les bras MILDA + IEC et MILDA + PID n'a pas été significativement différente de celle observée dans le bras MILDA seules (RC [IC 95%] = 1,00 [0,41-2,44], P=0,999 pour MILDA + IEC et RC [IC 95%] = 0,55 [0,21-1,41], P=0,212 pour MILDA + PID). De même, en combinant les trois enquêtes qui ont été menées après le démarrage de la LAL, la densité des vecteurs dans le bras MILDA + LAL n'a pas été significativement différente de celle observée dans le bras MILDA seules (RC [IC 95%] = 0,28 [0,07-1,15], P=0,077) (voir tableau 3).

Tableau 3 : Densité agressive des vecteurs en fonction des bras au cours des quatre enquêtes post-interventions

	N	moyenne (SD)	Rapport de cote (IC95%)	P
Enquête post-intervention 1 (Oct-Nov 2017)				
MILDA seules (témoin)	2435	38,05 (35,32)	1	-
MILDA + IEC	1550	32,29 (28,85)	1,23 (0,66-2,30)	0,521
MILDA + PID	849	17,69 (16,31)	0,67 (0,35-1,30)	0,237
MILDA + LAL	-	-	-	-
Enquête post-intervention 2 (Nov-Déc 2017)				
MILDA seules (témoin)	396	6,19 (7,98)	1	-
MILDA + IEC	125	2,60 (4,62)	0,54 (0,29-1,01)	0,053
MILDA + PID	49	1,02 (1,78)	0,29 (0,13-0,62)	***0,002***
MILDA + LAL	96	1,50 (2,22)	0,64 (0,34-1,20)	0,164
Enquête post-intervention 3 (Jan 2018)				
MILDA seules (témoin)	62	0,97 (2,73)	1	-
MILDA + IEC	11	0,23 (0,69)	0,31 (0,12-0,77)	***0,012***
MILDA + PID	9	0,19 (0,45)	0,31 (0,10-1,00)	***0,049***
MILDA + LAL	1	0,02 (0,13)	0,05 (0,01-0,39)	***0,004***
Enquête post-intervention 4 (Mars-Avr 2018)				
MILDA seules (témoin)	308	4,81 (5,27)	1	-
MILDA + IEC	277	5,77 (7,28)	1,76 (0,93-3,34)	0,085
MILDA + PID	398	8,29 (14,99)	2,01 (1,00-4,05)	0,051
MILDA + LAL	155	2,42 (5,13)	0,95 (0,49-1,85)	0,884
Enquêtes post-intervention 1 à 4				
MILDA seules (témoin)	3201	12,50 (23,55)	1	-
MILDA + IEC	1963	10,22 (19,76)	1,00 (0,41-2,44)	0,999
MILDA + PID	1305	6,80 (13,09)	0,55 (0,21-1,41)	0,212
Enquêtes post-intervention 2 à 4				
MILDA seules (témoin)	766	3,99 (6,13)	1	-
MILDA + LAL	252	1,31 (3,36)	0,28 (0,07-1,15)	0,077

La densité des vecteurs a été comparée entre les bras de combinaisons de stratégies et le bras témoin après ajustement sur les moyennes obtenues pendant la période de pré-intervention.

6.2.5 Impact des combinaisons sur l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique (TIE)

Le tableau 4 présente l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique en fonction des traitements et des enquêtes. Le taux d'inoculation entomologique a été comparé entre les bras de combinaisons de stratégies (MILDA + IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL) et le bras témoin (MILDA seules) après ajustement sur les densités des vecteurs obtenues pendant la période de pré-intervention.

Pour les quatre enquêtes combinées, l'indice sporozoïtique a été réduit de 84% dans le bras MILDA + IEC par rapport au bras MILDA seules (RC [IC 95%] =0,16 [0,05-0,51], P=0,002). Par contre, l'indice sporozoïtique a été comparable entre les bras MILDA + PID et MILDA seules (RC [IC 95%] = 0,62 [0,30-1,28], P=0,198). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les bras MILDA + LAL et le bras MILDA seules pour cet indicateur en combinant les 3 enquêtes qui ont été menées après la mise en place de la stratégie anti-larvaire (RC [IC 95%] = 0,41 [0,05-3,22], P=0,394).

Pour les quatre enquêtes combinées, le taux d'inoculation entomologique (TIE) a été réduit de 86% dans le bras MILDA + IEC (RC [IC 95%] = 0,14 [0,05-0,38], P <0.0001) et 61% dans le bras MILDA + PID (RC [IC 95%] = 0,39 [0,18-0,83], P=0,015 pour MILDA + PID) par rapport au bras MILDA seules. En combinant les 3 enquêtes qui ont été menées après la mise en place de la stratégie anti-larvaire, nous avons noté une réduction de 88% du TIE dans le bras MILDA + LAL par rapport au bras MILDA seules (RC [IC 95%] = 0,12 [0,02-0,77], P=0,024).

Tableau 4 : L'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique en fonction des bras.

	Indice sporozoïtique			Tau
	% (IC95%)	Rapport de cote (IC95%)	P	Moyenne (SD)
Enquêtes post-intervention 1 à 4				
MILDA seules (témoin)	2,41 (1,70-3,40)	1	-	0,51 (0,82)
MILDA + IEC	0,39 (0,13-1,13)	0,16 (0,05-0,51)	***0,002***	0,08 (0,12)
MILDA + PID	1,56 (0,87-2,77)	0,62 (0,30-1,28)	0,198	0,18 (0,27)
Enquêtes post-intervention 2 à 4				
MILDA seules (témoin)	1,53 (0,86-2,73)	1	-	0,10 (0,15)
MILDA + LAL	0,50 (0,03-2,79)	0,41 (0,05-3,22)	0,394	0,02 (0,02)

Le taux d'inoculation entomologique a été comparé entre les bras de combinaisons de stratégies et le bras témoin après ajustement sur la densité m
pré-intervention. L'indice sporozoïtique n'a pas été ajusté sur la période de pré-intervention.

6.3. Conclusion

Nos résultats ont montré que la combinaison de MILDA avec une stratégie renforcée de l'IEC a réduit la densité des vecteurs après 5 mois de sensibilisation des populations, l'infectivité des vecteurs et le taux d'inoculation entomologique par rapport aux MILDA seules. La combinaison de MILDA avec le pirimiphos-méthyl en PID a réduit la densité des vecteurs 2 mois et 4 mois après les pulvérisations et le taux d'inoculation entomologique par rapport aux MILDA seules. La combinaison de MILDA avec la LAL à base de *Bti* pendant une période allant de la saison pluvieuse à la saison sèche a réduit la densité des vecteurs 3 mois après le démarrage de la LAL et le taux d'inoculation entomologique par rapport aux MILDA seules. Ces résultats démontrent que les combinaisons MILDA + IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL ont un impact significatif sur les paramètres entomologiques du paludisme dont notamment l'intensité de la transmission dans une zone de haute couverture (>90%) en MILDA et de résistance aux pyréthrinoïdes, comparativement aux MILDA seules.

Chapitre 7. Discussion

La présente thèse s'est déroulée dans le cadre d'un vaste projet dont l'objectif principal est d'investiguer si les combinaisons MILDA + IEC, MILDA + PID, MILDA + LAL et MILDA + ivermectine offrent une protection supplémentaire contre la transmission des *Plasmodium spp.*et la survenue du paludisme, comparativement aux MILDA seules. Ce projet a été exécuté dans les districts sanitaires de Korhogo (Nord de la Côte d'Ivoire) et de Diébougou (Sud-Ouest du Burkina-Faso). Dans le cadre du présent travail, nous avons pour objectif principal d'étudier l'impact des combinaisons MILDA + IEC, MILDA + PID et MILDA + LAL sur la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo, comparativement à l'utilisation seule de MILDA. Pour ce faire, nous avons d'abord évalué en conditions semi-naturelles une nouvelle formulation potentielle pour étudier la possibilité de l'utiliser pour le bras MILDA + LAL (chapitre 3). Nous avons ensuite décrit le profil entomologique de la zone d'étude (chapitre 4) puis identifié et caractérisé les gîtes larvaires dans la zone (chapitre 5) dans l'objectif de collecter les données de base pour l'essai. Enfin, nous avons déployé les interventions et évalué l'efficacité des combinaisons (MILDA + IEC, MILDA + PID, MILDA + LAL) en termes de réduction de la densité des vecteurs, de l'infectivité et du TIE (proxy de l'intensité de la transmission) comparées aux MILDA seules. Nous avons obtenu les principaux résultats suivants :

1- La nouvelle formulation larvicide évaluée en conditions semi-naturelles a montré une efficacité comparable à celles des formulations recommandées par l'OMS.

2- L'intensité de la transmission est très élevée à Korhogo.

3- Les rizières constituent les principaux gîtes d'*Anopheles spp.* dans la zone d'étude.

4- La combinaison MILDA + IEC a réduit la densité des vecteurs après 5 mois de sensibilisation des populations, l'infectivité des vecteurs et l'intensité de la transmission par rapport aux MILDA seules

5- La combinaison MILDA + PID a réduit la densité des vecteurs 2 mois et 4 mois après les pulvérisations et l'intensité de la transmission par rapport aux MILDA seules.

6- La combinaison MILDA + LAL a réduit la densité des vecteurs 3 mois après le démarrage de la LAL et l'intensité de la transmission par rapport aux MILDA seules.

7.1 Limites de l'efficacité des biolarvicides (*Bti* et *Bs*) contre les larves d'*Anopheles gambiae s.s.* en conditions semi-naturelles

Les résultats des deux expérimentations sur le BTBSWAX en conditions semi-naturelles ont mis en évidence deux facteurs majeurs qui limitent l'efficacité des biolarvicides contre les larves d'*An. gambiae s.s.*.

7.1.1 Facteurs biologiques

Nos résultats ont montré que la durée d'efficacité de la nouvelle formulation BTBSWAX à base de *Bti* et *Bs* contre *An. gambiae s.s.* n'excédait pas 10 jours, même dans les plots couverts. La durée d'efficacité d'une formulation similaire contre *Cx. quinquefasciatus* au laboratoire a cependant été de plus de 5 semaines (Schorkopf *et al*. 2016). En plus des différences de conditions d'expérimentation (laboratoire *versus* semi-naturelles) à considérer, la faible rémanence obtenue dans notre étude pourrait s'expliquer par le fait que les larves du genre *Anopheles* sont généralement moins sensibles aux biolarvicides que les larves du genre *Culex.* Ceci peut être lié à une différence du nombre et du type de récepteurs spécifiques entre les deux genres (Becker and Margalit 1993). Dans le cas de *Bti* par exemple, la toxine se fixe sur les récepteurs avec une affinité moins forte chez les *Anopheles spp.* que chez les *Culex spp.* (Becker and Margalit 1993).

Un autre paramètre important est que les jeunes larves d'anophèles sont plus sensibles aux larvicides que les plus vielles (Charles and Nielsen-LeRoux 2000). Il a été montré que les larves de stade II sont 1,5 à 5 fois plus sensibles au *Bti* que les larves de stade IV (Nayar *et al*. 1999). Dans la présente étude, nous avons observé que le BTBSWAX a tendance à être plus efficace contre les larves de stade I que les larves du stade II. Sachant que les larves sont généralement de différents stades dans les gîtes larvaires naturels, une telle différence de sensibilité entre les stades larvaires pourrait être prise en compte dans les programmes de lutte basés sur l'utilisation de *Bti* et *Bs*. Il faudra donc veiller alors à choisir des fréquences et/ou des doses plus élevées permettant de tuer les jeunes et les vieilles larves (Mulla *et al*. 1995). Une autre solution serait d'utiliser un mélange de larvicides et de films de surface (Bukhari *et al*. 2013). Les larvicides et les films de surface sont complémentaires car les films de surface, contrairement aux larvicides, sont plus efficaces contre les vieilles larves. Les films de surface tuent les larves et les nymphes en réduisant la tension à la surface de l'eau (Bukhari *et al*. 2013). Le mélange des

deux a montré une efficacité supérieure que chaque outil de lutte utilisé seul. Cependant, des recherches supplémentaires sur l'efficacité et le rapport coût/efficacité de ces alternatives sont nécessaires avant leur mise en œuvre.

7.1.2 Facteurs environnementaux

Les biolarvicides sont photolabiles, c'est-à-dire qu'ils sont dégradés par les rayons du soleil (Lacey 2007). La préférence des anophèles pour les gîtes ensoleillés constitue donc une limite supplémentaire pour l'efficacité de ces insecticides (Gillies and de Meillon 1968). Dans notre étude, l'exposition au soleil a réduit l'efficacité résiduelle de BTBSWAX contre les larves d'anophèles de stade I d'au moins 6 jours. Cette réduction pourrait s'expliquer par l'effet des rayonnements gamma et des rayons ultraviolets (UV) dont notamment les composants UV-A (320–400 nm) et UV-B (280–320 nm) sur la viabilité des spores du *Bti* et *Bs*. Dans une étude antérieure, l'exposition au rayonnement solaire a diminué l'efficacité du *Bs* de 30% (Rojas *et al*. 2001). Il a cependant été montré que l'effet de l'exposition solaire sur l'efficacité des biolarvicides sur le terrain peut être réduit par la pollution de l'eau (Hougard *et al*. 1985). Cette variable joue probablement un rôle marginal dans la lutte contre les larves d'anophèles car celles-ci se développent préférentiellement dans des gîtes peu pollués (Gillies and de Meillon 1968). Il est donc urgent de développer des formulations de biolarvicides permettant de protéger les spores contre les effets de l'exposition solaire. Des adjuvants tels que les agents de blanchiment fluorescents, le rouge Congo, l'acide folique, la levure ont été testés mais ils semblent affecter le développement des bactéries et la germination des spores. De plus, ils sont instables sur le terrain (Zhang *et al*. 2016).

7.2 Défis de la lutte antivectorielle au Nord de la Côte d'Ivoire

Les données entomologiques collectées avant le déploiement des stratégies de lutte nous ont permis d'identifier cinq défis majeurs de la lutte antivectorielle à Korhogo, Nord de la Côte d'Ivoire.

7.2.1 Multiplicité d'espèces vectrices

Les quatre enquêtes entomologiques menées pour collecter les données de base dans la zone de Korhogo ont révélé qu'*An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii* sont de loin les principaux vecteurs de *P. falciparum* à Korhogo, quelle que soit la saison. Nos résultats corroborent ceux des études

antérieures menées dans le Nord de la Côte d'Ivoire (Doannio *et al*. 2002; Briet *et al*. 2003). En plus de ces vecteurs, nous avons noté la présence de 5 autres espèces ou complexes/groupes d'espèces de moustiques du genre *Anopheles* : le groupe *An. funestus*, le complexe *An. nili s.l.*, *An. pharoensis, An. ziemanni* et *An. coustani.*

Le groupe *An. funestus* et le complexe *An. nili* ont représenté moins de 10% des anophèles vecteurs collectés mais l'indice sporozoïtique chez ces vecteurs n'a pas été significativement différent de celui observé chez les vecteurs majeurs (*An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii*). Ceci pourrait signifier qu'*An. nili s.l.* et le groupe *An. funestus* ont une anthropophilie et/ou une longévité comparables à celles d'*An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii* (Gillies and de Meillon 1968; Antonio-Nkondjio *et al*. 2006). Ainsi, ces espèces pourraient jouer un rôle plus important dans la transmission si les espèces principales (*An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii*) ont pu être contrôlées ou éliminées.

Aucun spécimen d'*An. pharoensis, An. ziemanni* et *An. coustani* n'a été trouvé positif à *P. falciparum.* La densité de l'ensemble de ces espèces par rapport au total a été très faible (<0,5%) pendant les quatre enquêtes. Cependant, la littérature montre que ces espèces sont impliquées dans la transmission des *Plasmodium spp.* dans de nombreux pays ou sont suspectées de l'être (Carrara *et al*. 1990; Antonio-Nkondjio *et al*. 2006; Kamau *et al*. 2006; Nepomichene *et al*. 2015). Des recherches plus approfondies sur leur rôle dans la transmission des *Plasmodium spp.* à Korhogo seront nécessaires pour mettre en œuvre un programme de lutte antivectorielle qui visera l'élimination du paludisme dans la zone. Il convient de noter qu'en plus de ces 5 groupes taxonomiques, les investigations antérieures avaient rapporté la présence de deux autres espèces du genre *Anopheles* : *An. wellcomei* et *An. squamosus* (Doannio *et al*. 2002). Ces espèces mériteraient également une attention.

7.2.2 Comportements de piqûre des vecteurs

Nos résultats ont montré que les anophèles vecteurs (*An. gambiae s.l.*, *An. nili s.l.* et le groupe *An. funestus*) sont de préférence exophages au cours des deux saisons (sèche et pluvieuse), avec un taux d'exophagie moyen de 54%. Quant aux pics d'activité de piqûre des vecteurs, ils ont été observés au milieu de la nuit (entre 1 et 4 heures) en Novembre-Décembre, Janvier-Février et Avril-Mai. En Septembre-Octobre, nous avons observé un pic d'activité de piqûre plus tardif (entre 4 à 5 heures). L'importance de ces comportements dans la transmission des *Plasmodium*

spp. n'a pu être quantifiée dans ce travail car nous n'avons pas collecté de données sur les comportements des populations villageoises au cours de ces quatre enquêtes. Toutefois, des moustiques ont été capturés à l'intérieur et à l'extérieur à toutes les heures de 17h à 9h, suggérant alors que dans cette zone, les MILDA ne sont pas capables de protéger entièrement les populations locales contre les piqûres d'anophèles. Pour mieux définir les stratégies de lutte antivectorielle complémentaires aux MILDA, il serait important de mesurer l'effet des comportements des vecteurs sur l'exposition des populations locales aux piqûres et sur l'efficacité des MILDA (Moiroux *et al*. 2014). Dans le district sanitaire de Diebougou au Burkina-Faso, l'autre site de l'essai, l'exposition des populations aux piqûres d'anophèles a été mesurée (voir Annexe 3). Les résultats ont montré que l'utilisation des MILDA dans cette zone procure un niveau de protection très élevé (>80%) contre la piqûre des vecteurs (*An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii* et *An. funestus s.s.*). De plus, ils ont révélé que la grande majorité des piqûres (>80%) se passent à l'intérieur chez les utilisateurs de MILDA. Ainsi, ces résultats soutiennent non seulement l'utilisation des MILDA comme outil de base de LAV mais aussi suggèrent que les stratégies complémentaires déployées à l'intérieur (la PID par exemple) sont à prioriser pour lutter efficacement contre le paludisme dans le district sanitaire de Diébougou.

7.2.3 Forte intensité de la transmission

Nos résultats ont montré que l'intensité de la transmission de *P. falciparum* a été très élevée à Korhogo, particulièrement en saison pluvieuse. Elle a varié considérablement en fonction des saisons et des enquêtes : 9,04 piqûres infectantes/homme/nuit (pi/h/n) en Septembre-Octobre 2016 (saison pluvieuse) ; 0,63 pi/h/n en Novembre-Décembre 2016 (saison sèche); 0,06 pi/h/n en Février-Mars 2017 (saison sèche) et 0,12 pi/h/n en Avril-Mai 2017 (saison pluvieuse). Ces différences de l'intensité de la transmission sont dues aux variations saisonnières très prononcées de la densité d'*An. gambiae s.l.* Ceci s'explique par le fait qu'*An. gambiae s.s.,* l'espèce majoritaire du complexe *An. gambiae* à Korhogo, colonise préférentiellement les gîtes larvaires temporaires qui sont généralement très nombreux et très productifs en saison pluvieuse mais disparaissent quasiment en saison sèche (Diabaté *et al*. 2005).

Nous avons estimé à 897,9 le taux d'inoculation entomologique annuel moyen dans la zone. L'intensité de la transmission pourrait être sous-estimée car seule l'infection à *P. falciparum* a été recherchée chez les vecteurs. Or, la lecture des gouttes épaisses réalisées au cours des

enquêtes épidémiologiques a révélé la présence de deux autres espèces de *Plasmodium* à Korhogo : *P.ovale* et *P.malariae* (Tchiekoi *et al.* En préparation).

En Afrique, les valeurs du TIE annuel varient en moyenne entre <1 à >1000 piqûres infectantes par homme et suivent généralement un gradient décroissant des zones rurales aux zones urbaines (Beier *et al*. 1999). Eu égard au TIE moyen observé, le district sanitaire de Korhogo, en zone rurale, figure donc parmi les zones d'Afrique où l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* est extrêmement élevée. Nos résultats obtenus pendant les enquêtes pré-intervention ont été confirmés par les données parasitologiques qui ont révélé une prévalence de l'infection à *Plasmodium spp.* supérieure à 80% chez les sujets âgés de 6 mois à 21 ans, quelle que soit la saison. En Septembre-Octobre, la prévalence de l'infection a été de 100% (N observations = 692), indiquant un niveau de transmission extrêmement élevé pendant cette période (Tchiekoi *et al*. En préparation). Ces résultats montrent que la lutte antivectorielle doit être améliorée à Korhogo afin de diminuer le poids de la maladie.

7.2.4 Les mécanismes de résistance aux insecticides

Nos résultats ont montré la présence de la mutation *kdr* L1014F à des fréquences très élevées (56 à 100%) dans les populations d'*An. gambiae s.l.* à Korhogo. La mutation *ace-1* présentait des fréquences faibles à modérées (0 à 30%) chez les mêmes populations. Ces résultats sont en accord avec les investigations menées dans le nord du pays (Koffi *et al*. 2013; Camara *et al*. 2018b). D'autres mécanismes de résistance aux insecticides présents chez les anophèles vecteurs en Côte d'Ivoire n'ont pas été recherchés dans ce travail. Parmi eux, les mécanismes de résistance métabolique qui ont été détectés dans les populations d'*An. gambiae s.l.* à Korhogo dans des études antérieures pourraient jouer un rôle important dans la résistance phénotypique (Koffi *et al*. 2013; Camara *et al*. 2018b). Mais les mutations *kdr* L1014S et N1575Y n'ont pas, à notre connaissance, été recherchées dans cette population alors qu'elles sont présentes dans le pays (Chouaïbou *et al*. 2017; Edi *et al*. 2017). Il serait intéressant d'investiguer la présence et la fréquence de ces mutations dans les échantillons de vecteurs collectés dans ce travail puisqu'ils ont été tous conservés au laboratoire de l'IPR. De plus, sachant que les pressions de sélection des mécanismes de résistance chez les vecteurs proviennent de l'agriculture et de la santé publique (Chouaïbou *et al*. 2016), une collaboration entre les acteurs des deux secteurs est capitale pour élaborer un plan efficace de gestion de la

résistance des vecteurs aux insecticides au Nord de la Côte d'Ivoire et plus généralement dans tout le pays.

7.2.5 Les rizières

Nos résultats ont indiqué que les rizières constituent les gîtes larvaires d'anophèles les plus abondants et les plus productifs dans la zone de Korhogo. Elles couvrent des dizaines d'hectares par village et sont à l'origine des densités d'anophèles très importantes. En effet, les rizières offrent des conditions optimales pour le développement des larves d'anophèles (Carnevale *et al*. 1999; Ijumba and Lindsay 2001). En fonction des zones et des phases de développement du riz, plusieurs espèces d'anophèles peuvent s'y développer. Les principales espèces rapportées sont : *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus s.s.* et *An. pharoensis*. Les plus fortes densités d'*An. gambiae s.l.* sont généralement observées juste après le repiquage des jeunes pousses de riz car l'eau est alors peu profonde et bien ensoleillée.

Toutefois, selon plusieurs auteurs, l'augmentation massive des densités anophéliennes causée par les rizières n'entraîne pas systématiquement une augmentation de l'intensité de la transmission ou de la prévalence de l'infection (Dossou-yovo *et al*. 1994; Faye *et al*. 1995; Dossou-Yoyo *et al*. 1998; Henry *et al*. 2003; Dolo *et al*. 2004; Keiser *et al*. 2005; Koudou *et al*. 2005). Ceci peut s'expliquer par le fait que la proportion de moustiques jeunes donc non épidémiologiquement dangereux serait élevée dans les zones rizicoles. De plus, l'augmentation de la densité des vecteurs génère une nuisance qui entraîne généralement l'utilisation accrue de moyens de protection comme les moustiquaires imprégnées (Thomson *et al*. 1996; Pulford *et al*. 2011; Chinwe *et al*. 2018).

Dans la zone de Korhogo, l'accès aux moustiquaires et leur taux d'utilisation sont très faibles. Selon les données de recensement collectées en 2016, la proportion moyenne des ménages possédant au moins une moustiquaire pour 2 personnes était de 24%. Les données épidémiologiques ont également montré que le taux d'utilisation des MILDA était de 21% en saison pluvieuse (Septembre-Octobre 2016) et de 18% en saison sèche (février-mars 2017) chez les enfants âgés de 6 mois à 21 ans (Tchiekoi *et al*. En préparation). Ces faibles taux d'accès et d'utilisation de MILDA pourraient alors expliquer les niveaux élevés de l'intensité de la transmission et de la prévalence de l'infection observés dans la zone. Les comportements de

piqûre des vecteurs décrits précédemment pourraient aussi contribuer à maintenir un niveau de transmission élevé à Korhogo.

Puisqu'il n'est pas envisageable de déplacer les populations loin des rizières, les propositions pour réduire le risque de la transmission des *Plasmodium spp*. dans cette zone rizicole pourraient être : 1) une optimisation de l'utilisation des MILDA pour se protéger contre les piqûres des anophèles ; 2) une stratégie pour tuer les vecteurs adultes ; 3) une lutte anti-larvaire visant à traiter les rizières à l'aide de larvicides. Malheureusement l'efficacité et le rapport coût/efficacité de ces stratégies complémentaires restent à montrer. Ce travail adresse la question de l'efficacité additionnelle des stratégies. Des études supplémentaires sur le rapport coût/efficacité de ces stratégies seront aussi utiles pour guider le choix de la stratégie complémentaire à déployer.

7.3 Bénéfices et limites des combinaisons évaluées

7.3.1 La combinaison MILDA + IEC

Nos résultats ont montré que dans le district sanitaire de Korhogo où les vecteurs sont résistants aux pyréthrinoïdes, la combinaison de MILDA (couverture >90%) avec une stratégie renforcée d'IEC a réduit de 6 fois la transmission des *Plasmodium spp.* par rapport aux MILDA seules. Ces résultats démontrent que l'efficacité opérationnelle des MILDA pourrait être maximisée par le renforcement de la stratégie d'IEC, même dans une zone de résistance aux pyréthrinoïdes. L'impact de l'IEC sur l'utilisation des MILDA par les populations est bien établi et confirmé dans notre étude (De La Cruz *et al*. 2006; Deribew *et al*. 2012). Mais, à notre connaissance, cet essai est le premier à évaluer et démontrer l'impact du renforcement de la stratégie IEC sur les indicateurs entomologiques du paludisme.

L'utilisation de MILDA est d'abord un moyen de protection individuelle qui réduit le contact homme-vecteur grâce à la barrière physique que constituent les moustiquaires. Cette protection est généralement quantifiée en analysant conjointement les données sur les comportements des populations vectrices et humaines (Killeen *et al*. 2006; Moiroux *et al*. 2014). Selon une revue récente, la protection personnelle qu'offre une moustiquaire contre les piqûres des vecteurs varie de 50% à plus de 80% dans les études qui l'ont mesurée en Afrique (Monroe *et al*. 2019). A Diebougou, par exemple, elle a varié entre 78% et 88% en fonction de la saison et de l'âge

de l'individu (voir Annexe 3). En général, les plus faibles valeurs de protection sont obtenues avec des vecteurs hautement exophages comme *An. arabiensis*. A Korhogo, *An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii* sont les principaux vecteurs des *Plasmodium spp.* (Zogo *et al*. 2019b). Bien que nous n'ayons pas mesuré dans ce travail la protection individuelle qu'offre les MILDA dans notre zone d'étude, il est fort probable qu'elle soit importante. Ceci pourrait être un des facteurs qui ont contribué à l'efficacité additionnelle de la stratégie renforcée de l'IEC à Korhogo.

La sensibilisation des populations à l'utilisation correcte et régulière des MILDA pendant 5 mois a entraîné une réduction de la densité agressive des vecteurs de 69%, comparativement au témoin (MILDA seules). Nos résultats montrent que l'augmentation de l'utilisation des MILDA par une stratégie renforcée de l'IEC dans une zone de résistance aux pyréthrinoïdes peut être associée à une réduction importante de la densité agressive des vecteurs. De plus, la combinaison MILDA + IEC a réduit de 6 fois l'infectivité des vecteurs par rapport aux MILDA seules. Nous pouvons émettre 3 hypothèses pour expliquer ces réductions : 1) la diminution de la longévité des vecteurs due à l'effet létal des MILDA qui diminuerait et rajeunirait la population vectrice ; 2) le fait que l'effet létal des MILDA pourrait être plus important contre les vieux moustiques c'est-à-dire ceux qui peuvent porter les formes infectieuses (sporozoïtes) du parasite que contre les plus jeunes (Saddler and Koella 2015) ; 3) l'utilisation importante des MILDA par les populations aurait entrainé une augmentation de la zoophagie chez les vecteurs (Lefèvre *et al*. 2009). La diminution de la longévité des vecteurs et l'augmentation de la zoophagie pourraient être respectueusement confirmées par les déterminations de la parturité et de l'origine des repas de sang. Nous ne les avons pas mesurés dans le présent travail, mais il apparaît nécessaire de les mesurer lors de prochaines études traitant de l'efficacité des méthodes de LAV.

Récemment, des moustiquaires bi-imprégnées de pyréthrinoïde et d'un autre ingrédient qui est soit un nouvel insecticide (chlorfenapyr), soit un régulateur de croissance (pyriproxyfen), soit un synergiste (butoxyde de pipéronyle ou PBO) ont renforcé l'arsenal d'outils de lutte antivectorielle contre le paludisme (WHOPES 2017). Ces moustiquaires ont toutes montré une meilleure efficacité que les moustiquaires conventionnelles (pyréthrinoïdes seules) en conditions semi-naturelles ou réelles de terrain (Camara *et al*. 2018a; Protopopoff *et al*. 2018; Tiono *et al*. 2018). Les résultats fort intéressants obtenus dans ce travail avec des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes laissent penser que le renforcement de la stratégie d'IEC devra

être envisagé par les programmes nationaux pour optimiser l'impact de ces moustiquaires bi-imprégnées sur le terrain.

Toutefois, il convient de noter que l'analyse de l'impact additionnel de la stratégie IEC sur les paramètres épidémiologiques est nécessaire pour mieux apprécier le bénéfice de la combinaison MILDA + IEC. De plus, nous avons mesuré l'efficacité additionnelle de la stratégie renforcée d'IEC avec des moustiquaires relativement neuves (< 1 an après distribution) dans cet essai. En Ethiopie, il a été montré que l'impact de la stratégie de l'IEC sur l'utilisation des MILDA est réduit si les moustiquaires sont usées (trop vieilles, trop trouées) (Batisso *et al*. 2012). Aussi, l'impact additionnel de l'IEC pourrait diminuer dans le temps à cause de plusieurs facteurs qui limitent l'efficacité des MILDA sur le terrain. Ces facteurs sont notamment l'usure des moustiquaires, la diminution de la concentration de l'insecticide sur la moustiquaire et l'augmentation de l'intensité de la résistance aux pyréthrinoïdes (Ochomo *et al*. 2013; Randriamaherijaona *et al*. 2015; Glunt *et al*. 2018). Ils pourraient d'ailleurs expliquer pourquoi l'impact additionnel sur la densité n'a pas été observé au cours de la quatrième enquête qui correspond à environ 10 mois après la distribution des moustiquaires Permanet 2.0.

Bien que le besoin de renforcer la stratégie d'IEC pour augmenter l'utilisation des MILDA existe dans la plupart des pays de l'Afrique sub-saharienne, son importance peut varier d'un pays à un autre ou entre des zones d'un même pays. Au Nigéria par exemple, le pourcentage de personnes ayant accès à une MILDA et qui l'utilisent était seulement de 64% au Sud contre 89% au Nord (Kilian *et al*. 2013). De telles différences méritent d'être considérées pour axer les efforts et les ressources dans les zones où le besoin est plus important. A part la sensibilisation des populations, un autre déterminant important de l'utilisation des MILDA par les populations est l'accès. Deux facteurs principaux expliquent un faible taux d'accès aux MILDA dans le contexte actuel de distributions gratuites : une distribution inégale des MILDA entre les foyers et un taux rapide de perte des MILDA (Bhatt *et al*. 2015b). Il a été estimé qu'en Afrique en 2013, 21% des moustiquaires distribuées se trouvent en surplus dans des ménages. De plus, la moitié des MILDA distribuées ne se retrouvent plus dans les ménages seulement 23 mois après la distribution (Bhatt *et al*. 2015b). Ces données montrent qu'il est urgent non seulement de renforcer les stratégies de l'IEC mais aussi d'améliorer les systèmes de distribution afin d'augmenter l'utilisation et donc l'efficacité opérationnelle des MILDA.

7.3.2 La combinaison MILDA + PID

Nos résultats ont montré que dans le district sanitaire de Korhogo, une zone de résistance aux pyréthrinoïdes, la combinaison de MILDA (couverture >90%) avec le pirimiphos-méthyl en PID a réduit de 5 fois l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* par rapport aux MILDA seules. Ce résultat est intéressant dans la mesure où il fournit des preuves supplémentaires de l'efficacité de la combinaison des deux principaux outils de lutte antivectorielle utilisés contre le paludisme dans le monde.

Nous avons noté respectivement une réduction de la densité des vecteurs de 71% et 69% dans le bras MILDA + PID en moyenne 2 et 4 mois après la mise en place de la PID, par rapport aux MILDA seules. Nos résultats s'expliquent par l'effet létal du pirimiphos-méthyl sur les vecteurs. On peut supposer qu'une réduction plus importante de la densité et de l'intensité de la transmission aurait pu être obtenue si les pulvérisations avaient été faites en début de la saison pluvieuse. En effet, pour des raisons logistiques, nous avons mis en place la PID vers la fin de la saison pluvieuse (Octobre 2017). Or, l'impact additionnel de la PID sur la transmission est maximisé s'il est maintenu sur plusieurs générations de vecteurs donc idéalement pendant une durée qui inclut le pic de la saison pluvieuse durant lequel les moustiques se multiplient exponentiellement (Hamainza *et al*. 2016).

D'autres essais ont montré un bénéfice à combiner les MILDA à la PID dans la réduction de l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* En Tanzanie, la combinaison de MILDA avec le bendiocarb en PID a réduit significativement de 6 fois la transmission de *P. falciparum* par rapport aux MILDA seules (Protopopoff *et al*. 2015). Une autre étude récente menée en Tanzanie a montré que la combinaison de MILDA avec le pirimiphos-méthyl en PID a réduit de 4 fois la transmission de *P. falciparum* par rapport aux MILDA seules (Protopopoff *et al*. 2018). Plus récemment en Ethiopie, la combinaison de MILDA avec le propoxur en PID a été associée à une réduction de la densité des vecteurs par rapport aux MILDA seules. Dans cette zone de faible endémicité, le taux d'inoculation entomologique n'a pas pu être estimé car aucun des vecteurs collectés ne portait l'antigène Circum Sporozoite Protein (CSP) dans les glandes salivaires (Kenea *et al*. 2019). Les résultats de ces études ajoutés à ceux présentés dans ce travail prouvent que la combinaison MILDA + PID est une stratégie efficace pour réduire l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* dans plusieurs contextes d'Afrique sub-saharienne.

Dans le but de maintenir l'efficacité de la PID et pour répondre au besoin pressant de nouvelles formulations avec de nouveaux modes d'actions, deux formulations SumiShield™ 50WG et Fludora Fusion™ WP-SB ont été développées et respectivement préqualifiées en 2017 et 2018 par le Système d'évaluation des pesticides de l'Organisation mondiale de la santé (WHO 2018b, 2018c). Ces deux formulations contiennent de la clothianidine qui est un nouvel insecticide utilisant un nouveau mode d'action, ce qui pourrait limiter les phénomènes de résistance croisée avec les insecticides existants. De plus, l'évaluation des deux formulations en cases expérimentales a montré une bonne efficacité résiduelle (>8 mois) (Ngufor *et al*. 2017; Agossa *et al*. 2018; Ngwej *et al*. 2019).

Cependant, l'arsenal réel d'insecticides utilisables pour la PID en Afrique sub-saharienne demeure très limité à cause du développement des vecteurs aux insecticides et de la rareté des nouveaux insecticides. De plus, tous les nouveaux insecticides préqualifiés par l'OMS pour la lutte antivectorielle proviennent de l'agriculture, ce qui augmente le risque de développement de la résistance chez les vecteurs. Récemment, une investigation faite sur la sensibilité des vecteurs à la clothianidine dans 16 pays d'Afrique en 2016-2017 a révélé une suspicion de résistance dans au moins une zone de 5 pays (Mali, Sénégal, Ouganda, Ghana et Zambie) (Oxborough *et al*. 2019). En Côte d'Ivoire, les tests réalisés en 2018 sur la population de M'bé (au centre du pays) ont montré une résistance élevée à la clothianidine avec un rapport de résistance de 126 par rapport à la souche sensible Kisumu (Ahoua Alou *et al*. En préparation). Ces résultats montrent qu'il y a un besoin urgent de développer d'autres insecticides avec de nouveaux modes d'action et de préférence non utilisés en agriculture pour maintenir l'efficacité de la PID face à la menace croissante que représente la résistance multiple des vecteurs aux insecticides.

Dans ce travail, nous n'avons mesuré l'impact de la combinaison MILDA + PID que sur les indicateurs entomologiques. Le bénéfice de cette combinaison reste donc à être confirmé par les résultats épidémiologiques. De plus, il convient de noter que certaines études menées de manière rigoureuse dans certains contextes n'ont pas montré de bénéfice à utiliser cette combinaison pour réduire les indicateurs entomologiques et/ou épidémiologiques du paludisme (Corbel *et al*. 2012; Pinder *et al*. 2015; Loha *et al*. 2019). L'analyse globale du projet REACT qui s'est déroulé dans deux contextes entomologiques et épidémiologiques différents nous permettra d'éclaircir davantage la question du bénéfice de cette combinaison.

Enfin, si on considère les données sur l'exposition des populations humaines aux piqûres des vecteurs en Afrique sub-saharienne, il est évident que la transmission des *Plasmodium spp.* continuerait même avec une couverture complète de MILDA et de PID (Monroe *et al*. 2019). Ceci s'explique par le fait que les moustiquaires ciblent uniquement les vecteurs endophages et nocturnes et la PID, les vecteurs endophiles. Par conséquent, les vecteurs exophages/exophiles et zoophages qui ne sont pas atteints par les MILDA et la PID, pourraient maintenir la transmission dans la population humaine. L'importance de cette transmission résiduelle est d'autant plus préoccupante qu'elle peut augmenter quand le niveau de la couverture de MILDA et de la PID augmente (Fornadel *et al*. 2010; Moiroux *et al*. 2012; Ojuka *et al*. 2015). Selon de récentes estimations, la proportion de transmission à l'extérieur des habitations a considérablement augmenté entre 2003 et 2018 en Afrique (Sherrard-Smith *et al*. 2019). Il y a donc un besoin réel et urgent d'évaluer et de déployer des stratégies efficaces dirigées contre les vecteurs responsables de la transmission résiduelle.

7.3.3 La combinaison MILDA + LAL

Nos résultats ont montré que dans le district sanitaire de Korhogo, la combinaison de MILDA avec la lutte anti-larvaire à base de *Bti* déployée de la fin de la saison pluvieuse à la saison sèche a réduit de 5 fois l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* par rapport aux MILDA seules. Le choix de la période d'intervention s'est justifié par le fait que les principaux gîtes larvaires de la zone d'étude (les rizières) s'étendent sur plusieurs hectares et sont inondables pendant la saison pluvieuse. Cet essai constitue le premier, à notre connaissance, qui ait montré que la combinaison MILDA + LAL peut permettre de réduire la transmission des *Plasmodium spp.* en Afrique sub-saharienne, comparativement aux MILDA seules.

La combinaison MILDA + LAL a réduit de 95% la densité des vecteurs 11 semaines après le démarrage des traitements des gîtes larvaires, par rapport aux MILDA seules. Pendant cette enquête, un seul anophèle a été collecté dans l'ensemble des 8 villages traités. Ce résultat démontre que la majorité des gîtes larvaires ont été identifiés et traités. Dans ce travail, nous avons utilisé un logiciel de Système d' Information Géographique (SIG), « Google Earth » pour identifier les bas-fonds mais les villageois ont aussi facilité l'identification des surfaces à traiter. L'implication active des villageois a déjà été montrée dans d'autres études comme capitale pour obtenir une bonne efficacité de la stratégie anti-larvaire sur le terrain (Fillinger and Lindsay 2006; Mukabana *et al*. 2006).

Le déploiement de la stratégie anti-larvaire à base du *Bti* pendant la période allant de la fin de la saison pluvieuse à la saison sèche dans une zone de forte intensité de la transmission telle que Korhogo présente deux avantages principaux. Premièrement, il permet de diminuer le niveau de la transmission qui reste élevé pendant cette période, comparativement à celui observé en saison pluvieuse dans certaines zones endémiques d'Afrique sub-saharienne. Par exemple, nos résultats indiquent que l'intensité de la transmission (TIE) à Korhogo est de 0,63 piqûre infectante/homme/nuit au début de la saison sèche (novembre–décembre 2016) (Zogo *et al*. 2019b). Ce niveau de transmission est supérieur à celui observé à Diébougou (0,375 p/h/n) en saison pluvieuse (juin 2017) (Soma *et al*. 2019). Deuxièmement, la probabilité que la stratégie anti-larvaire à base du *Bti* sélectionne des mécanismes de résistance physiologique et comportementale est très faible. Elle devrait alors être privilégiée dans les zones et les saisons où son implémentation est possible (Killeen *et al*. 2002; Tusting *et al*. 2013).

Pour réduire le coût de la stratégie anti-larvaire, l'utilisation d'une formulation avec une plus longue rémanence que celles actuellement disponibles (<10 jours) serait recommandée. Récemment, Afrane *et al* ont montré que la rémanence d'une nouvelle formulation nommée FourStar™ excède 2 mois dans des gîtes naturels au Kenya (Afrane *et al*. 2016). Dans le contexte de la présente étude, une telle formulation pourrait être appropriée et efficace parce que les traitements ont été effectués durant une période pendant laquelle les principaux gîtes sont permanents et semi-permanents.

Cependant, la faisabilité et l'efficacité de la stratégie anti-larvaire dépendent aussi de facteurs autres que la rémanence de la formulation larvicide. Dans le présent travail, il n'a pas été possible de traiter les gîtes larvaires pendant la saison pluvieuse car les principaux gîtes étaient inondables et dynamiques. Dans ces conditions, la stratégie anti-larvaire ne pourrait pas être déployée efficacement, même en utilisant une formulation avec une longue rémanence. De plus, les gîtes larvaires (les rizières) s'étendaient sur une très large surface, pouvant aller jusqu'à plus de 100 ha (Zogo *et al*. 2019a). En général, la surface des gîtes larvaires à traiter est disproportionnellement élevée par rapport à la densité de la population humaine à protéger dans les zones rurales d'Afrique. Ceci a poussé plusieurs auteurs à affirmer que la stratégie anti-larvaire est plus adaptée aux zones urbaines dans lesquelles il y a généralement une forte densité humaine et moins de surfaces de gîtes à traiter (Najera 2002; Singer *et al*. 2004). Toutefois, l'efficacité additionnelle de la stratégie anti-larvaire en zones rurales d'Afrique sub-saharienne,

dépend en grande partie du contexte local. Une étude de type « avant-après » menée dans une zone rurale du Kenya a montré que la combinaison des moustiquaires imprégnées avec la stratégie anti-larvaire réduit de 73% l'intensité de la transmission, comparativement aux moustiquaires imprégnées seules. Dans cette zone, les traitements ont été effectués pendant les deux saisons (sèche et pluvieuse) et les auteurs ont rapporté un bon rapport coût efficacité de la stratégie. Notons que les principaux gîtes larvaires étaient des puits cimentés, des empreintes d'animaux et des drains(Fillinger and Lindsay 2006; Fillinger *et al*. 2009). Par contre, dans une zone rurale en Gambie où les populations utilisent des moustiquaires imprégnées, un essai n'a pas mis en évidence un bénéfice à déployer la stratégie anti-larvaire pour réduire l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* Dans cette zone, les traitements ont également été effectués pendant les deux saisons et les principaux gîtes larvaires étaient des plaines inondables et des rizières (Majambere *et al*. 2010). Dans le présent travail, nous avons montré que la stratégie anti-larvaire peut constituer une stratégie complémentaire efficace pour réduire l'intensité de la transmission des *Plasmodium spp.* pendant une période allant de la fin de la saison pluvieuse à la saison sèche dans une zone rizicole où les gîtes sont très étendus et dynamiques en saison pluvieuse.

7.4 Les limites de l'étude

Une limite de ce travail est que l'impact additionnel des stratégies complémentaires PID et IEC a été mesuré respectivement sur une durée de 6 mois et de 7 mois. Une phase de suivi d'un an serait davantage pertinente pour mieux apprécier l'efficacité additionnelle des stratégies dans cette zone où la transmission des *Plasmodium spp.* est pérenne. En ce qui concerne la stratégie PID, les tests de rémanence du pirimiphos-méthyl sur les murs ont été invalidés à cause d'une forte mortalité dans les témoins (parpings non traités). Ceci pourrait être probablement dû aux conditions environnementales qui étaient peu favorables aux tests. Toutefois, les résultats des analyses chimiques des papiers filtres posés sur les murs avant les pulvérisations ont montré que la dose cible était presque atteinte avec un rapport dose moyenne appliquée/dose ciblée qui varie entre 0,5 et 1,9. De plus, les résultats des tests de rémanence à Diébougou (l'autre site du projet) ont montré que l'efficacité du pirimiphos-méthyl sur les murs en ciment et banco a duré plus de 8 mois contre la souche sensible Kisumu d'*An. gambiae s.s.*. Rappelons que ce sont les mêmes opérateurs qui ont traité les murs à Korhogo et à Diébougou et que les types de murs sont comparables entre ces deux sites.

7.5 Stratégies complémentaires potentielles pour une lutte antivectorielle plus efficace dans l'avenir

Dans ce travail, nous avons montré que la stratégie renforcée d'IEC, la PID et la LAL sont des stratégies complémentaires qui ont le potentiel de réduire l'intensité de la transmission au Nord de la Côte d'Ivoire où les vecteurs sont résistants aux pyréthrinoïdes. Toutefois, les limites de ces stratégies que nous avons soulevées suggèrent fortement que d'autres outils seront nécessaires pour maintenir l'efficacité de la lutte antivectorielle dans l'avenir et éliminer le paludisme en Afrique sub-saharienne. A l'heure actuelle, de nombreux outils de lutte prometteurs existent et ont fait l'objet de nombreuses revues (Barreaux *et al*. 2017; Ondeto *et al*. 2017; Simard 2018). Ces outils qui sont à différents stades de leur développement, présentent pour la plupart l'originalité de cibler un comportement du vecteur/un stade du moustique jusque-là pas ou très peu exploités. Ils utilisent aussi des technologies avancées pour venir à bout des vecteurs. Il nous a semblé nécessaire de mentionner quelques-uns de ces outils, la liste n'étant pas exhaustive.

A part la PID, d'autres stratégies complémentaires dirigées contre les vecteurs endophages et endophiles pourraient contribuer à réduire la transmission des *Plasmodium spp.* en Afrique sub-saharienne. Parmi elles, on peut citer celle qui consiste à améliorer les habitations pour réduire l'entrée des vecteurs par des barrières physiques comme la fermeture des avant-toits, des grillages sur les fenêtres et les portes, etc.(Yé *et al*. 2006; Atieli *et al*. 2009; Animut *et al*. 2013; Bradley *et al*. 2013; Ondiba *et al*. 2018). L'ajout d'insecticide a aussi été développé pour produire un effet létal de la barrière physique. Cet ajout pourrait alors permettre de réduire considérablement la densité des vecteurs, la longévité des vecteurs et la transmission des *Plasmodium spp.* dans une communauté si la couverture est élevée (Sternberg *et al*. 2016; Killeen *et al*. 2017). L'une de ces stratégies à base d'insecticide nommée « tubes d'avant-toit » (en anglais « eave tubes ») consiste non seulement à fermer les avant-toits des maisons (un point d'entrée privilégié des *An. gambiae s.l.* en Afrique (Njie *et al*. 2009)) mais aussi à placer des inserts traités d'insecticide à certains endroits des avant-toits (Sternberg *et al*. 2016). Cette stratégie présente aussi l'avantage d'utiliser une technique particulière (revêtements électrostatiques, « electrostatic coating » en anglais) pour traiter les inserts qui s'est révélée très efficace même contre les vecteurs résistants aux insecticides (Andriessen *et al*. 2015). L'efficacité additionnelle des « tubes d'avant-toit » a récemment été évaluée à l'échelle

opérationnelle à Bouaké, au centre de la Côte d'Ivoire et les résultats définitifs seront bientôt publiés.

Une autre stratégie consiste à tuer les mâles et les femelles de vecteurs en utilisant des pièges à appât sucré (en anglais « Attractive Toxic Sugar Baits »). Ces pièges contiennent du sucre (alimentation des moustiques mâles et femelles) et des substances toxiques qui sont sélectives et qui ont des effets minimes sur les espèces non ciblées et sur l'environnement (Müller *et al*. 2010; Beier *et al*. 2012; Stewart *et al*. 2013). Les pièges à appât sucré peuvent être déployés dans des stations d'appât ou sur des plantes. De nombreuses études menées à petite échelle ont montré que l'utilisation des pièges à appâts sucrés avait un impact significatif sur la densité et la longévité des vecteurs (Müller *et al*. 2010; Beier *et al*. 2012; Stewart *et al*. 2013). L'évaluation à grande échelle de cette stratégie en combinaison avec les outils actuels de lutte (les MILDA notamment) est toutefois nécessaire pour mesurer son impact additionnel sur la transmission des *Plasmodium spp*. et la survenue du paludisme.

Enfin, les progrès majeurs de la génétique ont aussi laissé entrevoir plusieurs possibilités pour lutter efficacement contre les anophèles vecteurs. Parmi celles-ci, sont en développement la stérilisation par irradiation, la Technique de l'Insecte Incompatible (TII) par l'utilisation de *Wolbachia* et le forçage génétique ou « gene drive ». La stérilisation par irradiation se base sur un principe simple qui est le suivant : l'accouplement d'une femelle de moustique avec un mâle stérile entraîne l'absence de descendance viable. Cette technique n'a pas encore été évaluée à l'échelle opérationnelle contre les anophèles vecteurs mais de nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années au laboratoire pour améliorer les techniques d'irradiation et de production de masse des mâles stériles (Benelli 2015). En ce qui concerne la TII par l'utilisation des *Wolbachia*, elle fonctionne selon le principe suivant : l'accouplement des mâles infectés par une certaine souche de *Wolbachia* (souche différente de celle présente dans la population locale) avec une femelle sauvage entraîne des pontes non viables. Jusqu'à présent, cette technique n'a été évaluée qu'au laboratoire contre les anophèles (Joshi *et al*. 2014). Enfin, le forçage génétique est une technique très récente qui permet d'augmenter la transmission d'un élément génétique sans suivre les lois naturelles de Mendel. Cette technique peut être utilisée pour supprimer la population de vecteurs ou la modifier afin de réduire la compétence vectorielle des moustiques (Hammond *et al*. 2016). Dans le premier cas, le transgène introduit dans la population vectrice vise à changer la transmission des chromosomes sexuels pour avoir

une descendance majoritairement mâle ou à inhiber les gènes de fertilité des femelles pour les rendre stériles. Dans le deuxième cas c'est-à-dire pour réduire la compétence vectorielle des moustiques, les gènes spécifiques codant pour les protéines de liaison du parasite chez le moustique peuvent être modifiés de sorte que les parasites ne se fixent plus sur les récepteurs spécifiques. Ainsi les femelles portant le transgène sont incapables de porter le parasite et donc ne peuvent le transmettre. Ces possibilités qu'offre cette nouvelle technologie de « forçage génétique » ont été évaluées au laboratoire et ont donné des résultats très encourageants (Hammond *et al*. 2017; Kyrou *et al*. 2018). Toutefois, des recherches supplémentaires sont encore nécessaires avant qu'elle soit évaluée à l'échelle opérationnelle et utilisée dans les programmes de lutte contre le paludisme (Simard 2018).

Conclusion générale

Le besoin de déployer des stratégies complémentaires à la distribution gratuite des MILDA est réel et urgent dans la plupart des pays de l'Afrique sub-saharienne. Cette étude a montré que le déploiement de la stratégie renforcée de l'IEC ou la PID ou la LAL en combinaison avec les MILDA réduit l'intensité de la transmission au Nord de la Côte d'Ivoire où les vecteurs sont résistants aux pyréthrinoïdes. Les résultats de l'impact épidémiologique de ces stratégies complémentaires fourniront davantage d'informations sur leur bénéfice en termes de réduction de la prévalence de l'infection et de l'incidence du paludisme. Les données globales collectées dans l'essai pourront alors permettre au programme national de la Côte d'Ivoire ainsi que ceux d'autres pays de l'Afrique sub-saharienne d'élaborer des plans stratégiques efficaces contre le paludisme. Ces programmes devraient aussi tenir compte des limitations opérationnelles et/ou biologiques des stratégies complémentaires et prendre des dispositions pratiques pour minimiser leur impact. Ils pourraient par exemple opter pour le déploiement simultané de deux stratégies complémentaires en plus des MILDA. Ainsi les limitations d'une stratégie pourraient être en partie compensées par les atouts de l'autre. Toutefois, il conviendrait d'évaluer l'efficacité et le rapport coût/efficacité de telles combinaisons avant leur déploiement. A l'heure actuelle, des outils de lutte antivectorielle innovants sont aussi en développement et nécessitent des évaluations d'abord à petite échelle puis à grande échelle avant d'intégrer l'arsenal de lutte contre le paludisme. De telles évaluations qui impliquent à leurs phases finales des recherches opérationnelles doivent être soutenues par les partenaires financiers afin d'envisager un niveau

de transmission des *Plasmodium spp*. proche de zéro au Nord de la Côte d'Ivoire et plus généralement en Afrique sub-saharienne.

Références

Adak T, Mittal PK, Raghavendra K, Subbarao SK, Ansari MA, Sharma VP. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* Say 1823. Curr Sci. 1995;69:695–8.

Adja AM, N'goran EK, Koudou BG, Dia I, Kengne P, Fontenille D, Chandre F. Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. Ann Trop Med Parasitol. 2011;105(1):13–24.

Afrane YA, Mweresa NG, Wanjala CL, Gilbreath III TM, Zhou G, Lee M-C, Githeko AK, Yan G. Evaluation of long-lasting microbial larvicide for malaria vector control in Kenya. Malar J. 2016;15(1):577.

Agossa FR, Padonou GG, Koukpo CZ, Zola-Sahossi J, Azondekon R, Akuoko OK, Ahoga J, N'dombidje B, Akinro B, Fassinou AJYH, Sezonlin M, Akogbeto MC. Efficacy of a novel mode of action of an indoor residual spraying product, SumiShield® 50WG against susceptible and resistant populations of *Anopheles gambiae* (*s.l.*) in Benin, West Africa. Parasit Vectors. 2018;11(1):293.

Andriessen R, Snetselaar J, Suer RA, Osinga AJ, Deschietere J, Lyimo IN, Mnyone LL, Brooke BD, Ranson H, Knols BGJ, Farenhorst M, Herren HR. Electrostatic coating enhances bioavailability of insecticides and breaks pyrethroid resistance in mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(39):12081–6.

Animut A, Balkew M, Lindtjørn B. Impact of housing condition on indoor-biting and indoor-resting *Anopheles arabiensis* density in a highland area, central Ethiopia. Malar J. 2013;12(1):393.

Antonio-Nkondjio C, Ment C, Kerah H, Dé F, Simard R, Awono-Ambene P, Chouaibou M, On 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.

Assogba BS, Djogbénou LS, Milesi P, Berthomieu A, Perez J, Ayala D, Chandre F, Makoutodé M, Labbé P, Weill M. An *ace-1* gene duplication resorbs the fitness cost associated with resistance in *Anopheles gambiae*, the main malaria mosquito. Sci Rep. 2015;5(1):14529.

Atieli H, Menya D, Githeko A, Scott T. House design modifications reduce indoor resting malaria vector densities in rice irrigation scheme area in western Kenya. Malar J. 2009;8(1):108.

Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, Mijailovsky SJ, Chalepakis G, Anthousi A, Lynd A, Antoine S, Hemingway J, Ranson H, Lycett GJ, Vontas J. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(33):9268–73.

Barreaux P, Barreaux AMG, Sternberg ED, Suh E, Waite JL, Whitehead SA, Thomas MB. Priorities for broadening the malaria vector control tool kit. Trends Parasitol. 2017;33(10):763–74.

Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, Williamson MS, Ranson H, Ball A, Vontas J, Field LM. Detection of knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. Malar J. 2007;6(1):111.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw. 2015;67:1–48.

Batisso E, Habte T, Tesfaye G, Getachew D, Tekalegne A, Kilian A, Mpeka B, Lynch C. A stitch in time: a cross-sectional survey looking at long lasting insecticide-treated bed net ownership, utilization and attrition in SNNPR, Ethiopia. Malar J. 2012;11(1):183.

Becker N, Ludwig M. Investigations on possible resistance in *Aedes* vexans field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. J Am Mosq Control Assoc. 1993;9(2):221–4.

Becker N, Margalit J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. *Bacillus thuringiensis*. Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, Ed *Bacillus thuringiensis*, an Environ Biopestic Theory Pract Chichester Wiley Sons. 1993;147–70.

Beier JC, Killeen GF, Githure JI. Short report: Entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. Am J Trop Med Hyg. 1999;61(1):109–13.

Beier JC, Müller GC, Gu W, Arheart KL, Schlein Y. Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles* malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. Malar J. 2012;11(1):31.

Benelli G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. Parasitol Res. 2015;114(8):2801–5.

Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle KE, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA, Briët O, Penny MA, Smith TA, Bennett A, Yukich J, Eisele TP, Griffin JT, Fergus CA, Lynch M, Lindgren F, Cohen JM, Murray CLJ, Smith DL, Hay SI, Cibulskis RE, Gething PW. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature. 2015a;526(7572):207–11.

Bhatt S, Weiss DJ, Mappin B, Dalrymple U, Cameron E, Bisanzio D, Smith DL, Moyes CL, Tatem AJ, Lynch M, Fergus CA, Yukich J, Bennett A, Eisele TP, Kolaczinski J, Cibulskis RE, Hay SI, Gething PW. Coverage and system efficiencies of insecticide-treated nets in Africa from 2000 to 2017. Elife. 2015b;4:1–37.

Boissière A, Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambéné PH, Nsango SE, Morlais I. Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon.

PLoS One. 2013;8(1):e54820.

Boyer S, Paris M, Jego S, Lempérière G, Ravanel P. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: *Culicidae*). Biol Control. 2012;62(2):75–81.

Bradley J, Rehman AM, Schwabe C, Vargas D, Monti F, Ela C, Riloha M, Kleinschmidt I. Reduced prevalence of malaria infection in children living in houses with window screening or closed eaves on Bioko Island, Equatorial Guinea. PLoS One. 2013;8(11):e80626.

Briet OJT, Dossou-Yovo J, Akodo E, Giesen N van de, Teuscher TM. The relationship between *Anopheles gambiae* density and rice cultivation in the savannah zone and forest zone of Cote d'Ivoire. Trop Med Int Heal. 2003;8(5):439–48.

Brogdon WG, McAllister JC, Corwin AM, Cordon-Rosales C. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: *Culicidae*). J Econ Entomol. 1999;92(2):298–302.

Brooks M, K K, Benthem V, Koen J, Magnusson A, Casper W, Nielsen A, Skaug H, Mächler M, Bolker B. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. R J. 2017;9(2):378–400.

Bukhari T, Takken W, Koenraadt CJM. Biological tools for control of larval stages of malaria vectors – a review. Biocontrol Sci Technol. 2013;23(9):987–1023.

Caldas de Castro M, Yamagata Y, Mtasiwa D, Tanner M, Utzinger J, Keiser J, Singer BH. Integrated urban malaria control: a case study in Dar es Salaam, Tanzania. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(2):103–17.

Camara S, Ahoua Alou LP, Koffi AA, Clegban YCM, Kabran J-P, Koffi FM, Koffi K, Pennetier C. Efficacy of Interceptor® G2, a new long-lasting insecticidal net against wild pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae s.s.* from Côte d'Ivoire: a semi-field trial. Parasite. 2018a;25:42.

Camara S, Koffi AA, Ahoua Alou LP, Koffi K, Kabran J-PK, Koné A, Koffi MF, N'Guessan R, Pennetier C. Mapping insecticide resistance in *Anopheles gambiae* (*s.l.*) from Côte d'Ivoire. Parasit Vectors. 2018b;11(1):19.

Carnevale P, Guillet P, Robert V, Fontenille D, Doannio J, Coosemans M, Mouchet J. Diversity of malaria in rice growing areas of the Afrotropical region. Parassitologia. 1999;41(1–3):273–6.

Carnevale P, Robert V. Les anophèles : biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. Marseille: IRD Éditions. 2009.

Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L, Gazin P, Richard A, Mouchet J. Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso. Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1988;81(5):832–46.

Carrara GC, 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.

Carrasco D, Lefèvre T, Moiroux N, Pennetier C, Chandre F, Cohuet A. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. Curr Opin Insect Sci. 2019;5745(18).

Charles JF, Nielsen-LeRoux C. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95 Suppl 1:201–6.

Chevillon C, Bernard C, Marquine M, Pasteur N. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. J Med Entomol. 2001;38(5):657–64.

Chinwe NJ, Ocheyana GI, Ibo OP, Ide Y, Eberechukwu L. A review of the literature on insecticide treated bed net use , anaemia and malaria parasitaemia in under five children. Am J Pediatr. 2018;4(1):6–11.

Choi KS, Coetzee M, Koekemoer LL. Simultaneous identification of the *Anopheles funestus* group and *Anopheles longipalpis* type C by PCR-RFLP. Malar J. 2010;9:316.

Choi L, Pryce J, Garner P. Indoor residual spraying for preventing malaria in communities using insecticide-treated nets. Cochrane database Syst Rev. 2019;5(5):CD012688.

Chouaïbou M, Kouadio FB, Tia E, Djogbenou L. First report of the East African *kdr* mutation in an *Anopheles gambiae* mosquito in Côte d'Ivoire. Wellcome open Res. 2017;2:8.

Chouaïbou MS, Fodjo BK, Fokou G, Allassane OF, Koudou BG, David J-P, Antonio-Nkondjio C, Ranson H, Bonfoh B. Influence of the agrochemicals used for rice and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Côte d'Ivoire. Malar J. 2016;15(1):426.

Churcher TS, Lissenden N, Griffin JT, Worrall E, Ranson H. The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. Elife. 2016;5:e16090.

Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. Zootaxa. 2013;3619:246–74.

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73(5):483–97.

Corbel V, Akogbeto M, Damien GB, Djenontin A, Chandre F, Rogier C, Moiroux N, Chabi J, Banganna B, Padonou GG, Henry MC. Combination of malaria vector control interventions in pyrethroid resistance area in Benin: A cluster randomised controlled trial. Lancet Infect Dis. 2012;12(8):617–26.

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.

Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, Wong KT, Adem P, Zaki SR, Singh B, Krishna S. Severe malaria - A case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: A case report. Malar J. 2010;9(1):10.

Darriet F, Robert V, Tho Vien N, Carnevale P. Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs du paludisme de la perméthrine en imprégnation sur des moustiquaires intactes et trouées. 1984. Bobo-Dioulasso: OCCGE, 1984, 35 p. multigr.

David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJI. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on earth. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2013;368(1612):20120429.

Davidson EW, Sweeney AW, Cooper R. Comparative field trials of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *B. thuringiensis var. israelensis* commercial powder formulations. J Econ Entomol. 1981;74(3):350–4.

Davidson G. The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. Riv Malariol. 1964;43:167–83.

Deribew A, Birhanu Z, Sena L, Dejene T, Reda AA, Sudhakar M, Alemseged F, Tessema F, Zeynudin A, Biadgilign S, Deribe K. The effect of household heads training on long-lasting insecticide-treated bed nets utilization: A cluster randomized controlled trial in Ethiopia. Malar J. 2012;11(1):99.

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.

Diabaté A, Dabire RK, Kim EH, Dalton R, Millogo N, Baldet T, Simard F, Gimnig JE, Hawley WA, Lehmann T. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) in different habitats: a transplantation experiment. J Med Entomol. 2005;42(4):548–53.

Djènontin A, Pennetier C, Zogo B, Soukou KB, Ole-Sangba M, Akogbéto M, Chandre F, Yadav R, Corbel V. Field efficacy of vectobac GR as a mosquito larvicide for the control of anopheline and culicine mosquitoes in natural habitats in Benin, West Africa. PLoS One. 2014;9(2):e87934.

Djogbenou L, Chandre F, Berthomieu A, Dabire R, Koffi A. Evidence of introgression of the *ace-1 R* mutation and of the *ace-1* duplication in West African *Anopheles gambiae s . s* . PLoS One. 2008;3(5):1–7.

Djogbénou L, Labbé P, Chandre F, Pasteur N, Weill M. Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. Malar J. 2009;8:70.

Djogbénou L, Noel V, Agnew P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. Malar J. 2010;9:12.

Doannio JM, Dossou-Yovo J, Diarrassouba S, Rakotondraibe ME, Chauvancy G, Chandre F, Riviere F, Carnevale P. La dynamique de la transmission du paludisme à Kafine, un village rizicole en zone de savane humide de Côte d'Ivoire. Bull Soc Pathol Exot. 2002;95(1):11–6.

Dolo G, Briët OJT, Dao A, Traoré SF, Bouaré M, Sogoba N, Niaré O, Bagayogo M, Sangaré D, Teuscher T, Touré YT. Malaria transmission in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. Acta Trop. 2004;89(2):147–59.

Dossou-Yovo, J, Ouattara A, Doannio JMC, Riviere E, Chauvancy G, Meunier JY. Aspects du paludisme dans un village de savane humide de Côte d 'Ivoire. Médecine Trop. 1994;54:331–336.

Dossou-Yovo J, Doannio J, Rivière F, Duval J. Rice cultivation and malaria transmission in Bouaké city (Côte d'Ivoire). Acta Trop. 1994;57(1):91–4.

Dossou-Yoyo J, Doannio JMC, Diarrassouba S, Chauvancy G. Impact d'aménagements de rizières sur la transmission du paludisme dans la ville de Bouaké, Côte d'Ivoire. Bull La Soc Pathol Exot. 1998;91(4):327–33.

Duvallet G, Fontenille D, Robert V. Entomologie médicale et vétérinaire. Marseille: IRD Éditions; 2017.

Ecowas Commission. Annual Report : Towards ensuiring food security in West Africa. 2012;Abuja.

Edi AVC, N'Dri BP, Chouaibou M, Kouadio FB, Pignatelli P, Raso G, Weetman D, Bonfoh B. First detection of N1575Y mutation in pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Southern Côte d'Ivoire. Wellcome open Res. 2017;2:71.

Edi C V., Djogbénou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MAT, Poupardin R, Jones CM, Essandoh J, Kétoh GK, Paine MJI, Koudou BG, Donnelly MJ, Ranson H, Weetman D. CYP6 P450 enzymes and *Ace-1* duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. PLoS Genet. 2014;10(3):e1004236.

Edi CVA, Koudou BG, Jones CM, Weetman D, Ranson H. Multiple-insecticide resistance in *Anopheles gambiae* mosquitoes, Southern Côte d'Ivoire. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1508–11.

Elamathi N, Verma V, Sharma P, Uragayala S, Kamaraju R. Neonicotinoids in vector control: In silico approach. Asian J Biomed Pharm Sci. 2014;4(39):25–9.

Essandoh J, Yawson AE, Weetman D. Acetylcholinesterase (*Ace-1*) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles*

gambiae s.s. and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana. Malar J. 2013;12:404.

FAO. Edible insects. Future prospects for food and feed security. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Sidén-Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s.* Insect Mol Biol. 2001;10(1):19–23.

Faye O, Fontenille D, Gaye O, Sy N, Molez JF, Konate L, Hebard G, J.P. H, Trouillet J, Diallo S, Mouchet J. Paludisme et riziculture dand le delta du fleuve Senegal. Ann Soc belge Méd trop. 1995;75:179–89.

Federici BA, Park H-W, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ. Recombinant bacteria for mosquito control. J Exp Biol. 2003;206:3877–85.

Fillinger U, Bv I, Becker N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis var israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. Trop Med Int Heal. 2003;8:37–47.

Fillinger U, Kannady K, William G, Vanek MJ, Dongus S, Nyika D, Geissbühler Y, Chaki PP, Govella NJ, Mathenge EM, Singer BH, Mshinda H, Lindsay SW, Tanner M, Mtasiwa D, de Castro MC, Killeen GF. 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(1):20.

Fillinger U, Lindsay SW. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. Trop Med Int Heal Vol. 2006;11(11):1629–42.

Fillinger U, Ndenga B, Githeko A, Lindsay SW. 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.

Fontenille D, Simard F. Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):357–75.

Fornadel CM, Norris LC, Glass GE, Norris DE. Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern Zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(4):848–53.

Fournet F, Cussac M, Ouari A, Meyer P-E, Toé HK, Gouagna L-C, Dabiré RK. Diversity in anopheline larval habitats and adult composition during the dry and wet seasons in Ouagadougou (Burkina Faso). Malar J. 2010;9:78.

Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect. 1990;87:245–54.

Garros C, Koekemoer LL, Kamau L, Awolola TS, Van Bortel W, Coetzee M, Coosemans M, Manguin S. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. Am J Trop Med Hyg. 2004;70(3):260–5.

Geissbühler Y, Kannady K, Chaki PP, Emidi B, Govella NJ, Mayagaya V, Kiama M, Mtasiwa D, Mshinda H, Lindsay SW, Tanner M, Fillinger U, de Castro MC, Killeen GF. 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.

Georghiou GP, Wirth MC. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*). Appl Environ Microbiol. 1997;63(3):1095–101.

Gillies M, Coetzee M. A Supplement to the *Anophelinae* of the South of the Sahara (Afrotropical Region). Publ South African Inst Med Res. 1987;55:143.

Gillies M, de Meillon D. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara. Publ South African Inst Med Res Johannesbg. 1968;54:343.

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;21(5):1087–92.

Gimonneau G, Pombi M, Choisy M, Morand S, Dabiré RK, Simard F. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. Med Vet Entomol. 2012;26(1):9–17.

Glunt KD, Blanford JI, Paaijmans KP. Chemicals, climate, and control: increasing the effectiveness of malaria vector control tools by considering relevant temperatures. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003602.

Glunt KD, Coetzee M, Huijben S, Koffi AA, Lynch PA, N'Guessan R, Oumbouke WA, Sternberg ED, Thomas MB. Empirical and theoretical investigation into the potential impacts of insecticide resistance on the effectiveness of insecticide-treated bed nets. Evol Appl. 2018;11(4):431–41.

Guillet P, Alnwick D, Cham MK, Neira M, Zaim M, Heymann D, Mukelabai K. Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. Bull World Health Organ. 2001;79(10):998.

Hamainza B, Sikaala CH, Moonga HB, Chanda J, Chinula D, Mwenda M, Kamuliwo M, Bennett A, Seyoum A, Killeen GF. Incremental impact upon malaria transmission of supplementing pyrethroid-impregnated long-lasting insecticidal nets with indoor residual spraying using pyrethroids or the organophosphate, pirimiphos methyl. Malar J. 2016;15(1):100.

Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D,

Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. Nat Biotechnol. 2016;34(1):78–83.

Hammond AM, Kyrou K, Bruttini M, North A, Galizi R, Karlsson X, Kranjc N, Carpi FM, D'Aurizio R, Crisanti A, Nolan T. The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito. PLoS Genet. 2017;13(10):e1007039.

Hemingway J, Shretta R, Wells TNC, Bell D, Djimdé AA, Achee N, Qi G. Tools and strategies for malaria control and elimination: What do we need to achieve a grand convergence in malaria? PLoS Biol. 2016;14(3):e1002380.

Henry M, Rogier C, Nzeyimana I, Assi SB, Audibert M, Mathonnat J, Keundjian A. Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the savannah of Côte d'Ivoire. Trop Med Int Heal. 2003;8(5):449–58.

Hongyu Z, Changju Y, Jingye H, Lin L. Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biocontrol Sci Technol. 2004;14(3):321–5.

Hougard JM, Kohoun G, Guillet P, Doannio J, Duval J, Escaffre H. Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 souche 1593-4 dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 en Afrique de l'Ouest. Cah ORSTOM, série « Entomol médicale Parasitol ». 1985;23:35–44.

Hunt RH, Coetzee M, Fettene M. The *Anopheles gambiae* complex: A new species from Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92(2):231–5.

Hunt RH, Spillings BL, Chiphwanya J, Brooke BD, Coetzee M, Koekemoer LL. A New species concealed by *Anopheles funestus* Giles, a major malaria vector in Africa. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(3):510–5.

Ijumba JN, Lindsay SW. Impact of irrigation on malaria in Africa: paddies paradox. Med Vet Entomol. 2001;15(1):1–11.

Joshi D, McFadden MJ, Bevins D, Zhang F, Xi Z. *Wolbachia* strain wAlbB confers both fitness costs and benefit on *Anopheles stephensi*. Parasit Vectors. 2014;7:336.

Kamau L, Mulaya N, Vulule JM. Evaluation of potential role of *Anopheles ziemanni* in malaria transmission in Western Kenya. J Med Entomol. 2006;43(4):774–6.

Kamdem C, Tene Fossog B, Simard F, Etouna J, Ndo C, Kengne P, Boussès P, Etoa F-X, Awono-Ambene P, Fontenille D, Antonio-Nkondjio C, Besansky NJ, Costantini C. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. PLoS One. 2012;7(6):e39453.

Keiser J, De Castro MC, Maltese MF, Bos R, Tanner M, Singer BH, Utzinger J. Effect of irrigation and large dams on the burden of malaria on a global and regional scale. Am J

Trop Med Hyg. 2005;72(4):392–406.

Kenea O, Balkew M, Tekie H, Deressa W, Loha E, Lindtjørn B, Overgaard HJ. Impact of combining indoor residual spraying and long-lasting insecticidal nets on *Anopheles arabiensis* in Ethiopia: results from a cluster randomized controlled trial. Malar J. 2019;18(1):182.

Kilian A, Koenker H, Baba E, Onyefunafoa EO, Selby RA, Lokko K, Lynch M. Universal coverage with insecticide-treated nets - applying the revised indicators for ownership and use to the Nigeria 2010 malaria indicator survey data. Malar J. 2013;12:314.

Killeen GF, Fillinger U, Kiche I, Gouagna LC, Knols BGJ. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? Lancet Infect Dis. 2002;2(10):618–27.

Killeen GF, Kihonda J, Lyimo E, Oketch FR, Kotas ME, Mathenge E, Schellenberg JA, Lengeler C, Smith TA, Drakeley CJ. 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.

Killeen GF, Masalu JP, Chinula D, Fotakis EA, Kavishe DR, Malone D, Okumu FO. Control of malaria vector mosquitoes by insecticide-treated combinations of window screens and eave baffles. Emerg Infect Dis. 2017;23(5):782–9.

Killeen GF, Smith TA. Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101(9):867–80.

Kitron U, Spielman A. Suppression of transmission of malaria through source reduction: anti-anopheline measures applied in Israel, the United States, and Italy. Rev Infect Dis. 1989;11(3):391–406.

Kleinschmidt I, Bradley J, Knox TB, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, Ismail BA, Bigoga JD, Adechoubou A, Raghavendra K, Cook J, Malik EM, Nkuni ZJ, Macdonald M, Bayoh N, Ochomo E, Fondjo E, Awono-Ambene HP, Herman P, Etang J, Akogbeto M, Bhatt RM, Chourasia MK, Swain DK, Kinyari T, Subramaniam K, Massougbodji A, Okê-Sopoh M, Ogouyemi-Hounto A, Kouambeng C, Abdin MS, West P, Elmardi K, Cornelie S, Corbel V, Valecha N, Mathenge E, Kamau L, Lines J, Donnelly MJ. Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: a WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. Lancet Infect Dis. 2018;18:640–9.

Kleinschmidt I, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, Bashir AI, Bigoga J, Adechoubou A, Raghavendra K, Knox TB, Malik EM, Nkuni ZJ, Bayoh N, Ochomo E, Fondjo E, Kouambeng C, Awono-Ambene HP, Etang J, Akogbeto M, Bhatt R, Swain DK, Kinyari T, Njagi K, Muthami L, Subramaniam K, Bradley J, West P, Massougbodji A, Okê-Sopoh M, Hounto A, Elmardi K, Valecha N, Kamau L, Mathenge E, Donnelly MJ. Design of a study to determine the impact of insecticide resistance on malaria vector control: a multi-country investigation. Malar J. 2015;14(1):282.

Knox TB, Juma EO, Ochomo EO, Pates Jamet H, Ndungo L, Chege P, Bayoh NM, N'Guessan R, Christian RN, Hunt RH, Coetzee M. An online tool for mapping insecticide resistance in major *Anopheles* vectors of human malaria parasites and review of resistance status for the Afrotropical region. Parasit Vectors. 2014;7(1):76.

Koekemoer LL, Kamau L, Garros C, Manguin S, Hunt RH, Coetzee M. Impact of the Rift Valley on restriction fragment length polymorphism typing of the major African malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2006;43(6):1178–84.

Koffi A, Ludovic AAP, Maurice AA, Lucien KY, Patrick B, Magaran B, Manga L. Rapport sur le profil entomologique de la Côte d'Ivoire de 1960 à 2009. PNLP. 2009;67.

Koffi AA, Ahoua Alou LP, Kabran JPK, N'Guessan R, Pennetier C. Re-visiting insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* from Côte d'Ivoire: A nation-wide informative survey. PLoS One. 2013;8(12):1–10.

Koudou BG, Doumbia M, Janmohamed N, Tschannen AB, Tanner M, Hemingway J, Utzinger J. Effects of seasonality and irrigation on malaria transmission in two villages in Côte d'Ivoire. Ann Trop Med Parasitol. 2010;104(2):109–21.

Koudou BG, Tano Y, Doumbia M, Nsanzabana C, Cissé G, Girardin O, Dao D, N'Goran EK, Vounatsou P, Bordmann G, Keiser J, Tanner M, Utzinger J. Malaria transmission dynamics in central Côte d'Ivoire: The influence of changing patterns of irrigated rice agriculture. Med Vet Entomol. 2005;19(1):27–37.

Kouznetsov RL. Malaria control by application of indoor spraying of residual insecticides in tropical Africa and its impact on community health. Trop Doct. 1977;7(2):81–91.

Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. Nat Biotechnol. 2018;36(11):1062–6.

De La Cruz N, Crookston B, Dearden K, Gray B, Ivins N, Alder S, Davis R. Who sleeps under bednets in Ghana? A doer/non-doer analysis of malaria prevention behaviours. Malar J. 2006;5:61.

Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23:133–63.

Lapied B, Pennetier C, Apaire-Marchais V, Licznar P, Corbel V. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. Trends Biotechnol. 2009;27(4):190–8.

Lefèvre T, Gouagna LC, Dabiré KR, Elguero E, Fontenille D, Renaud F, Costantini C, Thomas F. 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(6):1023–9.

Lines J, Kleinschmidt I. Is malaria control better with both treated nets and spraying? Lancet. 2015;385(9976):1375–7.

Livak KJ. Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. Genetics. 1984;107(4):611–34.

Loha E, Deressa W, Gari T, Balkew M, Kenea O, Solomon T, Hailu A, Robberstad B, Assegid M, Overgaard HJ, Lindtjørn B. Long-lasting insecticidal nets and indoor residual spraying may not be sufficient to eliminate malaria in a low malaria incidence area: results from a cluster randomized controlled trial in Ethiopia. Malar J. 2019;18(1):141.

Mabaso MLH, Sharp B, Lengeler C. Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying. Trop Med Int Heal. 2004;9(8):846–56.

MacDonald G. Epidemiological basis of malaria control. Bull World Health Organ. 1956;15(3–5):613–26.

MacDonald G. The epidemiology and control of malaria. London: Oxford Univ. Pr. 1957.

Magnusson A, Skaug HJ, Nielsen A, Berg CW, Kristensen K, Maechler M, van Bentham K, Bolker B, Brooks ME. Generalized linear mixed models using template model builder. R package version 0725/r186.; 2017.

Maheu-giroux M, Castro MC. Do malaria vector control measures impact disease-related behaviour and knowledge ? Evidence from a large-scale larviciding intervention in Tanzania. Malar J. 2013;1–10.

Majambere S, Lindsay SW, Green C, Kandeh B, Fillinger U. Microbial larvicides for malaria control in the Gambia. Malar J. 2007;6(1):76.

Majambere S, Pinder M, Fillinger U, Ameh D, Conway DJ, Green C, Jeffries D, Jawara M, Milligan PJ, Hutchinson R, Lindsay SW. 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.

Masendu HT, Hunt RH, Govere J, Brooke BD, Awolola TS, Coetzee M. The sympatric occurrence of two molecular forms of the malaria vector *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto* in Kanyemba, in the Zambezi Valley, Zimbabwe. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98(7):393–6.

Moiroux N, Damien GB, Egrot M, Djenontin A, Chandre F, Corbel V, Killeen GF, Pennetier C. Human exposure to early morning *Anopheles funestus* biting behavior and personal protection provided by long-lasting insecticidal nets. PLoS One. 2014;9(8):e104967.

Moiroux N, Djènontin A, Zogo B, Bouraima A, Sidick I, Pigeon O, Pennetier C. Small-scale field testing of alpha-cypermethrin water-dispersible granules in comparison with the recommended wettable powder formulation for indoor residual spraying against malaria vectors in Benin. Parasit Vectors. 2018;11(1):508.

Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin A, Chandre F, Djègbé I, Guis H,

Corbel V. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. J Infect Dis. 2012;206(10):1622–9.

Monroe A, Moore S, Koenker H, Lynch M, Ricotta E. Measuring and characterizing night time human behaviour as it relates to residual malaria transmission in sub-Saharan Africa: a review of the published literature. Malar J. 2019;18(1):6.

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.

Muirhead-Thomson RC. The significance of irritability, behaviouristic avoidance and allied phenomena in malaria eradication. Bull World Health Organ. 1960; 22: 721–34.

Mukabana W, Kannady K, Kiama GM, Ijumba J, Mathenge E, Kiche I, Nkwengulila G, Mboera L, Mtasiwa D, Yamagata Y, van Schayk I, Knols B, Lindsay S, de Castro M, Mshinda H, Tanner M, Fillinger U, Killeen G. Ecologists can enable communities to implement malaria vector control in Africa. Malar J. 2006;5(1):9.

Mulla M, Darwazeh, H A, Zgomba M. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. Bull Soc Vector Ecol. 1995;15(2):166–75.

Müller GC, Beier JC, Traore SF, Toure MB, Traore MM, Bah S, Doumbia S, Schlein Y. Successful field trial of attractive toxic sugar bait (ATSB) plant-spraying methods against malaria vectors in the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. Malar J. 2010;9(1):210.

N'Guessan R, Boko P, Odjo A, Akogbéto M, Yates A, Rowland M. Chlorfenapyr: A pyrrole insecticide for the control of pyrethroid or DDT resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) mosquitoes. Acta Trop. 2007a;102(1):69–78.

N'Guessan R, Corbel V, Akogbéto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. Emerg Infect Dis. 2007b;13(2):199–206.

Najera J. Malaria vector control: decision making criteria and procedures for judicious use of insecticides. World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme. 2002;1–106.

Nayar JK, Knight JW, Ali A, Carlson DB, O'Bryan PD. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis serovar. israelensis* against two Florida mosquito species. J Am Mosq Control Assoc. 1999;15(1):32–42.

Nepomichene TNJJ, Tata E, Boyer S. Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. Malar J. 2015;14(1):475.

Ngufor C, Fongnikin A, Rowland M, N'Guessan R. Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae sl* in Southern

Benin. PLoS One. 2017;12(12):e0189575.

Ngwej LM, Hattingh I, Mlambo G, Mashat EM, Kashala J-CK, Malonga FK, Bangs MJ. Indoor residual spray bio-efficacy and residual activity of a clothianidin-based formulation (SumiShield® 50WG) provides long persistence on various wall surfaces for malaria control in the Democratic Republic of the Congo. Malar J. 2019;18(1):72.

Nicolas L. Bacteriological controLof mosquitoes and blackflies: present aspects and perspectives of research. Brasilia: 21eme simposio de controle biologico siconbiol.; 1990.

Njie M, Dilger E, Lindsay SW, Kirby MJ. Importance of eaves to house entry by *Anopheline*, but not *Culicine*, mosquitoes. J Med Entomol. 2009;46(3):505–10.

Nwakanma DC, Neafsey DE, Jawara M, Adiamoh M, Lund E, Rodrigues A, Loua KM, Konate L, Sy N, Dia I, Awolola TS, Muskavitch MAT, Conway DJ. Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. Genetics. 2013;193(4):1221–31.

Ochomo EO, Bayoh NM, Walker ED, Abongo BO, Ombok MO, Ouma C, Githeko AK, Vulule J, Yan G, Gimnig JE. The efficacy of long-lasting nets with declining physical integrity may be compromised in areas with high levels of pyrethroid resistance. Malar J. 2013;12(1):368.

Ojuka P, Boum Y, Denoeud-Ndam L, Nabasumba C, Muller Y, Okia M, Mwanga-Amumpaire J, De Beaudrap P, Protopopoff N, Etard JF. Early biting and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles* might compromise the effectiveness of vector control intervention in Southwestern Uganda. Malar J. 2015;14(1):1–8.

Olapeju B, Choiriyyah I, Lynch M, Acosta A, Blaufuss S, Filemyr E, Harig H, Monroe A, Selby RA, Kilian A, Koenker H. Age and gender trends in insecticide-treated net use in sub-Saharan Africa: a multi-country analysis. Malar J. 2018;17(1):423.

Ondeto BM, Nyundo C, Kamau L, Muriu SM, Mwangangi JM, Njagi K, Mathenge EM, Ochanda H, Mbogo CM. Current status of insecticide resistance among malaria vectors in Kenya. Parasit Vectors. 2017;10(1):429.

Ondiba IM, Oyieke FA, Ong'amo GO, Olumula MM, Nyamongo IK, Estambale BBA. Malaria vector abundance is associated with house structures in Baringo County, Kenya. PLoS One. 2018;13(6):e0198970.

Oxborough RM, Seyoum A, Yihdego Y, Dabire R, Gnanguenon V, Wat'senga F, Agossa FR, Yohannes G, Coleman S, Samdi LM, Diop A, Faye O, Magesa S, Manjurano A, Okia M, Alyko E, Masendu H, Baber I, Sovi A, Rakotoson JD, Varela K,Abong'o B,Lucas B, Fornadel C, Dengela D. Susceptibility testing of *Anopheles* malaria vectors with the neonicotinoid insecticide clothianidin; results from 16 African countries, in preparation for indoor residual spraying with new insecticide formulations. Malar J. 2019;18(1):264.

Oyewole IO, Awolola TS, Ibidapo CA, Oduola AO, Okwa OO, Obansa JA. Behaviour and population dynamics of the major anopheline vectors in a malaria endemic area in

southern Nigeria. J Vect Borne Dis. 2007;44:56–64.

Pages F, Orlandi-Pradines E, Corbel V. Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. Med Mal Infect. 2007;37(3):153–61.

Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21(3):305–9.

Pinder M, Jawara M, Jarju LBS, Salami K, Jeffries D, Adiamoh M, Bojang K, Correa S, Kandeh B, Kaur H, Conway DJ, D'Alessandro U, Lindsay SW. Efficacy of indoor residual spraying with dichlorodiphenyltrichloroethane against malaria in Gambian communities with high usage of long-lasting insecticidal mosquito nets: A cluster-randomised controlled trial. Lancet. 2015;385(9976):1436–46.

PNLP. Plan stratégique national de lutte contre le paludisme 2012–2015 (période replanifiée 2014–2017). Approche stratifiée de mise à l'échelle des interventions de lutte contre le paludisme en Côte d'Ivoire et consolidation des acquis. Abidjan: Ministère de la Santé et l'Hygiène Publique. 2014. p. 149.

Poopathi S, Mani TR, Rao DR, Baskaran G, Kabilan L. Cross-resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex quinquefasciatus* resistant to *B. sphaericus* 1593M. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999;30(3):477–81.

Protopopoff N, Mosha JF, Lukole E, Charlwood JD, Wright A, Mwalimu CD, Manjurano A, Mosha FW, Kisinza W, Kleinschmidt I, Rowland M. Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquitoes: a cluster, randomised controlled, two-by-two fact. Lancet (London, England). 2018;391(10130):1577–88.

Protopopoff N, Wright A, West PA, Tigererwa R, Mosha FW, Kisinza W, Kleinschmidt I, Rowland M. Combination of insecticide treated nets and indoor residual spraying in Northern Tanzania provides additional reduction in vector population density and malaria transmission rates compared to insecticide treated nets alone: A randomised control trial. PLoS One. 2015;10(11):e0142671.

Pulford J, Hetzel MW, Bryant M, Siba PM, Mueller I. Reported reasons for not using a mosquito net when one is available: a review of the published literature. Malar J. 2011;10(1):83.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/. 2018.

Randriamaherijaona S, Briët OJT, Boyer S, Bouraima A, N'Guessan R, Rogier C, Corbel V. Do holes in long-lasting insecticidal nets compromise their efficacy against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*? Results from a release–recapture study in experimental huts. Malar J. 2015;14(1):332.

Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J.

Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem J. 2001;359(2):295–304.

Rao DR, Mani TR, Rajendran R, Joseph AS, Gajanana A, Reuben R. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11(1):1–5.

Raymond M, Rousset F. GENEPOP Version 1.2. A population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered. 1995;26:248–9.

Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles J-F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends Parasitol. 2001;17(8):377–80.

Riveron JM, Ibrahim SS, Chanda E, Mzilahowa T, Cuamba N, Irving H, Barnes KG, Ndula M, Wondji CS. The highly polymorphic CYP6M7 cytochrome P450 gene partners with the directionally selected CYP6P9a and CYP6P9b genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. BMC Genomics. 2014;15(1):817.

Rojas JE, Mazzarri M, Sojo M, García-A GY. [Effectiveness of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on larvae of *Anopheles nuñeztovari*]. Invest Clin. 2001;42(2):131–46.

Roll Back Malaria. Seventeenth meeting of the RBM partnership monitoring and evaluation reference group (MERG). New York City; 2011.

Rowland M, Boko P, Odjo A, Asidi A, Akogbeto M, N'Guessan R. A new long-lasting indoor residual formulation of the organophosphate insecticide pirimiphos methyl for prolonged control of pyrethroid-resistant mosquitoes: An experimental hut trial in Benin. PLoS One. 2013;8(7):e69516.

RTS SCTP. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. Lancet (London, England). 2015;386(9988):31–45.

Saddler A, Koella JC. Modelling the impact of declining insecticide resistance with mosquito age on malaria transmission. MW J. 2015;6:13.

Sadia-Kacou CMA, Alou LPA, Edi AVC, Yobo CM, Adja MA, Ouattara AF, Malone D, Koffi AA, Tano Y, Koudou BG. Presence of susceptible wild strains of *Anopheles gambiae* in a large industrial palm farm located in Aboisso, South-Eastern of Côte d'Ivoire. Malar J. 2017;16(1):157.

Schorkopf DLP, Spanoudis CG, Mboera LEG, Mafra-Neto A, Ignell R, Dekker T. Combining attractants and larvicides in biodegradable matrices for sustainable mosquito vector control. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(10):1–22.

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(4):520–9.

Sherrard-Smith E, Skarp JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, Mihreteab S, Charlwood JD, Bhatt S, Winskill P, Griffin JT, Churcher TS. Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(30):15086–95.

Shousha AT. Species eradication: The eradication of *Anopheles gambiae* from Upper Egypt 1942-1945. Bull World Heal Organ. 1948;1(2):309–52.

Shute GT. A method of maintaining colonies of East African strains of *Anopheles gambiae*. Ann Trop Med Parasitol. 1956;50(1):92–4.

Simard F. La lutte contre les vecteurs : quel avenir ? Biol Aujourdhui. 2018;212(3–4):137–45.

Singer BH, Smith TA, Keiser J, de Castro MC, Tanner M, Utzinger J. Urbanization in sub-Saharan Africa and implication for malaria control. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(2):118–27.

Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet. 2004;363(9414):1017–24.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. A global map of dominant malaria vectors. Parasit Vectors. 2012;5(1):69.

Skaug H, Fournier D, Bolker B, Magnusson A, Nielsen A. glmmADMB: Generalized linear mixed models using AD model builder. R package version 0725/r18. 2012.

Skovmand O, Sanogo E. Experimental formulations of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: *Culicidae*) in Burkina Faso. J Med Entomol. 1999;36(1):62–7.

Soma DD, Zogo BM, Somé A, Tchiekoi BN, Hien DF de S, Pooda HS, Coulibaly S, Gnambani JE, Ouari A, Mouline K, Dahounto A, Ouédraogo GA, Fournet F, Koffi AA, Pennetier C, Moiroux N, Dabiré RK. *Anopheles* bionomic , insecticide resistance and malaria transmission in southwest Burkina Faso : a pre-intervention study. BioRxiv Prepr. 2019.

Sternberg ED, Ng'habi KR, Lyimo IN, Kessy ST, Farenhorst M, Thomas MB, Knols BGJ, Mnyone LL. Eave tubes for malaria control in Africa: initial development and semi-field evaluations in Tanzania. Malar J. 2016;15(1):447.

Stewart ZP, Oxborough RM, Tungu PK, Kirby MJ, Rowland MW, Irish SR. Indoor application of attractive toxic sugar bait (ATSB) in combination with mosquito nets for control of pyrethroid-resistant mosquitoes. PLoS One. 2013;8(12):e8416.

Therneau T. Coxme: Mixed effects cox models. R package version 2.2-10. 2018.

Thomson M, Connor S, Bennett S, D'Alessandro U, Milligan P, Aikins M, Langerock P, Jawara M, Greenwood B. Geographical perspectives on bednet use and malaria transmission in the Gambia, West Africa. Soc Sci Med. 1996;43(1):101–12.

Tiono AB, Ouédraogo A, Ouattara D, Bougouma EC, Coulibaly S, Diarra A, Faragher B, Guelbeogo MW, Sagnon NF, Ranson H, Lindsay SW. Efficacy of Olyset Duo , a bednet containing pyriproxyfen and permethrin , versus a permethrin-only net against clinical malaria in an area with highly pyrethroid-resistant vectors in rural Burkina Faso : a cluster-randomised controlled trial. Lancet. 2018;392(10147):569–80.

Toé L, Skovmand O, Dabiré K, Diabaté A, Diallo Y, Guiguemdé T, Doannio J, Akogbeto M, Baldet T, Gruénais M-E. Decreased motivation in the use of insecticide-treated nets in a malaria endemic area in Burkina Faso. Malar J. 2009;8(1):175.

Tusting LS, Thwing J, Sinclair D, Fillinger U, Gimnig J, Bonner KE, Bottomley C, Lindsay SW. Mosquito larval source management for controlling malaria. Cochrane Database Syst Rev. 2013;(8):CD008923.

Utzinger J, Tozan Y, Singer BH. Efficacy and cost-effectiveness of environmental management for malaria control. Trop Med Int Heal. 2001;6(9):677–87.

Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC. Susceptibility of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*, and methoprene. J Med Entomol. 2009;46(4):881–7.

Viana M, Hughes A, Matthiopoulos J, Ranson H, Ferguson HM. Delayed mortality effects cut the malaria transmission potential of insecticide-resistant mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(32):8975–80.

Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Mcallister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. Med Vet Entomol. 1999;13(3):239–44.

Walker K, Lynch M. Contribution of *Anopheles* larvae control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. Med Vet Entomol. 2007;21(1):2–21.

Weiss DJ, Lucas TCD, Nguyen M, Nandi AK, Bisanzio D, Battle KE, Cameron E, Twohig KA, Pfeffer DA, Rozier JA, Gibson HS, Rao PC, Casey D, Bertozzi-Villa A, Collins EL, Dalrymple U, Gray N, Harris JR, Howes RE, Kang SY, Keddie SH, May D, Rumisha S, Thorn MP, Barber R, Fullman N, Huynh CK, Kulikoff X, Kutz MJ, Lopez AD, Mokdad AH, Naghavi M, Nguyen G, Shackelford KA, Vos T, Wang H, Smith DL, Lim SS, Murray CJL, Bhatt S, Hay SI, Gething PW. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. Lancet. 2019;394(10195):322–31.

West PA, Protopopoff N, Wright A, Kivaju Z, Tigererwa R, Mosha FW, Kisinza W, Rowland M, Kleinschmidt I. Indoor residual spraying in combination with insecticide-treated nets

compared to insecticide-treated nets alone for protection against malaria: A cluster randomised trial in Tanzania. PLoS Med. 2014;11(4):e1001630.

White GB. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1974;68(4):278–98.

WHO. Manual on environmental management for mosquito control. World Heal Organ Offset Publ. 1982;66(1):283.

WHO. Entomological field techniques for malaria control. World Health Organization; 1992.

WHO. Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination. WHO Position Statement. Geneva: World Health Organization; 2006.

WHO. The use of DDT in malaria vector control: WHO position statement. 2011a.

WHO. WHO position statement on integrated vector management to control malaria and lymphatic filariasis. Relev Epidemiol Hebd. 2011b;86(13):121–7.

WHO. Interim Position Statement- the role of larviciding for malaria-control in sub-Saharan africa. Global Malaria Program. Geneva: World Health Organization; 2012a.

WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management (GPIRM). Geneva: World Health Organization; 2012b.

WHO. Larval source management – a supplementary measure for malaria vector control. An operational manual. Geneva: World Health Organization; 2013.

WHO. World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.

WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: World Health Organization; 2016.

WHO. World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.

WHO. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018a.

WHO. WHO | SumiShield 50WG. World Health Organization; 2018b. (https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified, Accessed 05Aug 2018).

WHO. WHO | Fludora Fusion. World Health Organization; 2018c. (https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified, Accessed 05Aug 2018).

WHO. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016. Geneva: World Health Organization; 2018d.

WHO. List of WHO Prequalified Vector Control Products 2019. (https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified, Accessed 05Aug 2019).

WHOPES. Report of the twentieth WHOPES working group meeting. Geneva: World Health Organization, 2017.(http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258921/1/WHO-HTM-NTD-WHOPES-2017.04-eng.pdf?ua=1. Accessed 05Aug 2019)

Wiebe A, Longbottom J, Gleave K, Shearer FM, Sinka ME, Massey NC, Cameron E, Bhatt S, Gething PW, Hemingway J, Smith DL, Coleman M, Moyes CL. Geographical distributions of African malaria vector sibling species and evidence for insecticide resistance. Malar J. 2017;16(1):85.

Wondji C, Frédéric S, Petrarca V, Etang J, Santolamazza F, Della Torre A, Fontenille D. Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae s.s.* J Med Entomol. 2005;42(6):998–1005.

Wondji CS, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowa T, Irving H, Ndula M, Rehman A, Morgan J, Barnes KG, Hemingway J. Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. Proc Natl Acad Sci. 2012;109(47):19063–70.

Wood OR, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer LL, Brooke BD. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Parasit Vectors. 2010;3(1):67.

Yahouédo GA, Chandre F, Rossignol M, Ginibre C, Balabanidou V, Garcia N, Mendez A, Pigeon O, Vontas J, Cornelie S. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. Sci Rep. 2017;7(1):11091.

Yawson AE, Weetman D, Wilson MD, Donnelly MJ. Ecological zones rather than molecular forms predict genetic differentiation in the malaria vector *Anopheles gambiae s.s.* in Ghana. Genetics. 2007;175(2):751–61.

Yé Y, Hoshen M, Louis V, Séraphin S, Traoré I, Sauerborn R. Housing conditions and *Plasmodium falciparum* infection: Protective effect of iron-sheet roofed houses. Malar J. 2006;5(1):8.

Zahiri NS, Mulla MS. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis*. J Med Entomol. 2003;40(405):672–7.

Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med Vet Entomol. 2000;14(1):1–5.

Zhang L, Zhang X, Zhang Y, Wu S, Gelbič I, Xu L, Guan X. A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. Sci Rep. 2016;6:39425.

Zogo B, Koffi AA, Alou LPA, Fournet F, Dahounto A, Dabiré RK, Baba-Moussa L, Moiroux N, Pennetier C. Identification and characterization of *Anopheles spp.* breeding habitats in the Korhogo area in northern Côte d'Ivoire: A study prior to a *Bti*-based larviciding

intervention. Parasit Vectors. 2019a;12(1):1–10.

Zogo B, Soma DD, Tchiekoi BN, Somé A, Ahoua Alou LP, Koffi AA, Fournet F, Dahounto A, Coulibaly B, Kandé S, Dabiré RK, Baba-Moussa L, Moiroux N, Pennetier C. *Anopheles* bionomics, insecticide resistance mechanisms, and malaria transmission in the Korhogo area, northern Côte d'Ivoire: a pre-intervention study. Parasite. 2019b;26:40.

Zoh DD, Ahoua Alou LP, Toure M, Pennetier C, Camara S, Traore DF, Koffi AA, Adja AM, Yapi A, Chandre F. The current insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* (*s.l.*) (*Culicidae*) in rural and urban areas of Bouaké, Côte d'Ivoire. Parasit Vectors. 2018;11(1):118.

Annexes

Annexe 1

Fiche Contrôle-qualité des captures

Date : Village :

Superviseur : Point de capture :

	INDICATEURS	17-18H	18-19H	19-20H	20-21H	21-22H	22-23H	23-24H	00-01H	01-02H	02-03H	03-04H	04-05H	05-06H	06-07H	07-08H	08-09H
INT	Respect de point de capture																
	Présence au poste																
	Etat de veille																
	Position adéquate																
	Habillement approprié																
	Collecte des sacs de capture																
	Présence des appareils de mesure																
	Bonne disposition des appareils de mesure																
EXT	Respect de point de capture																
	Présence au poste																
	Etat de veille																
	Position adéquate																
	Habillement approprié																
	Collecte des sacs de capture																
	Présence des appareils de mesure																
	Bonne disposition des appareils de mesure																

0 : Non satisfaisant ; 1 : Satisfaisant

Annexe 2 : Protocoles

	PROCEDURE
Institut de Recherche pour le Développement FRANCE French National Research Institute for Sustainable Development	**Extraction d'ADN selon la méthode LIVAK**

1-Matériel

1.1-Consommables

Tubes Eppendorf 1,5 ML/2 ML ; Cônes à filtres P10, P20, P100, P200 et P1000 ; Portoirs ; Gants ; Sopalin ; Piston à broyage.

1.2-Réactifs

1.6 ml 5M NaCl ; 5.48 g sucrose ; 1.57 g Tris ; 10.16 ml 0.5M EDTA ; 2.5 ml 20% SDS ; acétate de potasium ; Eau biologie moléculaire ; Ethanol absolu ; Ethanol 70 % ou eau de javel.

1.3-Préparation de la solution LIVAK

i) Faire le mélange : 1.6 ml 5M NaCl + 5.48 g sucrose + 1.57 g Tris + 10.16 ml 0.5M EDTA + 2.5 ml 20% SDS ; ii) compléter à 100 ml avec de l'eau stérile ; iii) faire des aliquotes de 5 ml et les garder à -20 °C.

2-Procédure

1. Chauffer le Livak à 65° pendant 15 min (jusqu'à ce qu'il soit transparent).
2. Mettre 100 µl de Livak dans chaque tube de 1.5 ml contenant le moustique, broyer et rincer le piston avec 100 µl de Livak. Transférer les tubes à 65°c
3. Incuber les échantillons sur la plaque chauffante 65°c pendant 30 min.
4. Après 30 min d'incubation, centrifuger pendant 1 min et ajouter 28 µl d'acétate de potassium (pipeter plusieurs fois pour bien mélanger)

5. Incuber les échantillons sur glace pendant 30 minutes.
6. Centrifuger à 13,000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Transférer le surnageant dans de nouveau tube Eppendorf® de 1.5 ml, faire attention à ne pas transférer le culot.
7. Ajouter 300 µl d'éthanol 100%, centrifuger à 13,000 rpm pendant 15 minutes at 4°C (bien placer les tubes dans la centrifugeuse).
8. Retirer délicatement le surnageant dans chaque tube (faire attention à ne pas verser le culot), Ajouter 100 µl d'éthanol glacé 70 % puis centrifuger à 13,000 rpm pendant 15 minutes à 4°C (bien placer les tubes dans la centrifugeuse).
9. Retirer délicatement le surnageant dans chaque tube (faire attention à ne pas verser le culot).
10. Laisser sécher les tubes à la température ambiante
11. Ré-suspendre le culot dans 100 µl d'eau stérile.
12. Conserver l'extrait d'ADN à -20°C.

3-Références

Livak, K.J. (1984). Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics* 107: 611-634.

	PROCEDURE
Institut de Recherche pour le Développement FRANCE French National Research Institute for Sustainable Development	**Identification des espèces d'*An. gambiae s.l.* par la technique de PCR classique**

1-Matériel

1.1.-Consommables

Tubes Eppendorf 1,5 ML/2 ML ; tubes PCR 500 µL ; cônes à filtres P10, P20, P100, P200 et P1000 ; portoirs réfrigérés ; sopalin ; gants ; thermocycleur ; erlenmeyer.

1.2-Réactifs

Eau biologie moléculaire ; tampon 10x ; TBE 10x ; poudre d'agarose ; alcool 70° ou eau de javel ; amorces ; taq polymérase (enzyme) ; dNTPs ; Mgcl2 ; SYBR I ; marqueur de poids moléculaire ; tampon de charge ; parafilm.

2-PCR

2.1-Milieu réactionnel

N° d'ordre	Réactifs	Con. initiales	Con. finales	Volume (µl) /échan.
1	H2O	-	-	17,95
2	Tampon + Mgcl2	10X (15 mM)	1X (1,5 mM)	2,5
3	DNTPs	5 mM	0,2 mM	1
4	Primer_UN	10 µM	5 µM	0,5
5	Primer_AG	10 µM	5 µM	0,5
6	Primer_AA	10 µM	5 µM	0,5
7	Primer_AM	10 µM	5 µM	0,5
8	Taq Polymérase	5 U/µl	0,25 U	0,05
Volume total	Aliquote	-	-	23,5
	ADN	-	-	1,5

2.2-Programme d'amplification

Etapes	Caractéristiques	Températures (°C)	Temps	Cycles
1	Dénaturation initiale	94	3 mn	1
2	Dénaturation	94	30 s	40
3	Hybridation	56	30 s	
4	Elongation	72	10 s	
5	Elongation finale	72	5 mn	1

3-Révélation sur gel d'agarose

3.1-Préparation du gel

Un gel de 1,5% est préparé selon la procédure suivante :

1 Peser 2,25 g d'agarose
2 Renverser la poudre dans un Erlenmeyer
3 Ajouter 150 ml du tampon TBE 1X
4 Homogénéiser l'ensemble
5 Placer le tout dans la micro-onde pendant 05 mn (s'assurer que la solution est devenue limpide)
6 Laisser refroidir et ajouter 02 µl de SYBR I
7 Mélanger puis renverser le tout dans une plaque contenant un peigne
8 Laisser le gel solidifier à la température ambiante

3.2-Migration

Après solidification du gel, le peigne est retiré, il est mis dans la cuve migration reliée à un générateur de tension. Ensuite :

1-Déposer une série de 2 µl du tampon de charge

2- Mélanger 8 µl du produit PCR au tampon de charge

3- Déposer le mélange dans un puits du gel

4- Déposer également dans un puits le marqueur de poids moléculaire

5- Placer le gel dans la cuve et laisser à 135 Volts pendant 1 heure.

4- Références

Scott *et al*., 1993: Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1993; 49(4):520-9.

	PROCEDURE **Identification d'*An. gambiae s.s.* et *An. coluzzii* par la technique de PCR classique**

1-Matériel

1.1-Consommables

Tubes Eppendorf 1,5 ML/2 ML ; tubes PCR 500 µL ; cônes à filtres P10, P20, P100, P200 et P1000 ; portoirs réfrigérés ; Sopalin ; gants ; thermocycleur ; erlenmeyer.

1.2-Réactifs

Eau biologie moléculaire ; Tampon 10x ; TBE 10x ; poudre d'agarose ; alcool 70 ° ou eau de javel ; amorces ; taq polymérase (enzyme) ; dNTPs ; Mgcl2 ; SYBR I ; marqueur de poids moléculaire ; tampon de charge ; parafilm.

2-PCR (réaction de polymérase en chaine)

2.1-Milieu réactionnel

N° d'ordre	Réactifs	Con. Initiales	Con. finales	Volume (µl) /échan.
1	H2O	-	-	14,
2	Tampon + Mgcl2	10X/15 mM	1X (1,5 mM)	2,5
3	Mgcl2	25 Mm	1 mM	1
4	dNTPs	5 mM	0,2 mM	1
5	Primer_R3	10 µM	7,5 µM	0,75
6	Primer_R5	10 µM	7,5 µM	0,75

7	Primer_Mop int	10 µM	15 µM	1,5
8	Primer_B/S int	10 µM	15 µM	1,5
	Taq Polymérase	5 U/µl	0,25 U	0,2
Volume total	Aliquote	-	-	23,5
	ADN	-	-	1,5

2.2-Programme d'amplification

Etapes	Caractéristiques	Températures (°C)	Temps	Cycles
1	Dénaturation initiale	94	3 mn	1
2	Dénaturation	94	30 s	28
3	Hybridation	63	30 s	
4	Elongation	72	45 s	
5	Elongation finale	72	5 mn	1

3-Révélation sur gel d'agarose

3.1-Préparation du gel

Un gel de 1,5% est préparé selon la procédure suivante :

1- Peser 2,25 g d'agarose
2- Renverser la poudre dans un Erlenmeyer
3- Ajouter 150 ml du tampon TBE 1X
4- Homogénéiser l'ensemble
5- Placer le tout dans la micro-onde pendant 05 mn (s'assurer que la solution est devenue limpide)
6- Laisser refroidir et ajouter 02 µl de SYBR I
7- Mélanger puis renverser le tout dans une plaque contenant un peigne
8- Laisser le gel solidifier à la température ambiante

3.2-Migration

Après solidification du gel, le peigne est retiré, il est mis dans la cuve migration reliée à un générateur de tension. Ensuite :

1- Déposer une série de 2 µl du tampon de charge

2- Mélanger 8 µl du produit PCR au tampon de charge

3- Déposer le mélange dans un puits du gel

4- Déposer également dans un puits le marqueur de poids moléculaire

5- Placer le gel dans la cuve et laisser à 135 Volts pendant 1 heure. (Veiller à ce que les bandes ne sortent pas du gel

4- Références

Favia *et al*., 2001: Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s*. **Insect Mol Biol.** 2001 Feb; 10(1):19-23

	PROCEDURE
Institut de Recherche pour le Développement FRANCE French National Research Institute for Sustainable Development	**Identification de *Plasmodium* chez *Anopheles* par la technique de la qPCR**

1-Matériel

1.1.-Consommables

Tubes Eppendorf® 1,5 mL/2 mL ; microplaque 96 puits ; platesealer ; cônes à filtres P10, P20, P100, P200 et P1000 ; gants ; portoirs réfrigérés ; sopalin ; thermocycleur.

1.2-Réactifs

Nuclease-Free Watter (H2O); 5 x Hot Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX); amorces (AB 18 et AB 19).

2-PCR (réaction de polymérase en chaine)

2.1-Milieu réactionnel

Etapes	Réactifs	Con. initiales	Con. finales	Vol./échan. (µL)
1	H2O	-	-	4,6
2	AB 18	5 µM	0,6 µM	1,2
3	AB 19	5 µM	0,6 µM	1,2
4	5x Hot Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)	5 x	1 x	2
Volume total	Volume aliquote	-	-	9
	AND	-	-	1

2.2-Programme d'amplification

Etapes	Conditions	Températures (°C)	Temps	Cycles
1	Dénaturation initiale	95	15 mn	1
2	Dénaturation	95	15 s	40
3	Hybridation/Elongation	58	30 s	
4	Courbe de dissociation et réassociation de l'ADN	95	15 s	1
		60	30 s	
		95	15 s	
5	Cooling	37	30 s	1

3- Références

Boissière *et al*., 2013: Application of a qPCR Assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon.

	PROCEDURE
Institut de Recherche pour le Développement FRANCE French National Research Institute for Sustainable Development	**Détection des mutations des gènes ace 1 et kdr d'*An. gambiae s.l.* par la technique de la qPCR**

1-Matériel

1.1-Consommables

Tubes Eppendorf 1,5 ML/2 ML ; tubes PCR 200 µL ou microplaques de 96 puits ; cônes à filtres P10, P20, P100, P200 et P1000 ; portoirs réfrigérés ; sopalène ; gants ; thermocycleur.

1.2-Réactifs

Eau stérile ; alcool 70°; amorces ; sonde ; sensiFAST Genotyping Lo-ROX Mix.

2-PCR (réaction de polymérase en chaine)

2.1-Milieu réactionnel

Etapes	Réactifs	Con.initiales	Con. finales	Volumes/échan. (µL)
1	H2O	-	-	3,875
2	Sonde/amorces			0,125
3	Sensifast			5
Volume total	Volume aliquote			9
	ADN			1

2.2-Programmes d'amplification

2.2.1-Programme d'amplification du gène *ace1*

Etapes	Conditions	Températures (°C)	Temps	Cycles
1	Dénaturation initiale	95	10 mn	1
2	Dénaturation	95	1 s	55
3	Hybridation/Elongation	60	60 s	

2.2.1-Programme d'amplification du gène *kdr*

Etapes	Conditions	Températures (°C)	Temps	Cycles
1	Dénaturation initiale	95	10 mn	1
2	Dénaturation	95	10 s	45
3	Hybridation/Elongation	60	45 s	

3- Références

Essandoh *et al.*, 2013: Acetylcholinesterase (*ace-1*) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae s.s.* and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana, Malaria Journal 2013, 12:404

Bass *et al.*, 2007: Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. Malaria Journal 2007, 6:111.

Annexe 3

Quantifying and characterizing hourly human exposure to malaria vectors bites in rural southwest Burkina Faso

Soma D.D[1,2,3§*], **Zogo B**[3,4,5§], Taconet P[1,3], Somé A[1], Coulibaly S[1], Baba-Moussa L[5], Ouédraogo G.A[2], Koffi A[4], Pennetier C[3,4], Dabiré K.R[1], Moiroux N[1,3]

1 Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

2 Université Nazi Boni, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

3MIVEGEC, Univ. Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

4 Institut Pierre Richet (IPR), Bouaké, Côte d'Ivoire

5 Université d'Abomey Calavi, Abomey-Calavi, Benin

§ These authors contributed equally to this work

Abstract

Background: To sustain the efficacy of malaria vector control, WHO recommend the combination of proven effective tools. Some data are critical to help design and implement additional strategies in any setting. One of these is information on when and where transmission occurs. However to date, very few studies have quantified the behavioural interactions between humans and *Anopheles* vectors. Here, we characterized residual transmission in a rural area of Burkina Faso where long lasting insecticidal nets (LLIN) are widely used.

Methods: We analysed data on both human and malaria vectors behaviours from 27 villages to measure hourly human exposure to vector bites in dry and rainy season using mathematical models. We estimated the protective efficacy of LLINs and characterised where (indoors vs. outdoors) and when (time of the night) both LLIN users and non-users were exposed to Anopheles bites.

Results: The percentage of the population who declared sleeping under an LLIN the previous night was very high in the three seasons, with an average LLIN use ranging from 92.43% to 99.89%. The use of LLIN provided > 80% protection against exposure to vector bites. The

proportion of exposure for LLIN users was 29-57% after 05:00 and 0.05-12% before 20:00. More than 80% of exposure occurred indoors for LLIN users and the estimate reached 90% for children under five years old in the dry cold season.

Conclusions: This study supports the current use of LLIN as a primary malaria vector control tool. It also underscores the need to complement LLIN with indoor-implemented measures such as IRS and/or house improvement to effectively combat malaria in the rural area of Diébougou. Furthermore, malaria elimination programmes would also require surveillance of resistance mechanisms, strategies that target outdoor biting vectors and effective drugs to be successful in the area.

Keywords: Diébougou, LLIN, *Anopheles*, humans, behaviours, indoors, residual transmission

Background

The distribution of long-lasting insecticidal nets (LLINs) is a core intervention for malaria control in Burkina-Faso. Scaling-up of coverage with LLIN in sub-Saharan Africa has been very successful between 2000 and 2015 during which malaria morbidity and mortality have dropped considerably [1]. Unfortunately, this significant progress is stalling or even reversing in some countries such as Burkina-Faso. This country is one of the sixteen (16) in the world that saw an increase in malaria burden from 2016 to 2017 [2]. The recent increase in prevalence and strength of pyrethroid resistance in malaria vectors may be a major contributing factor for this trend [3–5]. Another possible cause is the development of behavioural resistance in vector populations[6–8]. In sub-Saharan Africa, there have been many reports of changes in vector species and/or vector biting behaviors to avoid contact with LLIN [6–8]. Such changes in vector populations are considered by many specialists as an important threat to indoor control strategies such as LLIN [9, 10].

To sustain the efficacy of vector control, WHO recommend the combination of proven effective tools [11]. At present, there are a number of tools available and many others on the horizon that can potentially be combined with LLIN [12, 13]. However, national malaria control programs are now facing challenges to design effective additional control strategies because malaria epidemiology vary considerably between and even within countries [14]. Some data are critical to help design and implement additional strategies in any setting. One of these is information

on when and where transmission occurs. Entomological data alone are unable to address this question but need to be combined with the behaviours of local human populations in order to measure human exposure to malaria vectors [15–17]. Unfortunately, only few studies to date have quantified and characterized human exposure to malaria vectors bites by analyzing data on both human and vector behaviors [17]

The present work is a baseline study conducted in the Diébougou area, southwest Burkina Faso, to quantify the behavioural interactions between humans and *Anopheles* mosquitoes. The results of the entomological surveys were reported previously [18]. The work is part of a large randomized control trial designed to investigate whether the combination of LLINs with other vector control tools can provide additional protection over malaria cases and transmission. The trial was carried out in Southwest Burkina Faso where malaria vectors shows high levels of pyrethroid resistance.

Materials and methods

This study was conducted in 27 villages located in the Diébougou health district, southwest Burkina Faso in order to collect baseline data for a randomized controlled trial (Fig. 1). These villages were selected based on geographical (distance between two villages higher than 2 km and accessibility during the rainy season) and demographic (an average population size of 200-500 inhabitants) criteria [18]. The climate in the study area is tropical with one dry season from October to April (including a cold period from December to February and a hot period from March to April) and one rainy season from May to September. Average daily temperature amplitudes were 18-36°C, 25-39°C and 23-33°C in dry cold, dry hot and rainy season, respectively. The mean annual rainfall is 1200 mm. The natural vegetation is dominated by wooded savannah dotted with clear forest gallery. The main economic activity is agriculture (cotton growing and cereals) followed by artisanal gold mining and production of coal and wood [19, 20].

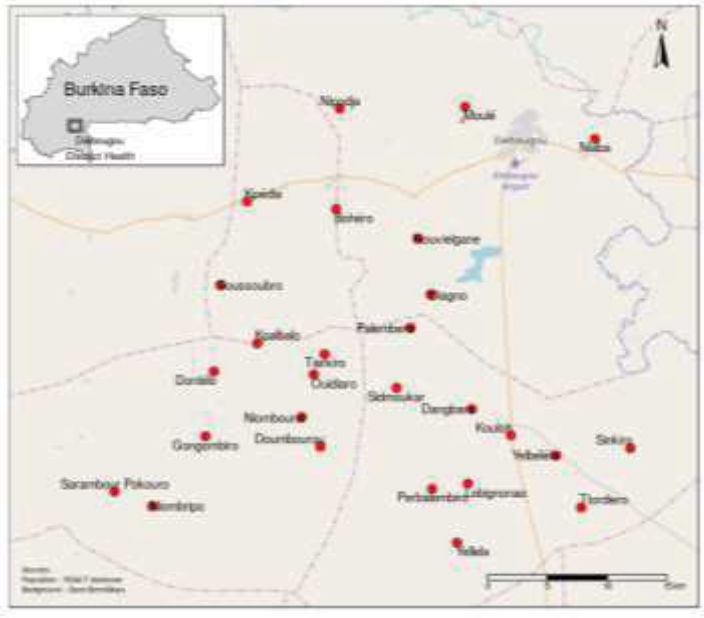

Fig 1. Map of the study area and villages surveyed

We conducted three entomological surveys in the dry cold (January 2017), dry hot (March 2017) and rainy seasons (June 2017), respectively. During each survey, we collected human landing mosquitoes both indoors and outdoors from 17:00 h to 09:00 h at 4 houses per villages for one night [18]. All the mosquitoes collected were morphologically identified [21,22] and *Anopheles spp.* mosquitoes were subsequently identified to the species level by polymerase chain reaction [23–25]. Detailed descriptions of the methods used are provided in our previous publication [18]. Overall, *Anopheles funestus s.s* was the main malaria vector in the study area during the dry cold season [18]. During the dry hot and rainy seasons, *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae s.s* were the dominant species. The mean endophagy rate (ER) of malaria vectors was 63.23%, 50.18% and 57.18% during the dry cold, dry hot and rainy seasons, respectively[18].

In order to obtain appropriate data regarding relevant human behaviours, we surveyed 3048 and 5901 randomly selected households in dry (February to April 2017) and rainy (September 2017) seasons, respectively (corresponding to an average of 219 and 113 households per village). We randomly selected among people usually leaving in each selected households, 3 persons (maximum) belonging to each of the 3 following age groups: 0-5 years old, 6-17 years old and ≥ 18 years old. We asked the head of the household the time at which each selected person (1) entered and exited his own house the night preceding the survey and (2) the time each LLIN user entered and exited his sleeping space the night preceding the survey [16]. In order to know the relative weight of each age group in the population, we recorded the number of individuals

belonging to these groups in each households. A total of 3048 and 5901 individuals were surveyed representing 35.12% and 67.98% of the 27 villages' population according to a census carried out by our team in 2016 [18]. The human behavioural surveys were carried out using tablets running ODK collect forms.

During the two surveys, we surveyed 8949 individuals (3048 in dry season and 5901 in rainy season) living in randomly selected households to obtain appropriate answers regarding relevant human behaviors. We used data from the human and *Anopheles spp.* behavioural surveys to measure the human exposure to *Anopheles spp*. bites in dry season (cold and hot) and rainy season using mathematical models as previously described in Killeen *et al*. [15] and Moiroux *et al*. [16]. We estimated the average *true* personal protection of using an LLIN (i.e. the proportion of exposure to all bites that would otherwise occur both indoors and outdoors that is prevented by using an LLIN), as well as the proportion of exposure which occurred indoors for LLIN users either accounting for the personal protection provided by net use or ignoring it to compare with available estimates for unprotected people. Exposure when sleeping under an LLIN was assumed to be reduced by 92% [16]. Moreover, to characterize residual transmission, we calculated the proportion of exposure occurring before 20:00 and after 5:00 (i.e. the times preceding and following the period when most of LLIN user are protected).

All the exposure values were calculated at the village and area levels, for each age group as well as for the total population. Because the number of individuals sampled per age group in each household is the same, the relative proportions of each age group in our sample are equal and do not reflect the relative proportions in the population. We therefore predicted the average number of people being indoors, outdoors and under nets at the population levels by summing weighted numbers of people of each age group. For these calculation and to produce figures, we used an R [26] package named "biteExp" developed by our team.

Results

The average declared LLIN use rate was very high in the study population ranging from 95.49% in the dry season to 97.82% in the rainy season (Table 1). The declared LLIN use rate was higher in the 0-5 years old age group (97.88% in the dry season to99.89% in the rainy season) compared to children aged 6-17 years old (95.37% in the dry season to99.38% in the rainy season) and adults (92.43% in the dry season to 93.96% in the rainy season) (Table 1). However,

we found that the LLIN use rate varied among villages (see Additional file 1) with the lowest rates observed in Kpédia (69.23%), Palembera (71.73%), Diagnon (78.78%) and Bohéro (78.94%) in the adults group during the dry season. During the rainy season, only one village (Bohéro, 76.71%) showed a use rate lower than 80%. In the other villages LLIN use rates ranged from 80 to 100% whatever the season.

Figure 2 shows humans and *Anopheles* behavior profiles as well as average hourly exposure and prevented exposure to bites for LLIN users in our study area.

The majority of the population went indoors from 20:00 in both dry and rainy seasons (Figs. 2A, 2B and 2C). These populations woke up around 05:00 in the early morning in all seasons (Figs. 2A, 2B and 2C).). Most of the total exposure to *Anopheles* bites occurred indoors (> 96%, Table 1) but was largely preventable by using of LLIN (Figs. 2D, 2E and 2F). Indeed, LLIN were estimated to provide average 'true' personal protection against 85.09%, 81.10% and 83.64% of exposure in dry cold season, dry hot season and rainy season, respectively (Table 1). The peak of exposure for users occurred indoors between 05:00 and 06:00 just before sunrise whatever the season (Figs.2D, 2E and 2F). An average, between 29 and 57% of the exposure of LLIN users occurred after wake up (after 5:00) depending on age groups. Early bites (before 20:00) represented less than 13% of the exposure of LLIN users (Table 1).

Table 1 Average LLIN use rates, true average protection efficacy of LLINs against transmission and proportio
morning exposure to *Anopheles* bites for both LLIN users and non-users in 27 villages of the Diébougou area

Season	Age (years)	LLIN use rate (%[min-max])	True average LLIN personal protection efficacy (% [min-max])	Exposure indoors (%[min-max])		Exposure b (%[min-ma
				LLIN users	Non-users	LLIN users
Dry cold season	**18+**	92.43 [69-100]	83.52 [0-92]	79.89 [0-100]	96.68 [0-100]	0.05 [0-0.13
	6 to 17	95.37 [71-100]	83.89 [0-92]	86.05 [0-100]	97.75 [0-100]	0.58 [0-1.79
	0 to 5	97.88 [81-100]	86.99 [0-92]	91.99 [0-100]	98.95 [0-100]	3.98 [0-100
	population	95.49 [77-100]	85.09 [0-92]	86.33 [0-100]	97.96 [0-100]	1.67 [0-100
Dry hot season	**18+**	92.43 [69-100]	78.09 [0-92]	69.64 [0-100]	93.34 [0-100]	3.36 [0-24]
	6 to 17	95.37 [71-100]	79.99 [0-92]	83.51 [0-100]	96.70 [0-100]	4.58 [0-25]
	0 to 5	97.88 [81-100]	83.98 [0-92]	90.70 [0-100]	98.51 [0-100]	11.50 [0-10
	population	95.49 [77-100]	81.10 [0-92]	81.47 [0-100]	96.49 [0-100]	6.60 [0-100
Rainy season	**18+**	93.96 [76-100]	79.70 [52-92]	75.53 [10-100]	95.03 [59-100]	10.44 [0-24
	6 to 17	99.38 [95-100]	82.65 [59-92]	82.08 [42-100]	96.89 [90-100]	11.19 [0-24
	0 to 5	99.89 [98-100]	87.88 [79-92]	89.01 [71-100]	98.66 [96-100]	12.18 [0-42
	population	97.82 [91-100]	83.64 [63-92]	81.45 [22-100]	96.96 [78-100]	11.17 [0-24

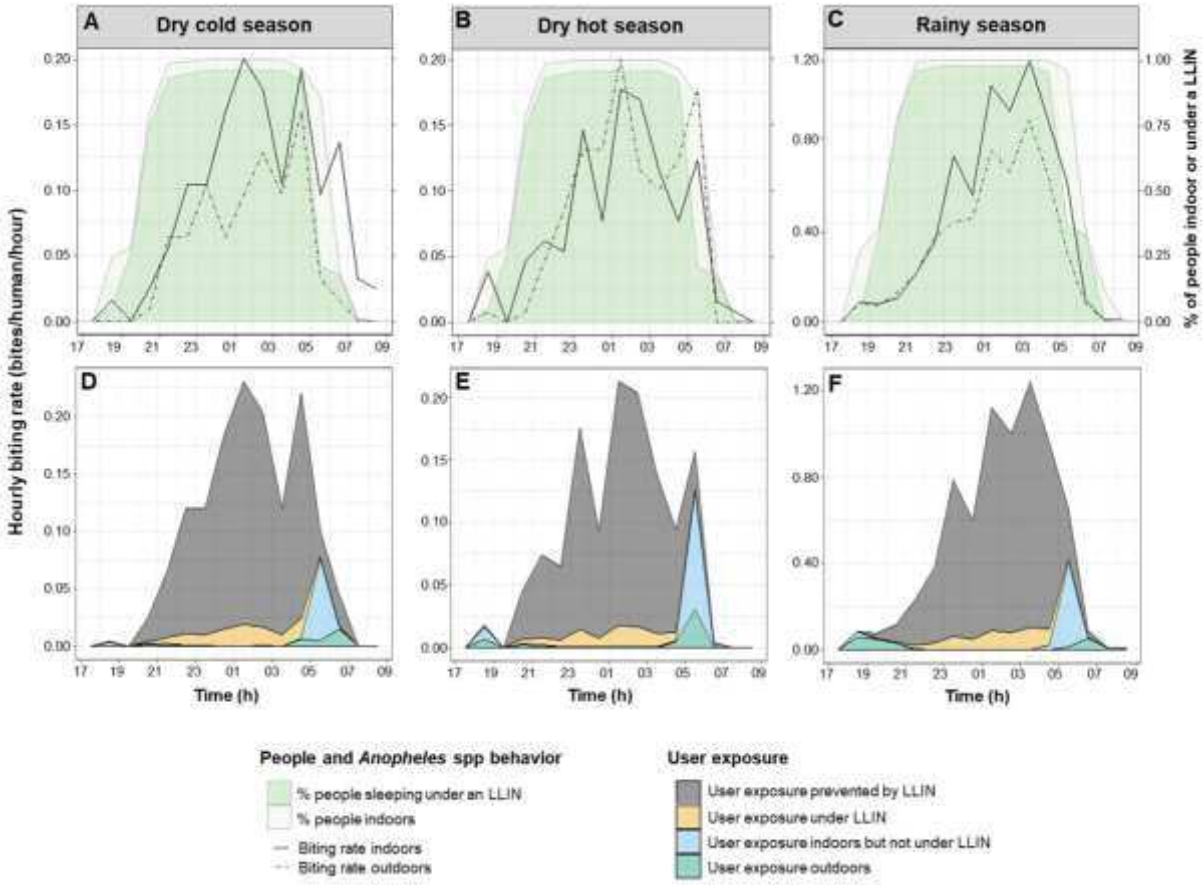

Fig. 2 Hourly human and *Anopheles spp* behavior (A, B, C) and hourly exposure to bites of LLIN users (D, E, F), Burkina Faso

Human behavioural data in panel A and B are the same (only one dry season survey) but plotted with different entomological data.

Discussion

The average declared LLIN use rate was very high (>95%) in all age group of our study population. The LLIN use rate was slightly higher in children under five years of age than the rest of the population. This finding is consistent with results from a multi-country analysis that revealed that the most vulnerable groups are preferentially protected by LLIN in sub-Saharan Africa [27]. At the village level, the use rate rarely fall under 80%, being consistently higher than the nationwide LLIN use value of 67% published by WHO in 2017 [28]. This may be explained by the fact that the study was conducted approximately 6 months after a wide LLIN distribution. However, our reported LLIN use may be overestimated because it was based on

self-reported survey questions, the most commonly used method to assess bednet use [29]. To more accurately estimate LLIN use, future studies quantifying human exposure to mosquito bites should consider using other measurement methods such as electronic monitoring devices [30, 31].

This study shows that the overall protective efficacy of LLINs against vector bites in the rural area of Diébougou was high (80-85%) during the three seasons. Our estimates for LLIN personal efficacy were comparable with those found in Benin (80% and 87%) [16] but were higher than those reported elsewhere such as Kenya (51%) [32] and Tanzania (70%, 59% and 38%) [15, 33]. Our results support strongly the use of LLIN as a primary malaria vector control tool in the area. Nevertheless, the level of malaria transmission and endemicity is high in the Diébougou area [18] indicating a gap in protection despite high use and protective efficacy of LLINs.

We estimate that 29-57% of exposure to *Anopheles* bites of LLIN users occurred after 5:00 and 0.05-12% occurred before 20:00 when most of users are awake. The proportion of exposure for LLIN users has been higher in the late part of the morning than in the early part of the evening in some settings while the opposite trend has been observed in other settings [15, 16, 34, 35]. In our study area, over 80% of human exposure to vector bites occurred indoors for LLIN users. For children under five years who use LLINs, the proportion of exposure occurring indoors reached 90%. These results would suggest that adding other indoor intervention such as indoor residual spraying (IRS) to LLINs might be effective to reduce malaria transmission in the rural area of Diébougou. In 2017, 28 countries in the world have implemented IRS in combination with LLINs to combat malaria [2]. IRS contributed to an estimated 10 (5–14) % of the reduction in malaria burden achieved recently [36]. When used together, IRS and LLINs are expected to target vectors at different stages of their gonotrophic cycle using insecticides with different mode of action. However, trials assessing the impact of the combination IRS+LLIN over LLIN use alone have yielded conflicting results [37–42]. There is compelling evidence that even full coverage of effective measures within houses would be insufficient to suppress transmission of malaria in Africa [43].

House improvement is another indoor measure which needs careful consideration and research. House improvement has been strongly associated with reduced malaria transmission and disease in many studies [44–46]. The main house improvement interventions studied are closed

eaves, closed ceilings, window screens and metal-roof houses as opposed to eaves, ceilings, windows openings and thatched-roof houses. They protect against malaria by providing physical barriers that prevent vectors from entering houses and can reduce vector survivorship [44, 47]. Nonetheless, there is compelling evidence that even full coverage of effective measures within houses would be insufficient to suppress transmission of malaria in Africa [43].

In this study, we found evidence that a significant proportion of LLIN users exposure to vector bites occurred outdoors (ranging from 9.48% to 30.36%), with the highest estimate recorded in adults (over the age of 18 years old) during the dry hot season. Many studies conducted in various areas of Africa have reported similar or even higher estimates of exposure occurring outdoors [15, 33, 35, 48]. Recently, a systematic review has identified Burkina-Faso along with Eritrea, Ethiopia, Gabon, and Tanzania as countries with high levels of outdoor vector biting [10]. Our results, however, do not fully support this finding since we show that both LLIN users and LLIN non users are far more exposed to vector bites indoors than outdoors in the study area. Nevertheless, strategies targeting outdoor bites would probably be required to achieve malaria elimination in the area.

Almost all the existing indoor vector control strategies face two important challenges. First, they select for physiological resistance in vector populations because there are essentially based on synthetic chemical. Second, they can induce behavioral changes in vector populations which could result in a reduced contact with interventions [49]. Therefore, there is a need to monitor these resistance mechanisms after the deployment of strategies to prevent their wide distribution. Furthermore, integrating many vector control strategies (indoor and outdoor tools) with effective drugs would be necessary to target all vectors and to eliminate malaria in the rural area of Diébougou and more generally in sub-Saharan Africa.

Conclusions

This study shows that the proportion of the population of the rural area of Diébougou who reported using an LLIN the previous night was very high. The use of LLIN prevented more than 80% of *Anopheles* bite exposure. Nevertheless, LLIN users are still exposed to vector bites which occurred mostly indoors. Therefore, complementary strategies that target indoor biting vectors in combination with LLIN should be prioritized to control malaria in the area. However,

as vectors are able to adopt a wide range of behaviours successful malaria elimination programmes should also integrate monitoring programs to detect the development of new behavioural response to indoor measure. Moreover, as it is predictable that outdoor biting phenotypes will be selected, it urges to also evaluate and implement outdoor measures.

Authors' contributions

NM, DKR and SDD conceived and designed the study. SDD and CS collected the data. NM and SDD analyzed the data. SDD and ZB drafted the manuscript. NM, CP, TP, SA, BML, OGA, KA and DKR reviewed/consulted the manuscript; all authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

We acknowledge the Burkina Faso Ministry of Health, particularly Dr. Dembélé Henri and the local medical team who facilitated data collection. We thank all the villagers and local authorities for their kind collaboration throughout the study. Special thanks to Mr. Maiga Issouf for his strong commitment during human behavioural surveys. We are very grateful to Mr. Dahunto Amal for his substantial contributions and collaboration. We thank all the IRSS field staff for their assistance.

References

1. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, *et al*. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature. 2015;526:207–11.

2. WHO. World malaria report 2018. 2018. http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018.

3. Dabiré KR, Diabaté A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouédraogo J-B, *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.

4. Toé KH, Jones CM, N'fale S, Ismai HM, Dabiré RK, Ranson H. Increased pyrethroid

resistance in malaria vectors and decreased bed net effectiveness Burkina Faso. Emerg Infect Dis. 2014;20:1691–6.

5. Toé KH, N'Falé S, Dabiré RK, Ranson H, Jones CM. The recent escalation in strength of pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzi* in West Africa is linked to increased expression of multiple gene families. BMC Genomics. 2015;16:1–11.

6. Ojuka P, Boum Y, Denoeud-Ndam L, Nabasumba C, Muller Y, Okia M, *et al*. Early biting and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles* might compromise the effectiveness of vector control intervention in Southwestern Uganda. Malar J. 2015;14:1–8.

7. Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin 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;206:1622–9.

8. Fornadel CM, Norris LC, Glass GE, Norris DE. Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern Zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:848–53.

9. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: A worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. Trends Parasitol. 2016;32:187–96. doi:10.1016/j.pt.2015.11.010.

10. Sherrard-Smith E, Skarp JE, Beale AD, Fornadel C, Norris LC, Moore SJ, *et al*. Mosquito feeding behavior and how it influences residual malaria transmission across Africa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;:201820646.

11. WHO. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. World Health Organization. 2012;:13. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44846/9789241564472_eng.pdf.

12. Killeen GF, Tatarsky A, Diabate A, Chaccour CJ, Marshall JM, Okumu FO, *et al*. Developing an expanded vector control toolbox for malaria elimination. BMJ Glob Heal. 2017;2:e000211.

13. Barreaux P, Barreaux AMG, Sternberg ED, Suh E, Waite JL, Whitehead SA, *et al*.

Priorities for broadening the malaria vector control tool kit. Trends Parasitol. 2017;33:763–74.

14. Kelly-Hope LA, McKenzie FE. The multiplicity of malaria transmission: A review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. Malaria Journal. 2009;8:19.

15. Killeen GF, Kihonda J, Lyimo E, Oketch FR, Kotas ME, Mathenge 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;6:1–10.

16. Moiroux N, Damien GB, Egrot M, Djenontin A, Chandre F, Corbel V, *et al*. Human exposure to early morning *Anopheles funestus* biting behavior and personal protection provided by long-lasting insecticidal nets. PLoS One. 2014;9:8–11.

17. Monroe A, Moore S, Koenker H, Lynch M, Ricotta E. Measuring and characterizing night time human behaviour as it relates to residual malaria transmission in sub‐Saharan Africa : a review of the published literature. Malar J. 2019;:1–12. doi:10.1186/s12936-019-2638-9.

18. Soma DD, Zogo BM, Somé A, Tchiekoi BN, Hien DF de S, Pooda HS, *et al*. *Anopheles* bionomic , insecticide resistance and malaria transmission in southwest Burkina Faso : a pre-intervention study. BioRxiv Prepr. 2019.

19. INSD. Tableau de bord économique et social 2014 de la région du Sud Ouest. 2015.

20. INSD. Enquête nationale sur le secteur de l'orpaillage (ENSO). 2017.

21. Mattingly PF, Rageau J, La CA, Des F, Du M, Xii SA. Contributions de la faune des moustiques du Sud-Est Asiatique. XII. Contrib Am Entomol Inst. 1973;7.

22. Gillies MT and Coetzee M. A supplement to the *Anophelinae* of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). South African Inst Med Res. 1987;:143.

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. Cohuet A, Simard F, Berthomieu A, Raymond M, Fontenille D WM. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. Mol Ecol Notes. 2002;2:498–500.

25. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar J. 2008;7:163. doi:10.1186/1475-2875-7-163.

26. The R Development Core Team. R : A Language and Environment for Statistical Computing. 2008;2:1–2547. http://www.gnu.org/copyleft/gpl.html.

27. Olapeju B, Choiriyyah I, Lynch M, Acosta A, Blaufuss S, Filemyr E, *et al*. Age and gender trends in insecticide-treated net use in sub-Saharan Africa: a multi-country analysis. Malar J. 2018;17:423.

28. WHO. World Malaria Report 2017. 2017. doi:10.1071/EC12504.

29. Krezanoski PJ, Bangsberg DR, Tsai AC. Quantifying bias in measuring insecticide-treated bednet use: meta-analysis of self-reported vs objectively measured adherence. J Glob Health. 2018;8:010411.

30. Koudou BG, Malone D, Hemingway J. The use of motion detectors to estimate net usage by householders, in relation to mosquito density in central Cote d'Ivoire: Preliminary results. Parasites and Vectors. 2014.

31. Krezanoski PJ, Santorino D, Agaba A, Dorsey G, Bangsberg DR, Carroll RW. How are insecticide-treated bednets used in Ugandan households? A comprehensive characterization of bednet adherence using a remote monitor. Am J Trop Med Hyg. 2019;00:1–8.

32. Cooke MK, Kahindi SC, Oriango RM, Owaga C, Ayoma E, Mabuka D, *et al*. 'A bite before bed': exposure to malaria vectors outside the times of net use in the highlands of western Kenya. Malar J. 2015;14:259.

33. Geissbühler Y, Chaki P, Emidi B, Govella NJ, Shirima R, Mayagaya V, *et al*.

Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. Malar J. 2007;6:126.

34. Kamau A, Mwangangi JM, Rono MK, Mogeni P, Omedo I, Midega J, *et al*. Variation in the effectiveness of insecticide treated nets against malaria and outdoor biting by vectors in Kilifi, Kenya. Wellcome open Res. 2017;2:22.

35. 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. doi:10.1186/1475-2875-10-80.

36. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, *et al*. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature. 2015;526:207–11.

37. West PA, Protopopoff N, Wright A, Kivaju Z, Tigererwa R, Mosha FW, *et al*. Indoor residual spraying in combination with insecticide-treated nets compared to insecticide- treated nets alone for protection against malaria : A cluster randomised trial in Tanzania. PLOS Med. 2014;11:1–12.

38. Protopopoff N, Mosha JF, Lukole E, Charlwood JD, Wright A, Mwalimu CD, *et al*. Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquitoes: a cluster, randomised controlled, two-by-two fact. Lancet. 2018;:1–12. doi:10.1016/S0140-6736(18)30427-6.

39. Kafy HT, Ismail BA, Mnzava AP, Lines J, Abdin MSE, Eltaher JS, *et al*. Impact of insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* on malaria incidence and prevalence in Sudan and the costs of mitigation. Proc Natl Acad Sci. 2017;114:E11267–75.

40. 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;12:617–26.

41. Pinder M, Jawara M, Jarju LBS, Salami K, Jeffries D, Adiamoh M, *et al*. Efficacy of indoor residual spraying with dichlorodiphenyltrichloroethane against malaria in Gambian communities with high usage of long-lasting insecticidal mosquito nets: A cluster-randomised controlled trial. Lancet. 2015;385:1436–46.

42. Loha E, Deressa W, Gari T, Balkew M, Kenea O, Solomon T, *et al*. Long-lasting insecticidal nets and indoor residual spraying may not be sufficient to eliminate malaria in a low malaria incidence area: results from a cluster randomized controlled trial in Ethiopia. Malar J. 2019;18:141.

43. World Health Organization. Control of residual malaria parasite transmission. 2014.

44. Tusting LS, Ippolito MM, Willey BA, Kleinschmidt I, Dorsey G, Gosling RD, *et al*. The evidence for improving housing to reduce malaria: A systematic review and meta-analysis. Malaria Journal. 2015.

45. Rek JC, Alegana V, Arinaitwe E, Cameron E, Kamya MR, Katureebe A, *et al*. Rapid improvements to rural Ugandan housing and their association with malaria from intense to reduced transmission: a cohort study. Lancet Planet Heal. 2018.

46. Killeen GF, Govella NJ, Mlacha YP, Chaki PP. Suppression of malaria vector densities and human infection prevalence associated with scale-up of mosquito-proofed housing in Dar es Salaam, Tanzania: re-analysis of an observational series of parasitological and entomological surveys. Lancet Planet Heal. 2019;3:e132–43.

47. Lindsay SW, Jawara M, Mwesigwa J, Achan J, Bayoh N, Bradley J, *et al*. Reduced mosquito survival in metal-roof houses may contribute to a decline in malaria transmission in sub-Saharan Africa. Sci Rep. 2019;9:7770.

48. Huho B, Briët O, Seyoum A, Sikaala C, Bayoh N, Gimnig J, *et al*. Consistently high estimates for the proportion of human exposure to malaria vector populations occurring indoors in rural Africa. Int J Epidemiol. 2013;42:235–47.

49. Lies Durnez and Marc Coosemans. Residual transmission of malaria: An old issue for new approaches. In: *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Intech Open Science; 2013. p. 671–704. doi:http://dx.doi.org/10.5772/55925.

Anopheles bionomics, insecticide resistance and malaria transmission in southwest Burkina Faso: a pre-intervention study. Plos one (Under review)

Dieudonné Diloma Soma[1,2,3]*, **Barnabas Mahugnon Zogo**[3,4,5], Anthony Somé[1,3], Bertin N'Cho Tchiekoi[3,4], Domonbabele François de Sales Hien[1], Hermann Sié Pooda[1,6], Sanata Coulibaly[1], Jacques Edounou Gnambani[1], Ali Ouari[1], Karine Mouline[1,3], Amal Dahounto[1,3], Georges Anicet Ouédraogo[2], Florence Fournet[3], Alphonsine Amanan Koffi[4], Cédric Pennetier[3,4], Nicolas Moiroux[1,3§], Roch Kounbobr Dabiré[1§]

1 Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

2 Université Nazi Boni, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

3 MIVEGEC, Univ. Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

4 Institut Pierre Richet (IPR), Bouaké, Côte d'Ivoire

5 Université d'Abomey Calavi, Abomey-Calavi, Benin

6 Université de Dédougou, Dédougou, Burkina Faso

§ These authors contributed equally to this work

*Corresponding author

Email: dieusoma@yahoo.fr (DDS)

Abstract

Background: Twenty-seven villages were selected in southwest Burkina Faso to implement new vector control strategies in addition to long lasting insecticidal nets (LLINs) through a Randomized Controlled Trial (RCT). We conducted entomological surveys in the villages during the dry cold season (January 2017), dry hot season (March 2017) and rainy season (June 2017) to describe malaria vectors bionomics, insecticide resistance and transmission prior to this trial.

Methods: We carried out hourly catches (from 17:00 to 09:00) inside and outside 4 houses in each village using the Human Landing Catch technique. Mosquitoes were identified using morphological taxonomic keys. Specimens belonging to the *Anopheles gambiae* complex and

Anopheles funestus Group were identified using molecular techniques as well as detection of *Plasmodium falciparum* infection and insecticide resistance target-site mutations.

Results: Eight *Anopheles* species were detected in the area. *Anopheles funestus s.s* was the main vector during the dry cold season. It was replaced by *Anopheles coluzzii* during the dry hot season whereas *An. coluzzii* and *An. gambiae s.s.* were the dominant species during the rainy season. Species composition of the *Anopheles* population varied significantly among surveys. All insecticide resistance mechanisms (*kdr-w, kdr-e* and *ace-1* target site mutations) investigated were found in each members of the *An. gambiae* complex but at different frequencies. We observed early and late biting phenotypes in the main malaria vector species. Entomological inoculation rates were 0.087, 0.089 and 0.375 infected bites per human per night during dry cold season, dry hot season and rainy season, respectively.

Conclusion: The entomological indicators of malaria transmission were high despite the universal coverage with LLINs. We detected early and late biting phenotypes in the main malaria vector species as well as physiological insecticide resistance mechanisms. These vectors might mediate residual transmission. These data highlight the need to develop complementary tools in order to better control resistant malaria vectors and to monitor insecticide resistance.

Keywords**:** Residual transmission, *Anopheles funestus* Group, randomized control trial, LLINs, Burkina Faso

Introduction

The World Health Organization (WHO) has reported 219 million malaria cases and 435 000 deaths worldwide in 2017 [1]. Significant progress has been made in the era of malaria control and elimination between 2000 and 2017 in all regions of the world [1]. The number of malaria cases worldwide has decreased by 62% between 2000 and 2015 but seems to rebound since 2016 [1–3]. Sub-Saharan Africa accounted for about 92% of cases and deaths in 2017 [1]. In 2017, the health ministry of Burkina Faso recorded 11.9 million cases and 4144 deaths attributed to malaria [4].

Malaria control is mainly based on symptomatic and preventive treatments (with artemisinin-based combination therapies: ACTs) and vector control. Vector control aims at reducing malaria transmission by targeting the indoor biting *Anopheles* mosquitoes that transmit *Plasmodium* parasites when coverage is universal. Core vector control measures rely mostly on the mass distribution of long-lasting insecticidal nets (LLINs) and high coverage of indoor residual spraying (IRS), reduce the risk of malaria infection by targeting indoor biting mosquitoes [3]. It was estimated that LLINs have contributed to 68% of the decline in malaria cases observed between 2000 and 2015 [5] despite moderate use rates in Tanzania (32.8%) and Burkina Faso (44.1%) [6,7]. However, the emergence of physiological [8–10] and behavioral [11,12] insecticide resistance mechanisms in *Anopheles* mosquitoes, as observed in most parts of Africa, could compromise the effectiveness of LLINs and explains the recent rebound in malaria cases. Consequently, there is an urgent need for increasing or complementing the protection provided by the LLINs. Complementary strategies exists but before being included into strategic plans by national malaria control programs (NMCPs), supported by international donors and implemented in endemic countries, they need to be evaluated through rigorous and independent process [13]. In this context, Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Institut Pierre Richet (IPR) have been funded to conduct the REACT (Gestion de la REsistAnce aux inseCTicides au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire) project to evaluate in Burkina Faso and Côte d'Ivoire four complementary strategies to LLINs trough a randomized controlled trial (RCT). These strategies included: i) larviciding with *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) to target immature stages of *Anopheles* species, ii) Indoor residual spraying (IRS) with pirimiphos-methyl to target endophilic malaria vectors, iii) information, education, community (IEC) to improve LLINs use iv) ivermectin administration to animals, a One health approach to tackle zoophagic behavior of malaria vectors and to improve animal health. Entomological surveys were conducted to describe malaria vectors bionomics, insecticide resistance and transmission prior to the implementation of the RCT.

Materials and methods

Study site and design

The study was conducted in the Diébougou health district located in southwest Burkina Faso. The natural vegetation is mainly wooded savannah dotted with clear forest gallery. The climate is tropical with two seasons: one dry season from October to April and one rainy season from May to September. The average annual rainfall is about 1200 mm. The dry season is “cold” from December to February (with average minimal and maximal temperatures of 18°C and 35°C, respectively) and “hot” from March to April (with average minimal and maximal temperatures of 25°C and 40°C, respectively). Agriculture (cotton growing and cereals)is the main economic activity in the area, followed by artisanal gold mining and production of coal and wood [14,15]. The study took place in 27 villages that were selected considering accessibility during the rainy season, a size of 200-500 inhabitants per village and a distance between two villages higher than two kilometers. According to a census carried out by our team in August 2016 one month after a universal distribution by the NMCP, the LLIN coverage (considering a target of 1 LLIN per 1.8 inhabitants) was 92.7% with 8680 inhabitants in the 27 selected villages.

Mosquito collection and determination

We carried out three rounds of mosquito collection in January 2017 (dry cold season), March 2017 (dry hot season) and June 2017 (rainy season) using Human Landing Collections (HLC) [16,17]. Mosquitoes were collected from 17:00 to 09:00 both indoors and outdoors at 4 sites per village. We surveyed three villages per night over a period of 9 nights. Due to a long duration of collection (16h), two teams of 8 collectors worked in each village and shifted at 01:00. Collectors were rotated among the collection points every hour. Indoor collection points were rooms that meet the following criteria: being usually inhabited; quiet without excessive movement of peoples; open to the outside through a door or a window. Outdoor collection points were sheltered from the wind, in place where few people are used to being together but far from fires, meeting places or too many nocturnal traffic areas. The distance between collection sites was at least 50 m. The distance between indoors and outdoors collection points in one site was at least 10 m to minimize competition between mosquito collectors. Mosquitoes were collected in individual tubes plugged with cotton and stored in hourly bags. Distance between sites was at least 50m. In each site, distance between indoor and outdoor collection points was at least 10m to minimize competition between indoor and outdoor collectors (in terms of attractiveness for mosquitoes).Independent staff supervised rotation of the mosquito

collection and regularly checked for the quality of the mosquito collection. The following criteria were checked: respected collection location, collector at his post, collector awake, collector in a correct position, collector adequately dressed, correct hourly bags used. If one of the criteria was not respected, required arrangement were immediately make by the supervisor.

Morphological identification and dissection

Mosquitoes were morphologically identified where possible on the field to genus and species levels using morphological keys [18,19]. A subsample of 100 non blood-fed *Anopheles spp.* individuals was randomly selected per survey and per village and dissected to identify their parity state (parous or nulliparous) [20]. We calculated the parous rate (see below) that is a proxy of the age (and therefore the survival rate) of the vector population. All females belonging to the *Anopheles* genus were stored in individual tubes with silicagel and preserved at -20°C for further analyses.

Molecular analysis

DNA extracted from head-thorax of *Anopheles spp.* individuals was used to detect *Plasmodium falciparum* infection using quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay [21]. Individuals belonging to the *Anopheles gambiae* complex and the *Anopheles funestus* Group were identified to species by PCR [22–24].

PCR assay were carried out on all mosquitoes belonging to the *An. gambiae* complex to detect the L1014F (*kdr-w*)[25], the L1014S (*kdr-e*)[26] and the G119S (*ace-1*) [27] mutations. These mutations confer insecticide resistance to the pyrethroids for the *kdr-w* and *kdr-e* and to carbamates and organophosphates for the *ace-1*.

Parameters measured

We calculated the human biting rate (HBR; the number of vectors' bites per human per night ($b.h^{-1}.n^{-1}$), the sporozoite infection rate (SIR: the proportion of *Anopheles* infected by *P. falciparum*), the entomological inoculation rate (EIR; the number of infected bites per human per night ($ib.h^{-1}.n^{-1}$ that is the product of the HBR with the SIR), the parous rate (PR; the proportion of parous females over the total dissected) and the endophagy rate (ER; the

proportion of *Anopheles* females collected indoors) for each *Anopheles* species and for overall *Anopheles spp.*

Statistical analyses

We assessed HBR, ER, SIR, EIR and PR using generalized mixed effect models (GLMM) with collection points and villages as nested random intercept. All models were fitted using the 'glmer' function of the package 'lme4' [28] run in the R software [29]. For all models, we performed backward stepwise deletion of the fixed terms followed by Likelihood ratio tests. Term removals that significantly reduced explanatory power ($p< 0.05$) were retained in the minimal adequate model. We used the post-hoc Tukey method to do multiple comparison among modalities of the fixed terms and calculated estimated marginal means (EMM) using the 'emmeans' function of the 'emmeans' package [30]. We considered main effects and interactions of the fixed terms in all the models.

We performed HBR and EIR analyses using negative-binomial models fitted on nightly counts of all *Anopheles* and of *Anopheles* individuals found to be infected by *P. falciparum*, respectively. Fixed terms were the survey and the collection position (indoor or outdoor). The results of final models are presented (S1 File).

We performed SIR, ER and PR analyses using binomial models fitted on individual status of the *Anopheles* (infected *vs*. uninfected, collected indoors *vs.* outdoors or parous *vs*. nulliparous, respectively). Fixed terms for these binomial models were the survey and the individual species.

The relationship between *Anopheles* species composition and surveys was tested using a Pearson's Chi-squared test of independence with simulated p-value.

We assessed nightly activity of each major *Anopheles* species by comparing their Median Catching Time (MCT), which represents the time at which 50% of the individuals were collected [11], using a Kruskal-Wallis test and a Dunn's post-hoc test for multiple comparisons (function 'dunnTest' of the 'VIA' package) in R [31].

We compared the genoptypes frequencies of *kdr* and *ace-1* mutations among surveys and species using the G-test [32] implemented in Genepop 4.7 and run in R [33]. Genotypic frequencies at the *kdr* and *ace-1* mutations were tested for conformity to Hardy-Weinberg

equilibrium using the "Exact HW test" [34]. In case of disequilibrium, we tested heterozygote excess and deficiency using the score test [35]. We tested the relationship between infectiousness and the genotypes for the mutations *kdr-w, kdr-e* and *ace1* using Pearson's Chi-square tests (or a Fisher's exact test when one or more count were < 5).

Ethics approval and consent to participate

The protocol of this study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee of the Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IEC-IRSS) and registered as N°A06/2016/CEIRES. Mosquito collectors and supervisors gave their written informed consent. They received a vaccine against yellow fever as a prophylactic measure. Collectors were treated free of charge for malaria according to WHO recommendations.

Results

Anopheles densities and composition

During the three surveys, we collected a total of 2591 mosquitoes belonging to four genus: *Anopheles spp.* (n=1936, 74.72%), *Aedes spp.* (n=481, 18.56%), *Culex spp.* (n=161, 6.21%) and *Mansonia spp.* (n=13, 0.50%) (Table 1). We successfully identified by PCR 92.84% (1530/1648) of the *An. gambiae s.l.* individuals and 96.15% (250/260) of the members of the *An. funestus* Group. Among the 1530 *Anopheles* individuals morphologically identified as members of the *An. gambiae* complex and proceeded by PCR, 1131 were *An. coluzzii*, 325 were *An. gambiae s.s.* and 74 were *An. arabiensis*. *Anopheles* morphologically identified as members of the *An. funestus* Group and successfully proceeded by PCR were all (n=250) *An. funestus s.s*. Other *Anopheles* species found during our surveys were *Anopheles nili* (n=3), *Anopheles pharoensis* (n=23), *Anopheles rufipes* (n=1) and *Anopheles squamosus* (n=1) (Figs 1A-C). The average HBR of *Anopheles spp.* mosquitoes was 1.30 and 1.34 $b.h^{-1}.n^{-1}$ during the dry cold and dry hot season, $RR_{1\text{-}2}$ = 1.15 [0.78, 1.71], p=0.67), respectively and these were significantly lower than during survey three in rainy season (6.31 $b.h^{-1}.n^{-1}$; $RR_{1\text{-}3}$= 0.090 [0.063, 0.130], Tukey's p< 0.0001; $RR_{2\text{-}3}$= 0.078 [0.054, 0.114], Tukey's p< 0.0001) (Fig 2).

During the dry cold season, *An. funestus s.s* was the most abundant species representing 78.64% (n=221/281), followed by *An. gambiae s.s* 6.04%, (17/281), *An. coluzzii* 4.98%, (14/281) and *An. pharoensis* 4.98%, (14/281) (Fig 2A). The other species were found at very low percentages

(~1%) (Fig 1A).The relative abundance and species composition of the *Anopheles* population varied from one village to another. We collected *Anopheles* mosquitoes in 19 villages out of the 27 surveyed with the highest densities registered in Diagnon (n= 149, 4 species) and Kpédia (n = 39, 3 species) (Fig 1A). We observed the highest *Anopheles* species diversity in Niaba (n=15, 6 species) where 6 species were identified. At the opposite in nine villages, only once species of *Anopheles* was found (either *An. funestus s.s, An. coluzzii* or *An. pharoensis*).

During the dry hot season, *An. coluzzii* (75.86%, n=220/290) almost totally replaced *An. funestus s.s* (8.27%, n=24/290) while proportions of other species do not vary substantially. During this survey, *Anopheles* mosquitoes were collected in only 15 villages (Fig 1B). Higher densities and species diversities were observed in Diagnon (n = 179, 4 species) and Kpédia (n = 65, 4 species) (Fig 1B). We identified 3 *Anopheles* species in both Nouvielgane and Nipodja villages and 2 *Anopheles* species in Yelbelela and Niaba. In all other villages, only one *Anopheles* species was present at low densities.

During the rainy season, *An. coluzzii* remained the major species (65.71%, n=897/1365) followed by *An. gambiae s.s* (20.95%, n=286/1365) and *An. arabiensis* (4.54%, n=62/1365). During this survey, *An. funestus s.s* fall under 1% of the total. We collected *Anopheles spp.* mosquitoes in 25 villages out of the 27 surveyed (Fig 1C). The higher densities were observed in Niaba (n = 264, 4 species), Diagnon (n = 224, 6 species) and Kpédia (n=190, 3 species). We identified 4 *Anopheles* species in Lobignonao (n=31), Palembiro (n=100), Yelbelela (n=59), 2 *Anopheles* species in Dangbara (n=31), Kouloh (n=25), Niombripo (n=6), Sarambour (n=16), Tiakiero (n=10), and 1 *Anopheles* species in Gongombiro (n=3), Ouidiaro (n=3), Tiordiero (n=7). In the remaining villages, 3 *Anopheles* species was sampled. No *Anopheles spp* mosquitoes were collected in Sousoubro and Moulé (Fig 1C).

Species composition of the *Anopheles* population varied significantly among surveys (Pearson's Chi-squared test, χ^2=1339.7, simulated p-value = 0.0005).

Table 1. Abundance and diversity of mosquito species in the Diébougou area during pre-intervention surveys

Mosquitoes species	Dry cold season	Dry hot season	Rainy season	Total
Aedes aegypti	2	1	103	106
Aedes africanus	0	0	6	6
Aedes fowleri	0	0	100	100
Aedes furcifer	0	0	101	101
Aedes lutheocephalus	0	0	16	16
Aedes opok	0	0	16	16
Aedes vexans	0	0	89	89
Aedes vittatus	0	6	41	47
Anopheles gambiae s.l.	35	264	1349	1648
Anopheles funestus Group	230	25	5	261
Anopheles nili	1	0	2	3
Anopheles pharoensis	14	1	8	23
Anopheles rufipes	1	0	0	1
Anopheles squamosus	0	0	1	1
Culex cinereus	1	9	15	25
Culex decens	0	1	2	3
Culex poicilipes	0	1	1	2
Culex quinquefasciatus	21	42	62	125
Culex univittatus	1	0	5	6
Mansonia africana	4	4	0	8
Mansonia uniformis	2	0	3	5
Total	312	354	1925	2591

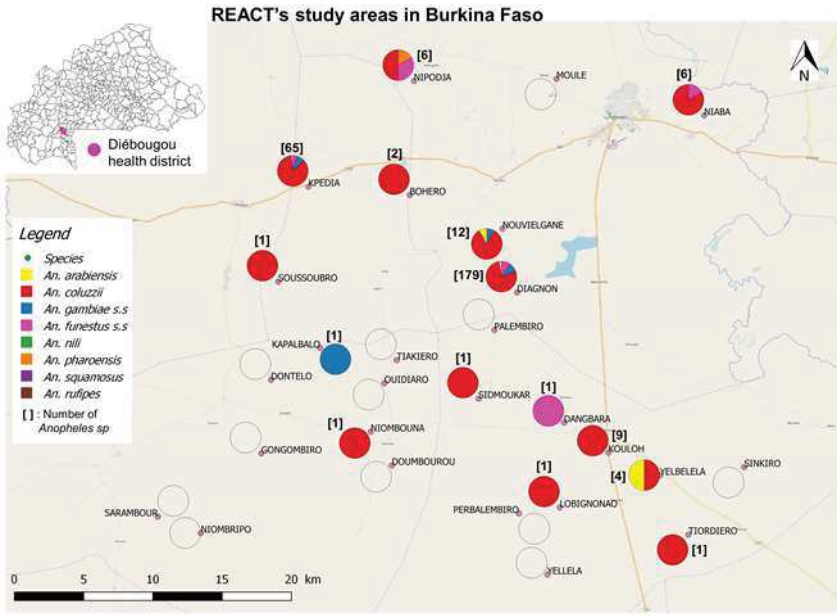

Fig 1A. Map of *Anopheles* densities and composition during dry cold season.

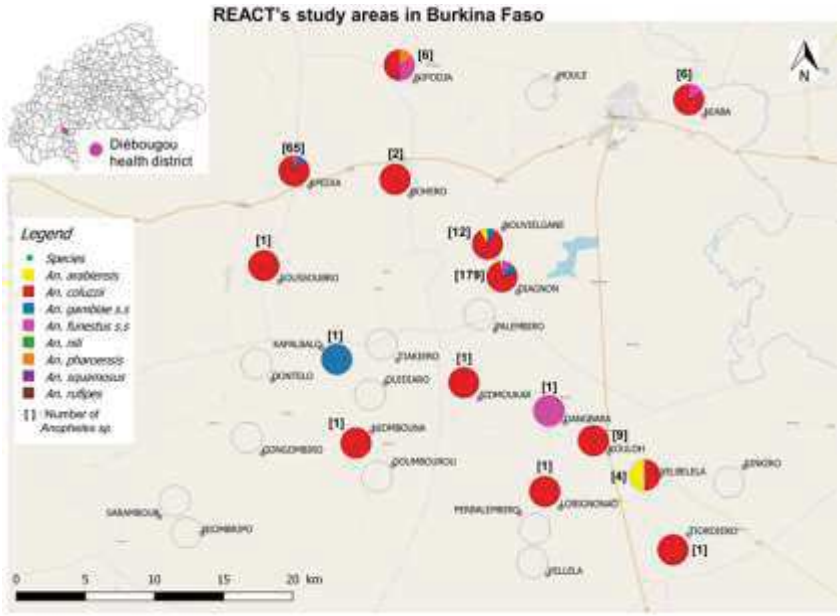

Fig 1B. Map of *Anopheles* densities and composition during dry hot season. Top-left box shows the location of the Diébougou health district in Burkina Faso. Background was obtained freely from openstreetmap.org

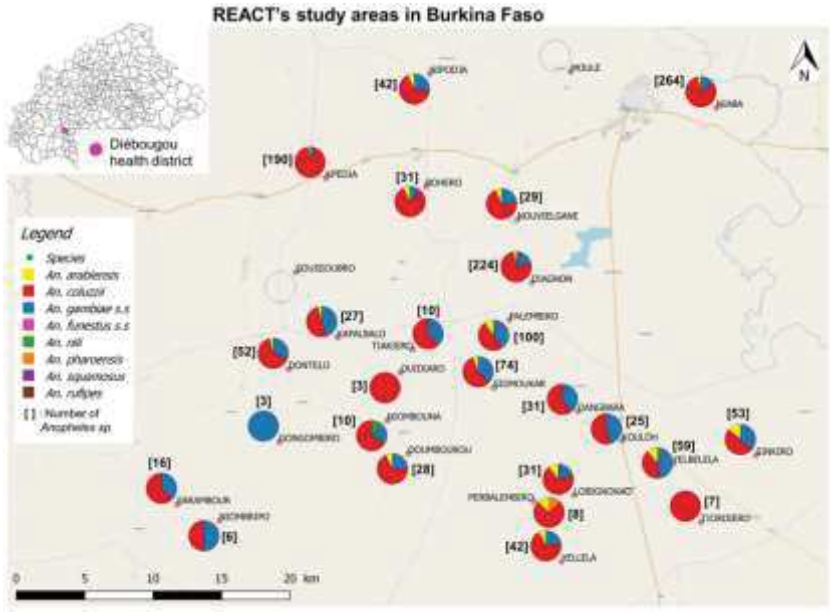

Fig 1C. Map of *Anopheles* densities and composition during rainy season. Top-left box shows the location of the Diébougou health district in Burkina Faso. Background was obtained freely from openstreetmap.org

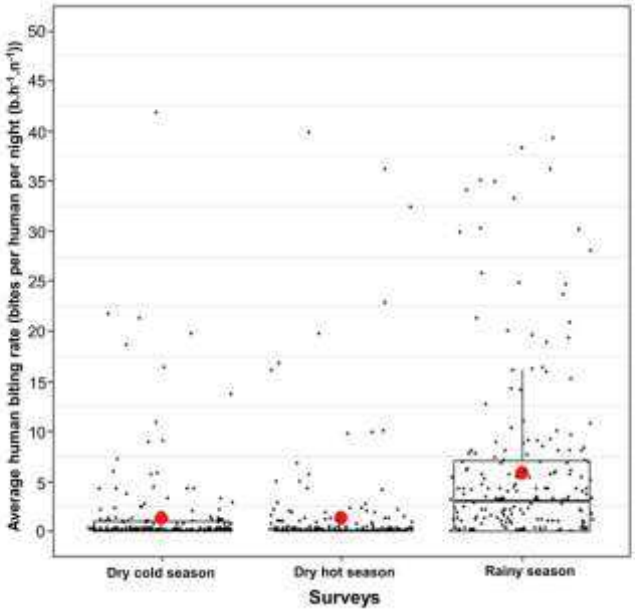

Fig 2. Human biting rates of *Anopheles* mosquitoes measured during dry cold, dry hot and rainy season in 27 villages of the Diébougou health district, Burkina Faso. Boxes indicate inter-quartile range (IQR) and median of human biting rates recorded at each survey. Whiskers indicate 2.5–97.5 percentiles. The upper whisker extends from the hinge to the largest value no further than 1.5 * IQR from the hinge. Black small dots indicate HBR recorded at each collection point and red dots show the mean HBR per survey.

Mosquito biting behavior

Overall, endophagy rate (ER) of *Anopheles spp.* [IC95%] was 63.23% [57.50-68.96], 50.18% [44.27-56.09] and 57.18% [54.44-59.90] during the dry cold, dry hot and rainy seasons, respectively (Table 2).

During dry cold season, *An. funestus s.s* (EMM ER [95% CI] = 64.8% [56.6, 72.2], p= 0.0005) and *An. gambiae s.s.* (EMM ER = 83.7% [59.0, 94.9], p = 0.012) were significantly endophilic. During this survey, ER of other species were not different than 50% (p>0.25).

During dry hot season, EMM ERs of *An. funestus s.s* and *An. gambiae s.s* decreased to 56.2% [35.5, 75.0] and 71.1% [48.3, 86.6], respectively, no longer different than 0.5 (p = 0.56 and p=0.069, respectively) but the numbers of individuals collected were small (n=24 and n=22, respectively) (Table 2). During this survey, ER of other species were also not different than 50% (p>0.14).

During rainy season, the ER of *An. coluzzii* increased significantly ($RR_{2\text{-}3}$ = 0.61 [0.41, 0.89], p = 0.0066) to 59.3% [54.7, 63.8] significantly higher than 50% (p=0.0001). During this survey, ER of other species were also not different than 50% (p>0.12).

The median catching times of *An. coluzzii*, *An. gambiae s.s*, and *An. pharoensis* were recorded between 01:00 and 02:00 while those of *An. funestus s.s* and *An. arabiensis* were one hour later (between 02:00 and 03:00; Fig 3). These differences were significant between *An. funestus s.s* and both *An. coluzzii* and *An. gambiae s.s* (Dunn's multiple comparison test p-values = 0.01 and 0.004, respectively). *An. coluzzii*, *An. gambiae s.s*, *An. pharoensis* and *An. funestus s.s* showed early biting activity (beginning at 18:00) than *An. arabiensis* (beginning at 21:00). A late biting activity (after 06:00) was observed with *An. coluzzii*, *An. gambiae s.s* and *An. funestus s.s* (Fig 3).

Table 2. *Anopheles* species composition and densities

Species	Dry cold season			Dry hot season			Ra
	Indoor	Outdoor	Total	Indoor	Outdoor	Total	In
An. arabiensis	2	2	4	2	6	8	31
An. coluzzii	5	9	14	106	114	220	52
An. gambiae s.s	14	3	17	16	6	22	15
An. funestus s.s	146	75	221	14	10	24	3
An. nili	1	-	1	-	-		1
An. pharoensis	3	11	14	-	1	1	2
An. rufipes	1	-	1	-	-		-
An. squamosus	-	-		-	-		-
Total	170	98	268	136	131	267	69
% Indoors [95% CI]	63.23 [57.50-68.96]			50.18 [44.27-56.09]			57

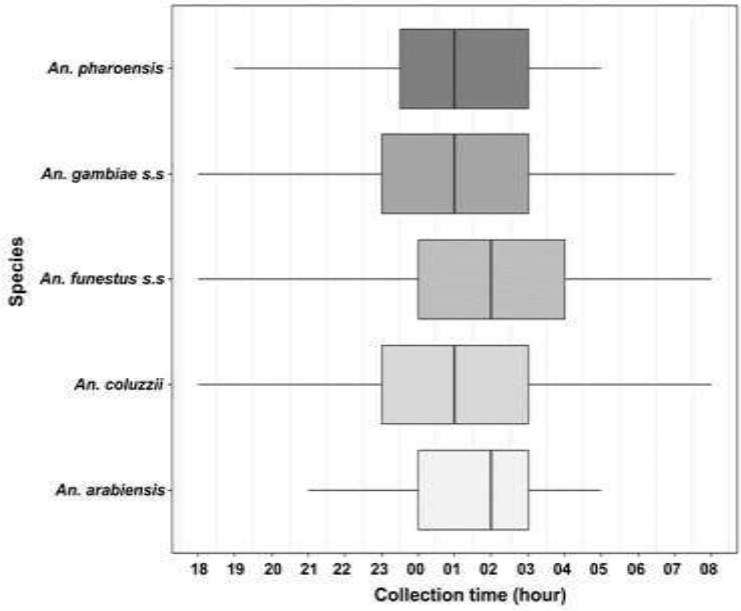

Fig 3. Median catching time of *Anopheles*. Boxes indicate 1st-3rd quartile and median hours of biting activity. Whiskers indicate 2.5–97.5 percentiles

Plasmodium infection and transmission intensity

We analyzed, a total of 1808 head-thoraxes of *Anopheles* for the research of *P. falciparum* infection. The overall SIR was 0.07 [0.02-0.14] (19/272), 0.06 [0.01-0.11] (19/275) and 0.06 [0.00-0.70] (81/1261) in dry cold season, dry hot season and rainy season, respectively (Table 3). None *An. nili, An. pharoensis, An. rufipes* and *An. squamosus* individuals tested were infected. The SIR did not vary significantly among surveys (Tukey's tests, p-values > 0.09).The SIR of *An. gambiae s.s* was lower than that of *An. funestus s.s* (OR=0.20 [0.05, 0.90], p= 0.03). No other differences between species have been evidenced (p-values > 0.23). The overall SIR both indoors and outdoors were included in supplementary Table 1. We collected infectious *Anopheles spp.* mosquitoes in 07 villages out of the 27 surveyed (S1-3 Figs.)

Entomological inoculation rate (EIR) was 0.375 [0.30-0.44] infected bites per human per night ($ib.h^{-1}.n^{-1}$) during survey 3 (rainy season) significantly higher than 0.087 $ib.h^{-1}.n^{-1}$ [0.06-0.10] measured during survey 1 (dry cold season; RR_{1-3}=0.25 [0.11, 0.56], p=0.0002) and 0.089 $ib.h^{-}$

[1].n[-1][0.05-0.11] measured during survey 2 (dry hot season; RR_{2-3}=0.23 [0.10, 0.51], p=0.0001) (Table 3).

Table 3. Entomological transmission parameters

Species	Dry cold season		Dry hot season		Rainy season	
	SIR (%)	EIR	SIR (%)	EIR	SIR (%)	EIR
An. arabiensis	0.00	0.000	12.50	0.005	1.61	0.005
An. coluzzii	14.29	0.009	7.73	0.079	6.35	0.264
An. gambiae s.s	11.76	0.009	4.55	0.005	8.04	0.106
An. funestus s.s	6.79	0.069	0.00	0.000	0.00	0.000
An. nili	0.00	0.000	-	-	0.00	0.000
An. pharoensis	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
An. rufipes	0.00	0.000	-	-	-	-
An. squamosus	-	-	-	-	0.00	0.000
Mean [95% CI]	0.07 [0.02-0.14]	0.087 [0.06-0.10]	0.06 [0.01-0.11]	0.089 [0.05-0.11]	0.06 [0.00-0.7]	0.375 [0.30-0.44]

SIR: Sporozoite infection rate; EIR: entomological inoculation rate;[95% CI]: 95% Confidence interval

Physiological age

We dissected 966 *Anopheles* for determination of parous rate. *Anopheles* parous rate was 76.00% [68.51-83.48], 78.80 [72.28-85.32] and 66.66% [63.14-70.18] in the dry cold season, dry hot season and rainy season respectively (S2 Table). The average parous rate of *Anopheles* mosquitoes during surveys two (dry hot season) was significantly higher than during survey three (rainy season) (OR=2.1, [1.21-3.70], p-value=0.0051). Overall, parous rate was 76.38%, 68.97%, 67.24%, 72.65%, 77.77% and 100% for *An. funestus s.s*, *An. arabiensis*, *An. coluzzii*, *An. gambiae s.s*, *An. pharoensis* and *An. nili* respectively (S2 Table). The parous rate did not differ significantly among the species (χ^2 = 2.2, df = 3, p=0.51).

Frequencies of L1014F *kdr*, L1014S *kdr* and G119S *ace-1* mutations in *An. gambiae* s.l.

Numbers of individuals of each genotype of the three mutations and their frequencies in *An. arabiensis*, *An. gambiae s.s.* and *An. coluzzii* are presented for each survey (Table 4). We were not able to find a significant relationship between infectiousness and the genotypes of the *kdr-w* mutation ($\chi^2 = 1.44$, df = 2, p = 0.48), *kdr-e* mutation (Fisher's exact test, p = 0.16) and *ace-1* mutation (Fisher's exact test, p = 0.17) in the *An. gambiae* s.l. population.

In *An. arabiensis*, the *kdr-w* mutation did not vary significantly among surveys (exact G test p-values > 0.15) nor among villages (exact G test p-values > 0.08). The population did not differ significantly from the HWE (exact HW test p > 0.31) whatever the survey.

The *kdr-w* frequency in *An. coluzzii* during the dry cold season was 0.61, it increased (not significantly, exact G test p = 0.41) to 0.69 during dry hot season and then decreased significantly to 0.55 during the rainy season (exact G test p<0.001). During the dry hot season, when the frequency of the *kdr-w* mutation was the highest, the population was not at the HW equilibrium (exact HW test p< 0.001) due to heterozygote deficiency (p<0.001) observed in the village of Diagnon where most of the individuals (131/220) where collected.

In *An. gambiae s.s*, the *kdr-w* mutation frequency was 0.97 during dry cold season and significantly decrease to 0.59 in dry hot season (exact G test p < 0.001). During the rainy season when mosquito densities were very high, the *kdr-w* frequency rose up to 0.88. That was significantly higher than during dry hot season (exact G test p < 0.001) but not different than during dry cold season (p = 0.12). This population was not at the HWE for the *kdr-w* mutation (exact HW test p < 0.001) due to heterozygote deficiency (p < 0.001). Heterozygote deficiency was observed in most of the villages during each survey (S2 File).

In *An. arabiensis*, the *kdr-e* mutation was detected only during the rainy season at a frequency of 0.30. The frequency of the *kdr-e* mutation did not vary significantly among villages (exact G test p > 0.10). A significant deviation of HWE was observed (exact HW test p = 0.002) due to heterozygote excess in rainy season (p =0.001). However, we did not observe this heterozygote excess at the village scale (S3 File).

In *An. coluzzii*, the *kdr-e* mutation was not detected during the dry-cold season and only one heterozygous individual was collected during the dry hot season corresponding to a frequency of 0.002. The frequency increased significantly to 0.12 during the rainy season (exact G test $p < 0.001$). A significant deviation of HWE was observed for the *kdr-e* mutation (exact HW test $p < 0.001$) due to heterozygote excess in most of the villages during each survey (S4 File).

In *An. gambiae s.s*, the *kdr-e* mutation was detected only during the rainy season at a frequency of 0.03. The *kdr-e* mutation do not vary significantly among villages (exact G test $p > 0.11$). The population did not differ significantly from the HWE (exact HW test $p > 0.05$) in rainy season.

In *An. arabiensis,* the *ace-1* mutation was detected only during the dry hot season at a frequency of 0.12. The frequency of the *ace-1* mutation did not vary significantly among villages (exact G test $p > 0.48$). The population did not differ significantly from the HWE (exact HW test $p > 0.05$) in dry hot season.

The frequency of the *ace-1* allele in *An. coluzzii* was 0.07, 0.02 and 0.02 in dry cold, dry hot and rainy seasons, respectively. There were no significant difference in the *ace-1* allele frequency among surveys (exact G test $p > 0.11$) nor among villages (exact G test $p > 0.13$). The *ace-1* allele frequency in *An. coluzzii* did not differ from the HWE (exact HW test $p > 0.05$).

In *An. gambiae s.s,* the frequencies of the *ace-1* allele were 0.22, 0.11 and 0.19 in dry cold, dry hot and rainy seasons, respectively. The frequency did not vary significantly among surveys (exact G test $p > 0.23$) nor among villages (exact G test $p > 0.07$). The population did not differ significantly from the HWE (exact HW test $p > 0.12$) whatever the survey.

Three hundred and fifty four (354) individuals *An. gambiae s.l* carried multiple insecticide resistance mechanisms. Two hundred and seven (207) carried at least one mutated allele for both *kdr-w* and *kdr-e* mutations (belonging the *An. gambiae s.s, An. coluzzii* and *An. arabiensi*s species). One hundred and forty-two (142) carried at least one mutated allele for both *kdr-w* and *ace-1* mutations (belonging the *An. gambiae s.s, An. coluzzii* and *An. arabiensi*s species) and 16 carried at least one mutated allele for both *kdr-e* and *ace-1* mutations (belonging the *An.*

gambiae s.s and *An. coluzzii* species). Eleven (11) individuals carried the three mutations (belonging the *An. gambiae s.s* and *An. coluzzii* species).

Table 4. Allele frequency of *kdr* L1014F, *kdr* L1014S and *ace-1* G119S mutations in *Anopheles gambiae s.l.*

		Genotypes *kdr-w*						Genotypes *kdr-e*					
Species	**Period**	**N**	**SS**	**RS**	**RR**	**f (1014F)**	**p(HW)**	**N**	**SS**	**RS**	**RR**	**f(1014S)**	**p(HW)**
An. arabiensis	**Dry cold season**	4	0	4	0	0.500[a]	0.3141	4	4	0	0	0.000[a]	-
	Dry hot season	8	5	3	0	0.188[a]	1.0000	8	8	0	0	0.000[a]	-
	Rainy season	56	35	18	3	0.214[a]	0.6978	53	22	31	0	0.292[b]	0.0022
An. coluzzii	**Dry cold season**	14	1	9	4	0.607[ab]	0.3164	14	14	0	0	0.000[a]	-
	Dry hot season	219	37	63	119	0.687[a]	0.0000	218	217	1	0	0.002[a]	-
	Rainy season	823	176	389	258	0.550[b]	0.1938	743	453	289	1	0.196[b]	0.0000
An. gambiae s.s	**Dry cold season**	17	0	1	16	0.971[a]	-	17	17	0	0	0.000[a]	-
	Dry hot season	22	8	2	12	0.591[b]	0.0000	22	22	0	0	0.000[a]	-
	Rainy season	258	16	26	216	0.888[a]	0.0000	226	213	13	0	0.031[a]	1.0000

N: number of mosquitoes; SS: homozygous susceptible; RS: heterozygous; RR: homozygous resistant; f(1014F): frequency of the
frequency of the 1014S resistant *kdr* allele; f(119S): frequency of the 119S resistant *ace-1* allele ; p(HW) : exact Hardy-Weinberg t
species and mutation, allelic frequencies carrying the same superscript letter do not differ significantly (G-test p > 0.05).

Discussion

This study showed that the malaria vector species and abundance in the Diébougou area varied significantly according to the season. *Anopheles funestus s.s* was the predominant vector during the dry cold season (January 2017) but most individuals were collected in one village (Diagnon) that is close to swamps depending on the edge of the dam of Bapla. *Anopheles funestus s.s* densities were ten times lower two month later during the dry hot season (March 2017) and it almost disappeared in June 2017 during the rainy season. *Anopheles funestus s.s* is known to breed in large permanent or semi-permanent pools preferentially with emergent vegetation on its margins [36,37]. In Burkina Faso, two chromosomal forms of *An. funestus* have been described named Folonzo and Kiribina [38,39]. Folonzo form of *An. funestus* is mainly associated with the presence of water reservoirs containing natural vegetation, such as swamps. The swamps near Diagnon are upstream from the Bapla dam and become dry at the end of the dry season. This may explain why *An. funestus s.s* almost disappeared during the dry hot season and until swamps become green and flooded again.

Anopheles coluzzii was shown at very low densities during the dry cold season but became the predominant malaria vector species from the dry hot season (March 2017) to the rainy season (June 2017). During the dry-hot season, most of individuals were collected in Diagnon, the same village where *An. funestus s.s* densities were simultaneously falling. In Burkina Faso, *An. coluzzii* is known to breed in permanent or semi-permanent breeding sites [40,41]. Its presence in Diagnon during the dry season is certainly linked to the dam. However, it is not clear why *An. coluzzii* was present in very low densities during January 2017 and became numerous two months later. We hypothesize that the reduction of the breeding sites favorable to *An. funestus s.s* may have increased *An. coluzzii* competitiveness against *An. funestus s.s* around the Bapla dam. This result is in accordance with the high variability of *An. coluzzii* densities during the dry season as described by Dao *et al.*[42] in the neighboring Mali.

Densities of *An. gambiae s.s.* and *An. arabiensis* were low during both dry season's surveys and increased substantially during the rainy season (in the largest extent for *An. gambiae s.s*.). This is consistent with the preference of both these species to breed in temporary rain-dependent pools and puddles [37,40,43].

These four species (*An. funestus s.s, An. coluzzii, An. gambiae s.s* and *An. arabiensis)* were responsible for all the *P. falciparum* transmission recorded in this study. Sporozoite infection rate did not vary among surveys but EIR increase from an average of about 3 infected bites per human per month in dry (cold and hot) season to more than 10 bites per human per month during the rainy season. The values of EIR recoded in our study are consistent with previous works in the same region of Burkina [44–46]. Such levels of transmission (EIR > 100 infected bites per person per year) are relatively high when put in the African context [47]. As SIR was stable over the study, the increase in EIR in rainy season was mathematically due to the increase in vectors densities. According to our results, malaria transmission persists year round in the study area despite high spatial disparities. Indeed, during the dry cold and dry hot seasons, the spatial distribution of *An. funestus s.s.* and *An. coluzzii*, that were the main malaria vectors, was restrained to a small number of villages that concentrated malaria transmission. During the rainy season, the spatial distribution of malaria vector (with predominance of *An. coluzzii* and *An. gambiae s.s.*) was more homogeneous.

In addition to these well-known primary malaria vectors, we recorded the presence of four other *Anopheles* species in low densities (*An. nili, An. pharoensis, An. rufipes, An. squamosus*). While we were not able to detect *Plasmodium* parasites in the few individuals belonging to these species, they are all potential vectors of *Plasmodium*[37,48–52]. They are considered secondary vectors because of their behavior (exophagy and/or zoophagy) [50] but are nevertheless likely to maintain residual levels of transmission [53]. Such residual transmission by secondary vector species may increase as a result of the implementation of vector control measures which are designed to target primary vectors. Because they are considered secondary vectors [53,54] (due to their main trophic behavior including exophagy and/or zoophagy) or found in low densities, these species are often neglected in most of the recent studies carried out in Burkina Faso [55]. However, these vectors are nevertheless likely to maintain residual levels of transmission [53,56]. Indeed, drastic reduction of the major vector's densities may free up their ecological niches for secondary vectors [57–60]. Therefore, secondary vectors deserve particular attention [61]. Their bionomics and competence for *P. falciparum* transmission remain to be investigated.

Regarding the behavior of the main malaria vector species, we observed that malaria vectors (*An. coluzzii*, *An. gambiae s.s* and *An. funestus s.s*) were slightly but mainly endophagic (50 to 63% depending on the survey). This indicates that indoor vector control measures (such as

LLINs and IRS) are expected to target a significant part of the vector population but probably insufficient to stop the transmission. The peak of aggressiveness of the main *Anopheles* species occurred during the second part of the night. This observation is consistent with the usual patterns of hourly biting aggressiveness of these species [62]. This period corresponds to the moments of deep sleep of the human populations who are potentially protected by LLINs [43,63]. However, we observed early- and late-biting phenotypes in the main malaria vector species (*An. coluzzii*, *An. funestus s.s*. and *An. gambiae s.s*). These phenotypes might mediate residual transmission and we might expect to see them selected by the massive use of insecticide-based vector control tools such as LLINs [64,65]. It is therefore crucial to monitor malaria vector behavior in this area when implementing malaria vector control strategies in order to track the possible emergence of behavioral resistances.

This study showed high parity rates of malaria vectors (> 60%) in the study area, regardless of the season. The parous rate was significantly lower in the rainy season than in the cold dry season and the hot dry season, indicating that young females were more prevalent in the rainy season. The lower parous rate of *Anopheles* vectors during the rainy season may be due to the presence of more breeding habitats which yield more nulliparous mosquitoes in vector populations [66]. It is also possible that a higher usage of LLINs during the rainy season as a result of a higher nuisance and lower temperatures might result in smaller proportions of parous vectors [67].The three main insecticide resistance mutation *kdr-w*, *kdr-e* and *ace-1* have been detected in the three species of the *An. gambiae* complex but at varying frequencies among species and surveys. In June 2017 during the rainy season (when the populations were most abundant), the *kdr-w* mutation frequency was very high in *An. gambiae s.s.* (almost fixed, f=0.88). Since the discovery of this mutation [25] in *An. gambiae s.s,* the *kdr-w* frequencies have always been high in this species in Southwest Burkina Faso [8,10,68] indicating that the mutation has a low cost for this species or that strong selection pressures occur, such vector control strategies implementation (universal distribution of LLINs is implemented in Burkina Faso since 2010 [69]) and massive use of pesticides in agriculture [70]. Indeed, the intensive use of insecticides in cotton cultivation would be a major factor driving the selection of pyrethroid-resistant specimens in Southwest Burkina Faso [10]. Most of the populations of *An. gambiae s.s.* from this study showed heterozygote deficiency for the *kdr-w* mutation that could indicate a Wahlund effect resulting from the presence of several populations within each given village. This might be explained by the colonization of temporary breeding sites by different

vector populations during the rainy season as evidence the annual reappearance of *An. gambiae s.s.* in the Sahel after the dry season [42]. To note that no disequilibrium was observed for the *kdr-e* and *ace-1* mutations in this species indicating that these populations, if they exists, resemble the local population in terms of genotypic composition for these loci.

During the rainy season, the *kdr-w* mutation frequency was lower in *An. coluzzii* (f= 0.55) and *An. arabiensis* (f=0.21) than in *An. gambiae s.s*. But in counterpart, both *An. coluzzii* (f=0.19) and *An. arabiensis* (f=0.29) showed higher prevalence of the *kdr-e* mutations than *An. gambiae s.s.* (f=0.03). In *An. coluzzii* and *An. arabiensis*, a heterozygote excess was observed for the *kdr-e* mutation. This disequilibrium may result from a heterozygote advantage as it has been observed in mating in *An. coluzzii* specimen from Southwest Burkina Faso carrying the *kdr-w* mutation [71]. The causes of this disequilibrium remain to be explored.

Both *kdr* mutations are well "implanted" in the vector population of our study area. These mutations provide physiological resistance to the pyrethroids insecticides, the only family of compounds authorized to impregnate LLINs. Although the impact of pyrethroids resistance on the efficacy of malaria control remains disputable [72], the development and the implementation of resistance management strategy need to be encouraged.

Regarding the *ace-1* mutation that confers resistance to carbamates and organophosphates insecticides, it was present in the three species at a moderate frequency in *An. gambiae s.s.* but at very low frequencies in *An. coluzzii* and *An. arabiensis*. In Burkina Faso, the three species may express high frequencies of the *ace-1* mutation depending on the location [73]. In our study area, *An. gambiae s.s.* seems to suffer more selection pressure possibly due to a wide use of carbamates and organophosphates particularly for cotton growing.

Recent studies in Tanzania and Senegal showed a relationship between the genotype for the *kdr* mutation of wild *Anopheles gambiae s.l.* and *Plasmodium falciparum* infection [74]. The mosquitoes carrying the mutation were more infected than those carrying the wild alleles. In contrast, we were not able to show such a relationship whatever the mutation studied (*kdr-w, kdr-e* or *ace-1*). This may be explained by the complex interactions occurring between insecticide resistance and *Plasmodium* infection as summarized in [75]. Indeed, while an insecticide resistance mutation may be associated with increased vector competence [76], the

infection by *Plasmodium falciparum* tends to decrease survival of vectors carrying this mutation [77].

Conclusions

Malaria transmission in the Diébougou area was mainly due to *An. funestus s.s, An. coluzzii, An. gambiae s.s* and *An. arabiensis* with high spatio-temporal heterogeneities. The entomological indicators of malaria transmission were high despite the presence of LLINs. We observed early and late biting phenotypes in the main malaria vector species. These phenotypes might mediate residual transmission. Three mutations *kdr-w, kdr-e* and *ace-1* were present in the three species of the *An. gambiae* complex with high frequency variability between species. These data highlighted the need to complement malaria control interventions to establish efficient resistance management plan (integrated vector control approach) and monitor insecticide resistance (both physiological and behavioral).

Acknowledgements

We thank all participants of the study, especially technicians at the IRSS-DRO for their technical assistance. We acknowledge the Burkina Faso Ministry of Health, particularly Dr. Dembélé Henri that facilitated the data collection. We are also, grateful to the villagers of all sites for their kind collaboration and hospitality.

References

1. WHO. World malaria report 2018. 2018. p. 238. Available: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018.

2. WHO. World malaria report 2016. World Health Organization. 2016. Available: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016.

3. WHO. World malaria report 2017. World Health Organization. 2017. Available: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017

4. Ministère de la Santé. Annuaire statistique 2017, Burkina Faso. 2018.

5. Bhatt S, Weiss DJ, Mappin B, Dalrymple U, Cameron E, Bisanzio D, et al. Coverage and system efficiencies of insecticide-treated nets in Africa from 2000 to 2017. Elife.

2015;4: 1–37. doi:10.7554/eLife.09672

6. Mboma ZM, Overgaard HJ, Moore S, Bradley J, Moore J, Massue DJ, et al. Mosquito net coverage in years between mass distributions : a case study of Tanzania, 2013. Malar J. BioMed Central; 2018;17: 1–14. doi:10.1186/s12936-018-2247-z

7. INSD. Enquête sur les indicateurs du paludisme (EIPBF) au Burkina Faso 2017-2018. 2018. doi:10.1093/0198296452.001.0001

8. Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, Toé KH, Ouari A, Kengne P, et al. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae s.l.* from Burkina Faso (West Africa). Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103: 1113–1120. doi:10.1016/j.trstmh.2009.01.008

9. 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. doi:10.1016/j.pt.2010.08.004

10. Hien SA, Soma DD, Hema O, Bayili B, Namountougou M, Gnankiné O, et al. Evidence that agricultural use of pesticides selects pyrethroid resistance within *Anopheles gambiae s.l.* populations from cotton growing areas in Burkina Faso, West Africa. PLoS One. 2017;3: 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0173098

11. Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djènontin 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;206: 1622–1629. doi:10.1093/infdis/jis565

12. Sokhna C, Ndiath MO, Rogier C. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. Clin Microbiol Infect. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2013;19: 902–907. doi:10.1111/1469-0691.12314

13. Storeng KT, Palmer J. Viewpoint When ethics and politics collide in donor-funded global health research. Lancet. Elsevier Ltd; 2019;6736: 1–3. doi:10.1016/S0140-

6736(19)30429-5

14. INSD. Tableau de bord économique et social 2014 de la région du Sud Ouest. 2015.

15. INSD. Enquête nationale sur le secteur de l'orpaillage (ENSO). 2017.

16. Silver JB. Sampling adults by animal bait catches and by animal-baited traps. In: Dordrecht, editor. In : Mosquito Ecology Field Sampling Methods. Springer. 2008. pp. 493–675. Available: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6666-5_6

17. Coffinet T, Rogier C, Pages F. Evaluation de l ' agressivité des anophèles et du risque de transmission du paludisme : méthodes utilisées dans les armées françaises. Med Trop. 2009;69: 109–122.

18. Gillies MT et Coetzee M. A supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Afro tropical region). Publications of the South African Institute for Medical Research, no. 55. SAIMR, Johannesburg: pp143. SAIMR, Joh. 1987.

19. Mattingly PF, Rageau J, La CA, Des F, Du M, Xii SA. Contributions de la faune des moustiques du Sud-Est Asiatique. XII. Contrib Am Entomol Inst. 1973;7.

20. Detinova TS. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monogr Ser World Health Organ. Not Available; 1962;47: 13–191.

21. Boissière A, Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambéné PH, et al. Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. gambiae s.s.* in Cameroon. PLoS One. 2013;8: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0054820

22. 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.

23. Cohuet A, Simard F, Berthomieu A, Raymond M, Fontenille D WM. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles*

funestus. Mol Ecol Notes. 2002;2: 498–500. doi:10.1046/j.1471-8278

24. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. Malar J. 2008;7: 163. doi:10.1186/1475-2875-7-163

25. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.s.* Insect Mol Biol. 1998;7: 179–184. doi:10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x

26. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol. 2000;9: 491–7. doi:10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x

27. Essandoh J, Yawson AE, Weetman D. Acetylcholinesterase (*Ace-1*) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae s.s* . and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana. Malar J. 2013;12: 1–10.

28. Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker SW. Linear Mixed-Effects Models using “Eigen” and S4. 2019.

29. The R Development Core Team. R : A Language and Environment for Statistical Computing. 2008. pp. 1–2547. Available: http://www.gnu.org/copyleft/gpl.html

30. Russell L, Henrik S, Love J, Buerkner P, Herve M. Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means: Package ‘ emmeans ’. 2019. pp. 216–221. doi:10.1080/00031305.1980.10483031>.License

31. Dinno A. Dunn’s Test of Multiple Comparisons Using Rank Sum. 2017. pp. 1–7.

32. Goudet J, Raymond M. Testing Differentiation i n Diploid Populations. Genetics. 1996;1940: 1933–1940.

33. Rousset F. Population genetic data analysis using Genepop. 2017. pp. 1–16.

34. Haldane J. An exact test for randomness of mating. J Genet. 1954;52: 631–635.

35. Raymond M, Rousset F. GENEPOP : Population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered. 1995;86: 9–10.

36. Pages F, Orlandi-pradines E, Corbel V. Vecteurs du paludisme : biologie , diversité , contrôle et protection individuelle vectors of malaria : biology , diversity , prevention , and individual protection. Médecine Mal Infect. 2007;37: 153–161. doi:10.1016/j.medmal.2006.10.009

37. Gillies M, de Meillon B. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). Sahara Ethiop Zoogeographical. 1968; 343 pp.

38. 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.

39. Guelbeogo WM, Sagnon NF, Grushko O, Yameogo MA, Boccolini D, Besansky NJ, et al. Seasonal distribution of *Anopheles funestus* chromosomal forms from Burkina Faso. Malar J. 2009;8: 1–7. doi:10.1186/1475-2875-8-239

40. Diabaté A, Dabiré 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. doi:10.1186/1471-2148-8-5

41. 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. 2012;26: 9–17. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00957.x

42. Dao A, AS Yaro, M Diallo, S Timbiné, DL Huestis, Y Kassogué, AI Traoré, ZL Sanogo, D Samaké LT. Signatures of aestivation and migration in Sahelian malaria mosquito populations. Nature. 2014;516: 387–390. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus

43. Carnevale P, Robert V. Les anophèles Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. IRD éditions. 2009. Available: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Les+anoph?les+Biologie,+transmission+du+Plasmodium+et+lutte+antivectorielle#1

44. Dabiré KR, Diabaté A, Paré-Toé L, Rouamba J, Ouari A, Fontenille D, et al. Year to year and seasonal variations in vector bionomics and malaria transmission in a humid savannah village in west Burkina Faso. J Vector Ecol. 2008;33: 70–5. doi:10.3376/1081-1710(2008)33[70:ytyasv]2.0.co;2

45. Dabiré KR, Baldet T, Diabaté A, Dia I, Costantini C, Cohuet A, et al. *Anopheles funestus* (*Diptera: Culicidae*) in a humid savannah area of Western Burkina Faso: Bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. J Med Entomol. 2007;44: 990–997. doi:10.1603/0022-2585(2007)44[990:afdcia]2.0.co;2

46. Epopa PS, Collins CM, North A, Millogo AA, Benedict MQ, Tripet F, et al. Seasonal malaria vector and transmission dynamics in western Burkina Faso. Malar J. BioMed Central; 2019;18: 1–13. doi:10.1186/s12936-019-2747-5

47. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston GL, et al. A new world malaria map : *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. Malar J. 2011;10: 1–16.

48. Antonio-nkondjio C, Kerah-hinzoumbe C, Simard F. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon : Contribution of secondary vectors to malaria transmission. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;2585. doi:10.1603/0022-2585(2006)43

49. Dia I, Konate L, Samb B, Sarr J, Diop A. Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. Acta Trop. 2008;105: 145–153. doi:10.1016/j.actatropica.2007.10.010

50. Tabue RN, Awono-ambene P, Etang J, Atangana J, Toto JC, Patchoke S, et al. Role of *Anopheles* (Cellia) *rufipes* (Gough , 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon : a cross- sectional survey.

Parasit Vectors. 2017; 1–11. doi:10.1186/s13071-016-1933-3

51. Adja AM, Goran EKN, Koudou BG, Dia I, Kengne P. Contribution of *Anopheles funestus*, *An . gambiae* and *An . nili* (*Diptera : Culicidae*) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. Ann Trop Med Parasitol. 2011;105: 13–24. doi:10.1179/136485910X12851868780388

52. Abduselam N, Zeynudin A, Berens-riha N, Seyoum D, Pritsch M, Tibebu H, et al. Similar trends of susceptibility in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles pharoensis* to *Plasmodium vivax* infection in Ethiopia. Parasit Vectors. 2016; 1–9. doi:10.1186/s13071-016-1839-0

53. Afrane YA, Bonizzoni M, Guiyun Y. Secondary malaria vectors of sub-Saharan Africa: Threat to malaria elimination on the continent? Current Topics in Malaria. Intech Open Science; 2016. pp. 473–490. doi:doi.org/10.5772/65359

54. Gillies MT. Observations on nulliparous and parous rates in some common east african mosquitoes. Ann Trop Med Parasitol. 1963;57: 435–442. doi:10.1080/00034983.1963.11686197

55. Hien DF, Yerbanga SR, Da DYF, Guissou E, Bienvenue KY, Dieudonné SD, et al. Competence of the secondary vectors *An. coustani*, *An. squamosus* and *An. rufipes* for *Plasmodium falciparum* as measured by direct membrane feeding assays. 7th Multilateral Initiative on Malaria Panafrican Conference. 2018. p. 1.

56. Beier JC, Killeen GF, Githure JI. Short Report: Entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. Am J Trop Med Hyg. 1999;61: 109–113.

57. Gillies MT, 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. Bull Entomol Res. 1960;51: 243–252.

58. Gillies MT, Furlong M. An investigation into the behaviour of *Anopheles parensis* Gillies at Malindi on the Kenya Coast. Bull Entomol Res. 1964;55: 1–16.

59. Trung HD, Bortel W Van, Sochantha T, Kalouna K, Briet OJT, Coosemans M. Behavioural heterogeneity of *Anopheles* species in ecologically different localities in Southeast Asia : a challenge for vector control. Trop Med Int Heal. 2005;10: 251–262.

60. Bayoh MN, Mathias DK, Odiere MR, Mutuku FM, Kamau L, Gimnig JE, 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: 1–12.

61. Ferguson HM, Dornhaus A, Beeche A, Borgemeister C, Gottlieb M, Mulla MS, et al. Ecology : A Prerequisite for malaria elimination and eradication. 2010;7: 1–7. doi:10.1371/journal.pmed.1000303

62. Monroe A, Moore S, Koenker H, Lynch M, Ricotta E. Measuring and characterizing night time human behaviour as it relates to residual malaria transmission in sub‐Saharan Africa : a review of the published literature. Malar J. 2019; 1–12. doi:10.1186/s12936-019-2638-9

63. Duvallet G, Fontenille D, Robert V. Entomologie médicale et vétérinaire. IRD EDITIO. Quae É, editor. 2017.

64. Lies Durnez and Marc Coosemans. Residual transmission of malaria: An old issue for new approaches. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. Intech Open Science; 2013. pp. 671–704. doi:http://dx.doi.org/10.5772/55925

65. Carrasco D, Moiroux N, Chandre F. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. Curr Opin Insect Sci. 2019; doi:10.1016/j.cois.2019.03.005

66. Akono APN, Tcheugoue GRJ, Mbida JA, Lehman LG. Higher Mosquito aggressiveness and malaria transmission following the distribution of alpha-cypermethrin impregnated mosquito nets in a district of Douala, Cameroon. African Entomol. 2018;26: 429–436.

67. Sovi A, Azondékon R, Aïkpon RY, Govoétchan R, Tokponnon F, Agossa F, et al. Impact of operational effectiveness of long-lasting insecticidal nets (LLINs) on malaria

transmission in pyrethroid-resistant areas. Parasit Vectors. 2013;6: 1–13. doi:10.1186/1756-3305-6-319

68. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, Akogbeto M, et al. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and *de novo* phenomena. Trop Med Int Heal. 2004;9: 1267–1273. doi:10.1111/j.1365-3156.2004.01336.x

69. PNLP. Directives nationales pour la prise en charge du paludisme dans les formations sanitaires du Burkina Faso. Ministère de la Santé/Burkina Faso. 2014.

70. INSD. Annuaire statistique 2015 de la région du Sud Ouest. 2016.

71. Platt N, Kwiatkowska RM, Irving H, Diabaté a, Dabire R, Wondji CS. Target-site resistance mutations (*kdr* and *RDL*), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae.* Heredity (Edinb). 2015; 1–10. doi:10.1038/hdy.2015.33

72. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: A worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. Trends Parasitol. Elsevier Ltd; 2016;32: 187–196. doi:10.1016/j.pt.2015.11.010

73. Dabiré RK, Namountougou M, Diabaté A, Soma DD, Bado J, Toé HK, et al. Distribution and frequency of *kdr* mutations within *Anopheles gambiae s.l.* populations and first report of the *Ace.1* G119S mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). PLoS One. 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0101484

74. Ndiath MO, Cailleau A, Diedhiou SM, Gaye A, Boudin C. Effects of the *kdr* resistance mutation on the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* populations to *Plasmodium falciparum* : a hindrance for vector control. Malar J. 2014;13: 1–8. doi:10.1186/1475-2875-13-340

75. Alout H, Labbé P, Chandre F, Cohuet A. Malaria vector control still matters despite insecticide resistance. Trends Parasitol. 2017;33: 610–618. doi:10.1016/j.pt.2017.04.006

76. Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, Dje I, Djogbe LS, Corbel V, et al. Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae s.s.* for *Plasmodium falciparum*. PLoS One. 2013;8: 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0063849

77. Alout H, Dabiré RK, Djogbénou LS, Abate L, Corbel V. Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2016;6: 1–11. doi:10.1038/srep29755

Conflict of interest statement

The author has declared that no competing interests exist.

Data Availability Statement

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files. The datasets used during this article are fully available without restriction.

Funding

This work was part of the REACT project, funded by the French Initiative 5% Expertise France (N° 15SANIN213). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.