

SOMMAIRE	IV
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES	VII
GLOSSAIRE.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES PHOTOS	X
LISTE DES TABLEAUX	X
ABSTRACT	XI
I- INTRODUCTION GENERALE	1
II- REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
II-1. GENERALITES SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME	3
II-1.1. Historique du paludisme.....	3
II-1.2. Importance sanitaire et économique du paludisme.....	4
II-1.3. Répartition géographique du paludisme	6
II-1.4. Le vecteur du paludisme : <i>Anopheles spp</i>	7
II-1.4.1. Les espèces anophéliennes dans le monde et à Madagascar.....	7
II-1.4.2. La bio-écologie des anophèles.....	8
II-1.4.3. La lutte actuelle contre les vecteurs du paludisme	9
II-1.5. L'agent pathogène du paludisme : <i>Plasmodium spp</i>	10
II-1.5.1. Les espèces plasmodiales dans le monde et à Madagascar.....	10
II-1.5.2. Le cycle biologique des plasmodes.....	11
II-1.5.3. Signes cliniques et traitement du paludisme	12
II-2. GENERALITES SUR LA TRANSMISSION RESIDUELLE DU PALUDISME.....	14
II-2.1. La transmission résiduelle du paludisme : un nouveau concept, un vieux problème	14
II-2.2. Déterminants entomologiques de la transmission résiduelle du paludisme	15
II-2.2.1. Résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides	15
II-2.2.2. Changement de comportement des vecteurs du paludisme.....	16
III- MATERIELS ET METHODES	18
III-1. SITE D'ETUDES : VILLAGE DE TSARARANO (DISTRICT DE MAROVOAY, REGION DE BOENY).....	18
III-1.2. Situation géographique et climatique de Tsararano	19
I-1.3. Situation sociale et description des lieux d'habitations de Tsararano.....	21
III-1.4. Principales activités des villageois de Tsararano	22

III-2. METHODOLOGIE.....	23
III-2.1. Période d'étude	23
III-2.2. Méthodologie d'étude entomologique de la transmission résiduelle du paludisme	23
III-2.2.1 La méthode de capture sur homme, la méthode de référence	23
III-2.2.2 Les méthodes de mesure des déterminants de la transmission résiduelle du paludisme.....	24
III-2.3. Traitement des moustiques capturés.....	27
III-2.3.1 Traitement des moustiques sur le terrain	27
III-2.3.2 Traitement des moustiques au laboratoire.....	27
III-3. PARAMETRES ENTOMOLOGIQUES ETUDES.....	28
III-4. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES	28
IV- RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	29
IV-1. RESULTATS GLOBAUX DES CAPTURES SUR HOMME.....	29
IV-2. COMPOSITION SPECIFIQUE ET PROPORTION DU COMPLEXE <i>GAMBIAE</i>	29
IV-3. RESULTATS DE LA MESURE DES DETERMINANTS DE LA TRANSMISSION RESIDUELLE	31
IV-3.1. Variation mensuelle de la densité agressive	31
IV-3.2. Densité agressive des vecteurs dans les maisons	32
IV-3.3. Cycle d'agressivité des vecteurs dans les maisons.....	32
IV-3.4. Densité agressive des vecteurs en fonction des lieux de collecte	34
IV-3.5. Cycle d'agressivité des vecteurs en fonction de lieux de collecte	35
IV-4. TAUX D'INFECTION ET TAUX D'INOCULATION ENTOMOLOGIQUE DES PRINCIPAUX VECTEURS DU PALUDISME	36
V- DISCUSSION.....	37
VI- CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....	40
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

ANNEXE

Annexe 1 : Systématique du vecteur et de l'agent de pathogène du paludisme

Annexe 2 : Clé d'identification des anophèles adultes de Madagascar présents à Tsararano Marovoay

Annexe 3 : Méthode de détection des anophèles infectés : Technique ELISA-CSP

Annexe 4 : Méthode d'identification des membres du complexe *gambiae* par PCR

Liste des abréviations et des acronymes

ACT	Artemisinin-based combinaison Therapy
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomales
An	<i>Anopheles</i>
CSB	Centre de Santé de Base
CSP	Circums Sporozoits Proteins
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DVSSE	Direction de la Veille Sanitaire et de la Surveillance Epidémiologique
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
HBR	Human Biting Rate
HEXT	Capture sur homme à l'extérieur des maisons
HINT	Capture sur homme à l'intérieur des maisons
HTC	Hautes Terres Centrales
INSTAT	Institut National de la Statistique
IPM	Institut Pasteur de Madagascar
IPP	Institut Pasteur de Paris
IRS	Indoor residual spraying
LAV	Lutte anti-vectorielle
LLINs	Long-lasting insecticidal nets
LSM	Larves System Management
MIILD	Moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée
MINSAN/CE	Comité d'Ethique auprès du Ministère de la Santé Publique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PID	Pulvérisation intradomicilière d'insecticides

PMI	President's Malaria Initiative
PNLP	Programme National pour la Lutte contre le Paludisme
RBM	Roll Back Malaria
RMT	Residual Malaria Transmission
SLAV	Service sur la Lutte Anti-vectorielle
SP	Sulfadoxine-pyriméthamine
SSS	Service de Statistique Sanitaire
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TPI	Traitemet Préventif Intermittent
UNICEF	United Nations Children's Fund
WHO	World Health Organization

Glossaire

Anthropophile : Se dit des insectes hématophages qui se nourrissent de préférence de sang humain.

Complexe d'espèces : Se dit des espèces se ressemblant morphologiquement, tant aux stades pré-imaginaux qu'au stade imaginal, mais qui se diffèrent au point de vue génétique et biologique.

Endophage : Se dit des insectes hématophages pour lesquels la prise de sanguin se fait de préférence à l'intérieur des habitations.

Endophagie : C'est le fait de prendre le repas sanguin de préférence à l'intérieur des habitations par les insectes hématophages.

Endophile : Se dit des insectes hématophages qui se reposent dans les habitations après la prise de leur repas sanguin.

Endophilie : C'est le fait que les insectes hématophages dont les lieux de repos, après leur repas sanguin, sont intérieurs aux habitations.

Exophage : Se dit des insectes hématophages pour lesquels la prise de sanguin se fait de préférence à l'extérieur des habitations.

Exophagie : C'est le fait de prendre le repas sanguin de préférence à l'extérieur des habitations par les insectes hématophages.

Exophile : Se dit des insectes hématophages dont les lieux de repos, après leur repas sanguin, sont extérieurs aux habitations.

Exophilie : C'est le fait que les insectes hématophages dont les lieux de repos, après leur repas sanguin, sont extérieurs aux habitations.

Groupe d'espèces : Se dit des espèces dont les adultes sont identiques morphologiquement mais on peut les différencier au moins au cours d'un stade larvaire.

Hématozoaire : Se dit des parasites se nourrissant des globules rouges.

Paludisme autochtone : Il s'agit d'un cas palustre contracté par les personnes malades chez elles sans voyager dans les autres zones endémiques du paludisme ou un cas palustre non importé dans un pays étranger.

Pandémie : Epidémie qui affecte une partie significative des populations sur une région importante du globe, notamment plusieurs continents.

Satrana : Il s'agit d'une espèce de palmier de Madagascar dont les gens se servent pour leurs cases (habitation) et pour la fabrication des nattes, des corbeilles. Nom scientifique : *Bismarckia nobilis*.

Liste des figures

Figure 1: Proportions des dix principales causes de morbidité chez les enfants moins de 5ans au niveau des CSB et celles de mortalité hospitalière au niveau des CHD – Madagascar - Année 2011 (SSS, 2011).....	4
Figure 2: Relation étroite entre le paludisme et la pauvreté dans les pays endémiques (Source : RBM).....	5
Figure 3: Situation du paludisme dans le monde entre 2000 et 2015 selon l'OMS (WHO, 2005)	6
Figure 4: Carte représentant les quatre faciès de transmission du paludisme à Madagascar (Cot et al., 2006)	7
Figure 5: Le cycle biologique des anophèles selon Carnevale et Robert (2009)	8
Figure 6: Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> chez <i>Anopheles</i> et chez l'homme (Fujioka et Aikawa, 2002).....	11
Figure 7 : Carte représentant le site d'étude dans la commune de Tsararano, région Boeny	18
Figure 8 : Diagramme climatique du district de Marovoay (http://fr.climate-data.org/location/30215/)	20
Figure 9 : Caractéristique climatique journalière de Tsararano durant la période d'étude de 6 mois (environ 180 jours) entre janvier et juin 2016. B1-B3 : variations journalières, température en Dégrée C, précipitation en mm/mois, humidité en pourcentage. (http://fetchclimate2.cloudapp.net).....	20
Figure 10 : Carte représentant les lieux d'échantillonnage de moustiques à Tsararano (Deux maisons : maison 1, maison 2 ; deux lieux de culte : une église et une mosquée) avec la disposition des captureurs dans chaque site de capture (intérieur et extérieur).....	25
Figure 11: Composition spécifique des membres du complexe <i>gambiae</i> capturés entre janvier et juin 2016 après analyse par PCR en fonction de lieu de collecte (Intérieur et extérieur maison, intérieur mosquée et église).	30
Figure 12 : Variation mensuelle de la densité agressive moyenne de <i>An. arabiensis</i> et <i>An. funestus</i> entre Janvier et Juin 2016 deux mois après la mise en place des MIILD à Tsararano.	31
Figure 13 : Densité agressive moyenne des espèces vectrices, <i>An. arabiensis</i> et <i>An. funestus</i> , du paludisme à l'intérieur et à l'extérieur des maisons à Tsararano.	32
Figure 14 : Cycle d'agressivité horaire moyenne de <i>An. arabiensis</i> et celui de <i>An. funestus</i> à l'intérieur et à l'extérieur des habitations, entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano	33
Figure 15 : Densité agressive moyenne des espèces vectrices, <i>An. arabiensis</i> et <i>An. funestus</i> , du paludisme capturées à l'intérieur des maisons, de la mosquée et de l'église de Janvier à Avril 2016 à Tsararano.	34

Figure 16 : Cycle d'agressivité horaire moyenne de <i>An. arabiensis</i> et celui de <i>An. funestus</i> à l'intérieur des habitations, de la mosquée et de la mosquée entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano	35
Figure 17 : Principe de l'ELISA sandwich	d
Figure 18 : Modèle d'une plaque ELISA CSP	f
Figure 19 : Schéma de l'emplacement respectif de chaque primer spécifique sur les ADNr de 4 espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	g
Figure 20 : Gel avec des bandes d'ADN de 3 espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> (source : auteur)	1

Liste des photos

Photo 1: Type de maison fait en tôles (a) et habitat temporaire (b) à Tsararano	21
Photo 2: Rizières en saison sèche durant les cultures de riz irriguées (vary jeby) (a) et collections d'eau non accessibles durant la période de pluies (b), mais transformées en rizières lors de la période sèche à Tsararano	22
Photo 3: Une salle de vidéo (a) et des enfants en train de jouer aux jeux de cartes avant le coucher du soleil (b) à Tsararano	23
Photo 4: Vue de profil des deux lieux de cultes où les captures ont été faites : mosquée (a) et église (b)	26
Photo 5: Quelques matériels de base utilisés sur terrain : 1-Loupe binoculaire, 2-Tubes à hémolyse avec coton, 3-Sacs de capture : heures, 4-Aspirateurs à bouche, 5- Plaques de microtitration, 6-Gobelets munis de voiles, 7-Torches, 8-GPS (a) et ramassage par tranche d'heure des sacs de capture dans la mosquée(b)	26
Photo 6: Capture nocturne sur homme à l' intérieur de maison (a) et à l'intérieur de la mosquée (b)	26
Photo 7: Identification des moustiques capturés et enregistrement des données dans le cahier de terrain (a), préparation des échantillons à broyer pour l'extraction d'ADN (b).	27

Liste des tableaux

Tableau 1: Abondance relative et diversité de la faune anophélienne collectée entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano.....	30
Tableau 2 : Taux d'infection des vecteurs capturés entre janvier et juin 2016 après analyse par ELISA-CSP selon les lieux de collecte (Intérieur et extérieur maison, intérieur mosquée et église).	36

Abstract

Persistent malaria transmission has been detected in several endemic areas where effective vector control tools (LLINs, IRS) have been deployed. The aim of this study is to measure the entomological factors determining residual malaria transmission in Marovoay, Madagascar.

Entomological surveys were carried monthly between January and June 2016 with three consecutive nights catches in Tsararano, Marovoay, after mass LLINs distributions deployment. Human landing catch was performed from 3:00 PM to 9:00 AM inside and outside the houses and from 6:00 PM to 6:00 AM in the public places (mosque, church). Mosquitoes were identified morphologically and by PCR for *An. gambiae* complex. At last, plasmodium infection was detected by ELISA-CSP.

Positive behaviors favoring residual transmission have been observed in vectors, specifically in *An. Arabiensis*. This species is more exophagous (73,68% of total aggressiveness) whereas *An. funestus* occurs both indoors and outdoors. Surprisingly, *An. arabiensis* tends towards a twilight activity outside (74,47% of outdoor aggressiveness was observed before 23h) with a strong activity at dawn indoors. In addition, high rates of aggression are recorded in public places (35,76% in mosque and 37,47% in church) in the main vectors particularly in *An. Arabiensis*. These activities are much more pronounced during the periods, at dawn or in the evening, when villagers are active in these places.

Although the mechanism responsible for these behavioral adaptations in vectors is not well understood, they will probably be responsible for the residual malaria transmission.

Key words: *Anopheles*, behavioral adaptations, malaria, residual transmission, Marovoay

I- INTRODUCTION GENERALE

De toutes les maladies qui affectent l'humanité, le paludisme continue à être un des problèmes de santé publique engendrant une préoccupation majeure au niveau mondial. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 3,2 milliards de personnes résident dans les régions à risque, soit près de la moitié de la population mondiale (WHO, 2015a). La charge de la morbidité palustre est estimée en 2015, à 214 millions de cas avec plus de 438 000 décès.

Toutefois, au cours de ces 15 dernières années, les outils de lutte antipaludique disponibles ont permis de réduire considérablement le poids du paludisme dans le monde avec une réduction de plus de 47% de la mortalité palustre (WHO, 2015a). Les outils classiques de contrôle et de prévention comprennent la lutte anti-vectorielle généralement basée sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD ou MID) et sur la pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide rémanent (PID) ; la chimio-prophylaxie ; le diagnostic précoce en utilisant le test de diagnostic rapide (TDR) et le traitement des cas à base d'artémisinine (ACT) (WHO, 2015a; Hemingway et al., 2016,).

Aujourd'hui, la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme vise une pré-élimination voir même une élimination de ce fléau dans le monde d'ici les 15 prochaines années (WHO, 2015b). Toutefois pour y arriver, il faudra maintenir les efforts en cours et développer de nouveaux outils face aux obstacles de la lutte anti-vectorielle tels que la résistance aux insecticides et les changements de comportement des anophèles.

Cependant, la situation du paludisme est beaucoup plus complexe que prévue. En effet, des études entomologiques récentes ont montré que dans beaucoup de pays où les moustiquaires imprégnées ont été mises en place, quelques années après, il s'en est suivi un rebond du paludisme (Trape et al., 2011). Ce rebond du paludisme serait dû à un ensemble de facteurs dont les plus étudiés sont la résistance aux insecticides (Ranson et al., 2001 ; Hemingway et al., 2002; Wondji et al. 2009) et le changement de comportement des anophèles (Moiroux et al. 2014, Sougoufara et al. 2014). La résistance aux insecticides apparaît comme étant la première réaction d'adaptation des moustiques, et à présent l'apparition d'anophèles qui, piquent tôt la nuit, à l'extérieur (Durnez & Coosemans 2013, Killeen 2014, Nepomichene et al. 2015), avant le coucher du soleil ou après le lever du jour (Moiroux et al. 2014, Sougoufara et al. 2014) ont compliqué les situations du paludisme dans le monde. Ces deux facteurs combinés constituent probablement la base de la transmission résiduelle du paludisme causant ainsi un sérieux obstacle pour la vision d'un monde sans paludisme d'ici 2030 (AMS/OMS, 2015). Ainsi, ce nouveau concept est définie comme étant

toute forme de transmission du paludisme qui persiste dans les zones couvertes par les mesures de lutte anti-vectorielle complètes et efficaces (Durnez & Coosemans 2013, Killeen 2014).

A Madagascar, la lutte anti-vectorielle s'appuie principalement sur deux interventions : la distribution de moustiquaires à imprégnation durable (MIILD ou MID) et les pulvérisations intra-domiciliaires à effet rémanent (PID) (PNLP, 2011, 2012). De 2003 à 2011, des succès considérables ont été constatés (SSS, 2011). En effet, la morbidité a été réduite de 21,57% en 2003 à 5% en 2011 pour les enfants de moins de 5 ans et de 17,57% à 2,3% en 2011 pour les plus de 5 ans. Concernant les cas de décès liés au paludisme, le taux de décès est passé de 25,92% à 19% pour les enfants de moins de 5 ans et de 13,5% à 5% pour les plus de 5 ans (SSS, 2011). Le pays était déjà arrivé à un stade de pré-élimination du paludisme sur les Hautes Terres Centrales (HTC) au cours des années 60 (PNLP, 2011, 2012). Cependant, un niveau faible de cas autochtones du paludisme a été signalé sur les HTC en 2003 et récemment dans la plaine d'Antananarivo en 2015 (Cot et al., 2006; Rabarijaona et al., 2006, Audran, 2015). En plus, des cas épidémiques ont été enregistrés entre 2011 et 2012 dans les zones à transmission irrégulière au Sud-ouest (Kesteman et al., 2016). Dans l'écozone Nord-Ouest où se situe le site d'étude, le District de Marovoay, la prévalence parasitaire de *Plasmodium falciparum* a proportionnellement augmentée avec l'intensification de la lutte anti-vectorielle au cours des cinq dernières années, entre 2010 et 2015 (Howes et al., 2016).

C'est dans un tel contexte que ce travail est proposé afin d'étudier dans le district de Marovoay, l'impact de la transmission résiduelle du paludisme par rapport à la transmission globale à Madagascar. L'objectif de cette étude est alors de quantifier les facteurs entomologiques déterminant la transmission résiduelle du paludisme tels que la tendance des anophèles à piquer à l'extérieur des habitations (exophagie), à piquer pendant la période d'activité des gens, ainsi que leur tendance à piquer dans les lieux publics.

II- REVUE DE LA LITTÉRATURE

II-1. Généralités sur la transmission du paludisme

II-1.1. Historique du paludisme

Le paludisme (du latin *paludis*, marais), appelé aussi malaria (de l'italien *mal'aria*, mauvais air), est une maladie infectieuse d'origine parasitaire, causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* et transmise à l'homme par les piqûres infectantes des moustiques femelles du genre *Anopheles* (Laveran, 1884; MacCallum, 1898; Ross, 1898; Bruce-Chwatt, 1981; Capanna, 2006; Perkins, 2014).

Le paludisme est une maladie très ancienne, ses traces ont été déjà signalées depuis 50 000 ans (Joy et al., 2003). Le continent africain fut probablement le berceau du paludisme (Gantier, 1998; Joy et al., 2003; Liu et al., 2010). En ce moment, il continue encore de payer le prix le plus cher en termes d'impact sanitaire et socio-économique (WHO, 2003; WHO, 2015a). L'évolution de la civilisation humaine, les migrations de la population au niveau mondiale, les esclavages ainsi que les conquêtes coloniales ont facilité son extension sur toute la planète : d'abord, de l'Afrique vers la Méditerranée jusqu'en Inde et en Asie du Sud-est. Pendant le Moyen âge et jusqu'au 19ème siècle le paludisme s'est répandu dans toute l'Europe (Alvarado & Bruce-Chwatt, 1962). La maladie sévissait aussi en Amérique du sud, puis la maladie atteignait sa répartition actuelle dans les régions intertropicales selon la classification de l'OMS (WHO, 2015a) (Figure 3).

Les manifestations cliniques ont été déjà connues depuis l'antiquité. Hippocrate a donné la première description clinique détaillée du paludisme notamment son caractère cyclique et son relation avec les marécages. C'était après la découverte de l'Amérique par les Espagnols qu'ils apprirent des Indiens les propriétés fébrifuges de l'écorce de quinquina (Gantier, 1998). L'agent causal du paludisme, l'hématozoaire, a été clairement mis en évidence en 1880 par Laveran, médecin militaire français en Algérie. Et c'est ensuite en 1897 que Ross a soupçonné le rôle vecteur des anophèles. En 1898, Grassi a confirmé que l'anophèle est le vecteur du paludisme humain (Laveran, 1884; Ross, 1898; Alvarado & Bruce-Chwatt, 1962; Bruce-Chwatt, 1981; Capanna, 2006; Perkins, 2014).

Depuis cette époque, la guerre contre les anophèles a été déclenchée ; les marécages ont été asséchés et ce fut une des premières mesures de la lutte anti-vectorielle. Puis cette guerre a été de plus en plus considérable quand le premier insecticide : le DDT a été découvert en 1933 par Muller et Weismann (Darriet, 2007). Dans les années 1950, l'OMS a même lancé un programme mondial d'éradication du paludisme pour éradiquer la pandémie, car on avait pensé qu'on a découvert la meilleure arme pour vaincre le paludisme.

Aujourd’hui, l’endémie a disparu des pays tempérés où les cas décelés sont seulement des cas importés (WHO, 2015a). Pourtant, elle ne cesse malheureusement pas de causer des charges cruelles sur une grande partie de la population humaine qui vivent dans les zones intertropicales dont Madagascar.

II-1.2. Importance sanitaire et économique du paludisme

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2015)(WHO, 2015a), environ 3,2 milliards de personnes résident dans les régions à risque de paludisme, soit près de la moitié de la population mondiale. Sur la grande Île, le paludisme reste encore un problème majeur de santé publique ; selon le Service des Statistiques Sanitaires (SSS, 2011), il représente la quatrième cause de morbidité au niveau des Centres Sanitaires de Base (CSB) chez les enfants de moins de cinq ans (<5 ans) en 2011 après l'infection respiratoire aigüe ou IRA (1^{ère} cause), les maladies diarrhéiques (2^è cause) et les affections cutanées (3^è cause). Le paludisme grave et compliqué est la première cause de mortalité hospitalière tout âge confondu au niveau des Centres Hospitalières de District (SSS, 2011) (Figure 1).

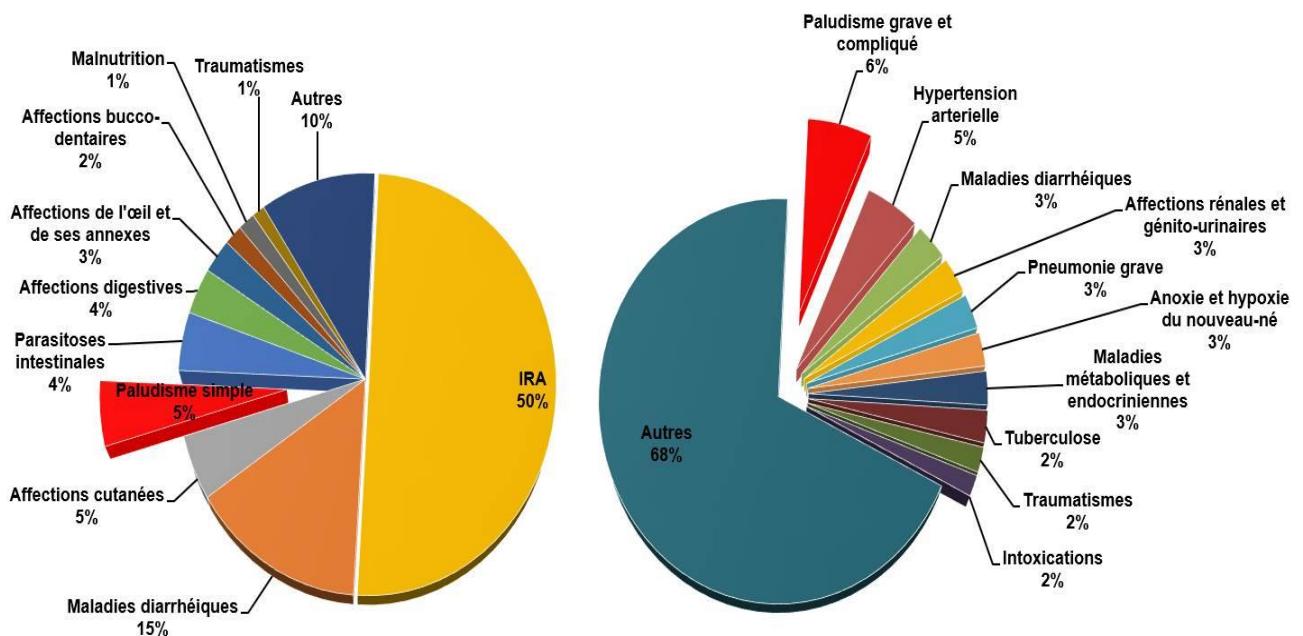
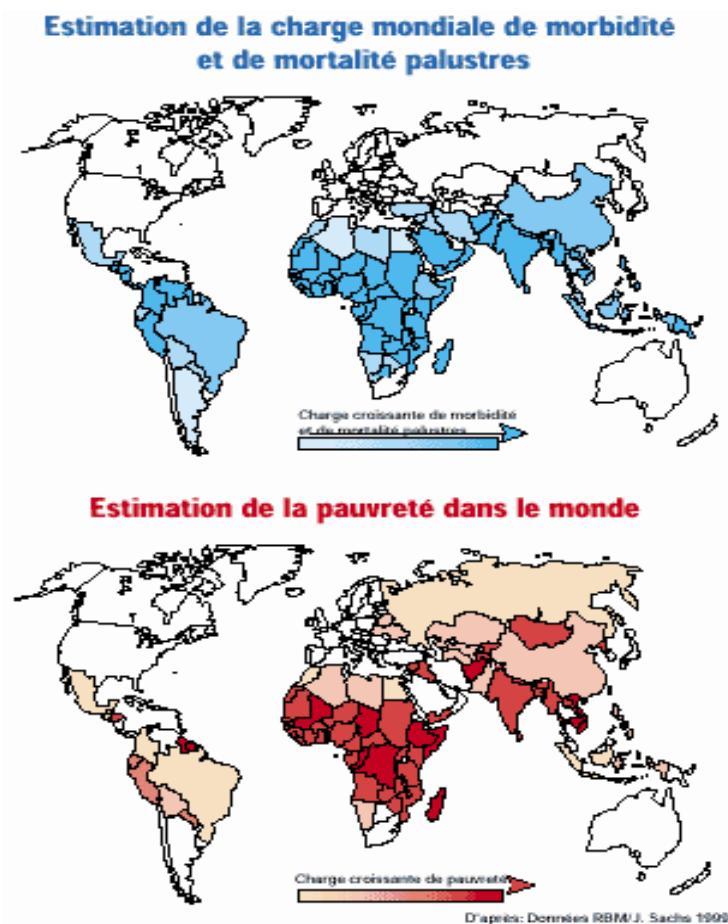


Figure 1: Proportions des dix principales causes de morbidité chez les enfants moins de 5ans au niveau des CSB et celles de mortalité hospitalière au niveau des CHD – Madagascar - Année 2011 (SSS, 2011)

Le paludisme affecte aussi la situation économique du pays. La croissance économique annuelle dans les pays de forte transmission palustre reste inférieure à celle des pays sans paludisme. Dans les pays fortement impaludés, les dépenses représenteraient jusqu'à 40% des

dépenses de santé publique, 30-50% des admissions hospitalières et jusqu'à 50% des consultations externes (RBM, 2014). Le coût indirect du paludisme implique la perte de productivité ou de revenu associée à la maladie ou au décès (Wéry & Coosemans, 1993; Guiguemdé et al., 1997; RBM, 2014) ; le paludisme et la pauvreté des ménages forment ainsi un cercle vicieux diminuant les opportunités économiques pour plusieurs habitants du monde (Asenso-Okyere et al., 2011).

A Madagascar, il est estimé que le pays a supporté à plus de 52 millions USD par an, par ses coûts économiques directes (coûts de traitement, du transport et funérailles...) et indirectes (jours de productivité perdus, d'absentéisme scolaire). La Direction de la Veille Sanitaire et de la Surveillance Epidémiologique a conclu en 2012 que le paludisme (frein au développement économique) et la pauvreté (promoteurs de la transmission) sont étroitement liés (DVSSE, 2012) (Figure 2).



Il existe une relation étonnante entre paludisme et pauvreté.

Figure 2: Relation étroite entre le paludisme et la pauvreté dans les pays endémiques
(Source : RBM)

II-1.3. Répartition géographique du paludisme

Le paludisme existe dans plus de 97 pays et territoires dont la majorité est trouvée dans les régions africaines où la maladie sévit le plus (Figure 3). On considère que les pays d'Afrique tropicale contribuent à plus de 90% à l'incidence totale du paludisme et comptent la grande majorité des décès (WHO, 2015a).

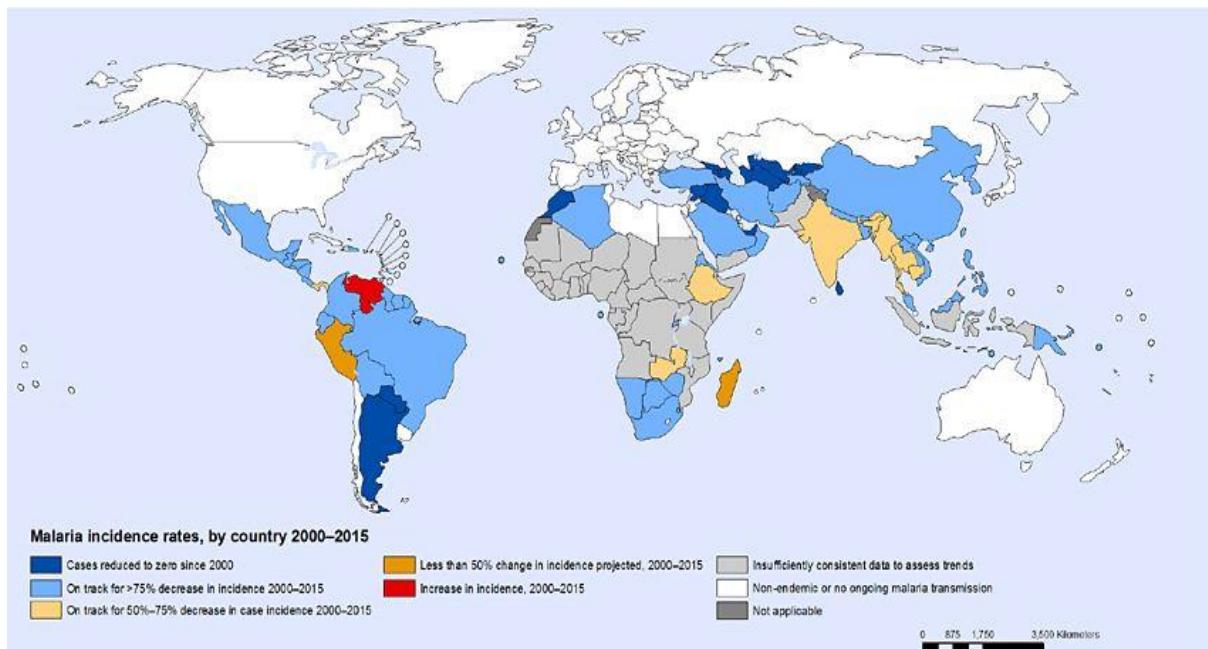


Figure 3: Situation du paludisme dans le monde entre 2000 et 2015 selon l'OMS (WHO, 2015)

Pour le cas de Madagascar, le paludisme a été connu en 1800 (Blanchy et al., 1993; PNLP, 2011). En raison de la grande diversité des écosystèmes malgaches, la maladie présente plusieurs faciès de transmission (Figure 4). Sur les côtes, le paludisme est stable et endémique avec une transmission pérenne à l'Est et saisonnière à l'Ouest. Dans les zones marges, les versants Est et Ouest, la transmission du paludisme est intermédiaire ou irrégulière. Sur les Hautes Terres Centrales et le Sud subdésertique, le paludisme est instable (ou irrégulière) et saisonnier à cause de conditions géo-climatiques irrégulières qui y règne (PNLP, 2011; 2012). Ces profils épidémiologiques de la transmission du paludisme affectent 112 districts des zones endémiques de paludisme à Madagascar : 17 districts dans 5 régions des Hautes Terres Centrales, puis 95 districts dans 17 régions des zones côtières et des zones marges (zones intermédiaires entre les côtes et les Hautes Terre) (Cot et al., 2006; PNLP 2011, 2012; SLAV/PNLP, 2015).

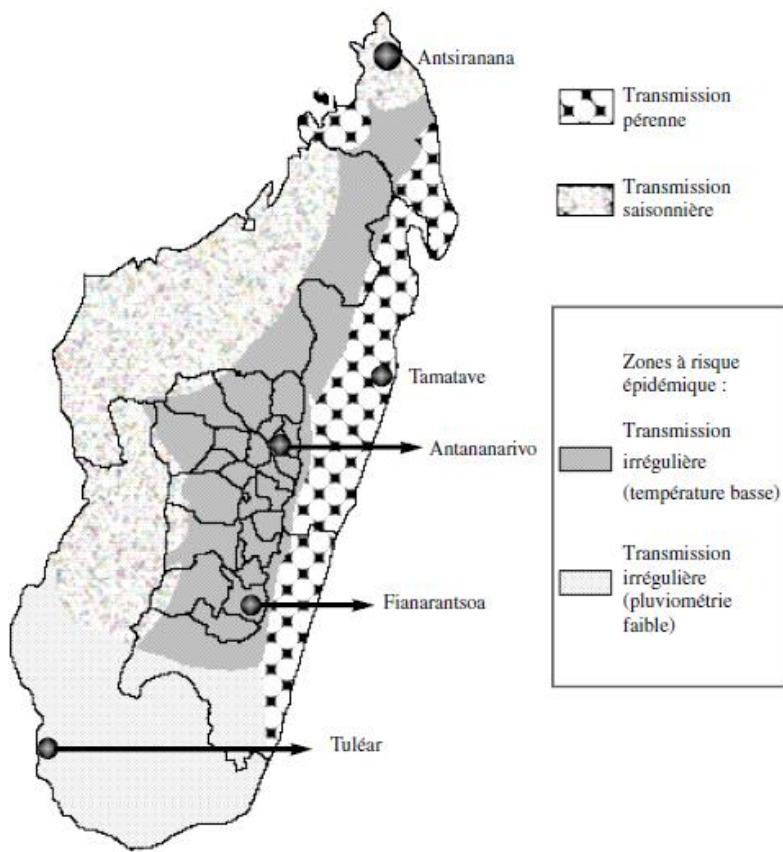


Figure 4: Carte représentant les quatre faciès de transmission du paludisme à Madagascar (Cot et al., 2006)

II-1.4. Le vecteur du paludisme : *Anopheles spp*

II-1.4.1. Les espèces anophéliennes dans le monde et à Madagascar

Quatre espèces plasmodiales sont transmises à l'homme par la piqûre des moustiques infectés appartenant au genre *Anopheles* (Mouchet, 1996; Mouchet et al., 2004a) (Annexe 1 :Position systématique de *Anopheles*).

Dans le monde, le genre *Anopheles* compte environ 484 espèces dans le monde (Harbach, 2004) mais seulement une soixantaine assure, avec plus ou moins d'efficacité, la transmission des plasmodes (Alvarado & Bruce-Chwatt, 1962; Carnevale et al., 2009). Ces espèces d'anophèles peuvent avoir des capacités vectorielles et des comportements très variables (Fontenille, 1992).

En Afrique, les vecteurs de *Plasmodium* humains appartiennent essentiellement à des complexes et à des groupes d'espèces (Fontenille et al., 2005) : le complexe *An. gambiae* dont *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* sont les plus redoutables, le groupe *An. funestus*, le groupe *An. nili*, et les deux espèces probables du complexe *An. moucheti* (Holstein, 1952;

Chauvet et al., 1968; Gillies & De Meillon, 1968; Gillies & Coetzee, 1987; Fontenille et al., 2005; Sinka et al., 2010; Coetzee et al., 2013).

Parmi les vingt-six espèces présentes à Madagascar (Grjebine, 1966; Tantely et al., 2016), seulement quatre ont été incriminées comme vecteurs du paludisme dans la grande île (Ralisoa & Coluzzi, 1987; Ralisoa, 1996; Marrama et al., 1999; Duchemin et al., 2002; Ayala et al., 2006; Tantely et al., 2016) : *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, et *An. mascarensis*. Cependant, d'après des recherches récentes des individus appartenant à l'espèce *An. merus* (Pock Tsy et al., 2003) et à l'espèce *An. coustani* (Népomichène et al., 2015) ont été trouvés positifs avec les plasmodes humaines.

II-1.4.2. La bio-écologie des anophèles

Les anophèles sont des insectes holométaboles et endoptérygotes c'est-à-dire leur développement après le stade embryonnaire (métamorphose) est complet. Le développement passe par quatre stades : zygotique, larvaires, nymphal (aquatique) et imaginal (stade adulte, aérien). L'ensemble de la vie d'un moustique femelle adulte est défini par son cycle gonotrophique. Le cycle gonotrophique est l'ensemble de tous les stades physiologiques du moustique compris entre deux repas de sang (Figure 5). La transmission du plasmodium de l'homme infecté à l'homme sain par le vecteur est possible après quelques cycles gonotrophiques permettant au plasmodium de finir son cycle sporogonique (expliqué un peu plus bas). Ce fait est important au point de vue épidémiologique du paludisme car il rythme la fréquence des contacts entre le vecteur et l'homme (Carnevale et al., 2009).

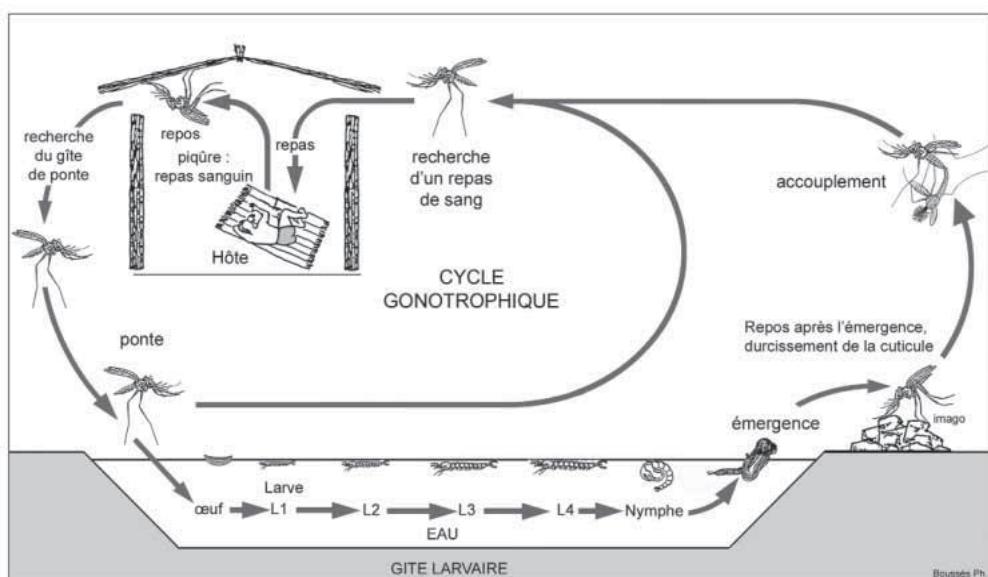


Figure 5: Le cycle biologique des anophèles selon Carnevale et Robert (2009)

II-1.4.3. La lutte actuelle contre les vecteurs du paludisme

Afin de maîtriser le paludisme et d'envisager son élimination dans le monde, la lutte contre les vecteurs reste toujours un des éléments clés de la lutte antipaludique. Elle permet de réduire le contact homme-vecteur ainsi que de réduire la densité des populations anophéliennes ou d'éliminer les vecteurs (Carnevale et al., 1992; Darriet, 2007; OMS, 2014a).

Les interventions actuelles dans la lutte anti-vectorielle (LAV) contre le paludisme sont les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MIILD ou MID) et la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent (PID). La gestion des gîtes larvaires par épandage d'insecticides ou par transformation de l'environnement (LSM) comme lutte des formes immatures est applicable dans certains contextes où les sites de reproduction des moustiques sont peu nombreux, fixes et localisables (WHO, 2015b; Hemingway et al., 2016). Les MIILD et les PID sont efficace pour contrôler les vecteurs qui piquent à l'intérieur des maisons (endophages) et/ou ceux qui reste à l'intérieur après le repas de sang (endophiles) ou au moins les vecteurs qui restent à l'intérieur des maisons avant la prise de repas sanguin. En plus de l'excellente protection personnelle, les MIILD pourraient conférer une meilleure protection communautaire s'ils sont appliqués à large couverture (Robert et al., 1989; Robert et al., 1992; Darriet, 2007; Killeen et al., 2007).

Ces méthodes ont montré leur grande efficacité dans plusieurs régions touchées par le paludisme dans le monde. Des études réalisées dans des zones à forte transmission d'Afrique par exemple, ont montré qu'après les opérations de distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides, le nombre des décès a été réduit de un cinquième, soit 17%, chez les enfants de moins de 5 ans (WHO, 2003). Au Nigeria, par exemple, le niveau de la parasitémie, la morbidité et l'incidence ont baissé respectivement de 81,4% et de 62,8% chez les enfants de 6 mois à 5 ans après le programme d'intervention (Nwankwo & Okafor, 2009). Cependant, malgré l'utilisation intensive de MIILD et de PID entraînant une diminution de la morbidité et la mortalité dans les pays couverts par ces deux méthodes de lutte anti-vectorielle, la transmission du paludisme sévit encore dans ces zones (WHO, 2014; AMS/OMS, 2015).

A Madagascar, la lutte anti-vectorielle est basée principalement sur deux interventions : la distribution des MIILD et les PID (Pietra et al., 2002; PNLP, 2011, 2012). La lutte avait commencée dès 1949 par le DDT lors du programme national d'éradication du paludisme de 1949-1960 (PNLP, 2011). Elle continue jusqu'aujourd'hui et s'est amplifiée suite à l'arrivée des MIILD avec l'augmentation de la couverture d'interventions au cours de cinq dernières années (INSTAT/PNLP/IPM, 2012, 2013). En 2002, Madagascar a adhéré au mouvement Roll Back Malaria (RBM) (PNLP, 2011, 2012). Dans ce cadre, la vulgarisation des MIILD et

des PID au Programme National de Lutte contre le Paludisme PNLP a été recommandée par l'OMS (WHO, 2003).

Ainsi, les interventions ont été programmées sous forme de campagnes : campagnes de MIILD et campagnes de PID suivant les zones et périodes d'interventions. Le choix de zones à réaliser la campagne dépend des conditions biogéographiques qui déterminent le niveau de la transmission du paludisme c'est-à-dire la stabilité ou l'instabilité de la transmission.

On distingue i) Campagne MIILD : la zone Est à transmission pérenne et la zone Ouest à transmission presque annuelle, ii) la Campagne PID : les Hautes Terres Centrales dont la transmission est instable et saisonnière et iii) Campagne MIILD et PID : les zones marges (intermédiaires) dont la transmission est instable et endémo-épidémique (PNLP, 2011, 2012; INSTAT/PNLP/IPM, 2012; INSTAT/PNLP/IPM, 2013; SLAV/PNLP, 2015).

La couverture universelle en MIILD ou en PID, le cas échéant, demeure la plus haute priorité pour les investissements dans la lutte anti-vectorielle contre le paludisme. Cependant, il existe de nombreuses situations dans lesquelles l'interruption complète de transmission de *Plasmodium* ne peut pas être atteinte par ces seules interventions, même à des niveaux élevés de la couverture et la meilleure mise en œuvre de la pratique (WHO, 2015b).

II-1.5. L'agent pathogène du paludisme : *Plasmodium spp*

II-1.5.1. Les espèces plasmodiales dans le monde et à Madagascar

Les agents causaux du paludisme sont des protozoaires appartenant à la classe des Hématozoaires et au genre *Plasmodium* (Mayne, 1938; Fujioka & Aikawa, 2002; Cox, 2010) (Cf Annexe 1 : Position systématique de *Plasmodium*). Des études révèlent la présence de parasites proches de ceux du paludisme humain chez les chimpanzés (Escalante et al., 1998), chez les oiseaux (Ricklefs et al., 2014 ; Boundenga et al., 2016) et chez d'autres mammifères (Boundenga et al., 2016; Martinsen et al., 2016). En effet, les plasmodes humaines ont été dérivées des plasmodes des gorilles (Liu et al., 2010). Quatre espèces sont associées spécifiquement à l'homme (Rodhain, 1939; Mouchet, 1999; Collins & Jeffery, 2007; Price et al., 2007; Cox, 2010) : *Plasmodium falciparum* responsable de 90% des décès dus au paludisme, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, et récemment *Plasmodium knowlesi*, une espèce connue chez les singes mais elle est capable d'infecter l'homme (White ,2008; Sabbatani et al., 2012).

Parmi les cinq espèces plasmodiales associées au paludisme humain qui existent dans le monde, quatre sont présentes à Madagascar : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*,

Plasmodium ovale et *Plasmodium malariae*, avec une prédominance de *P. falciparum* à plus de 90% (PNLP, 2011; 2012).

II-1.5.2. Le cycle biologique des plasmodies (Figure 6)

La transmission du paludisme implique trois acteurs (Desenclos et al., 2009a). En effet, le développement complet du plasmodium fait intervenir obligatoirement l'anophèle qui est l'hôte définitive (hébergeant les formes sexuées ou adultes) puis l'homme comme hôte intermédiaire (hébergeant les formes asexuées) (Mayne, 1938; Fujioka & Aikawa, 2002; Cox, 2010). De ce fait, on parle de la transmission biologique active du plasmodium à l'homme (Desenclos et al., 2009b; Delmont et al., 2012; Duvallet & De Gentile, 2012).

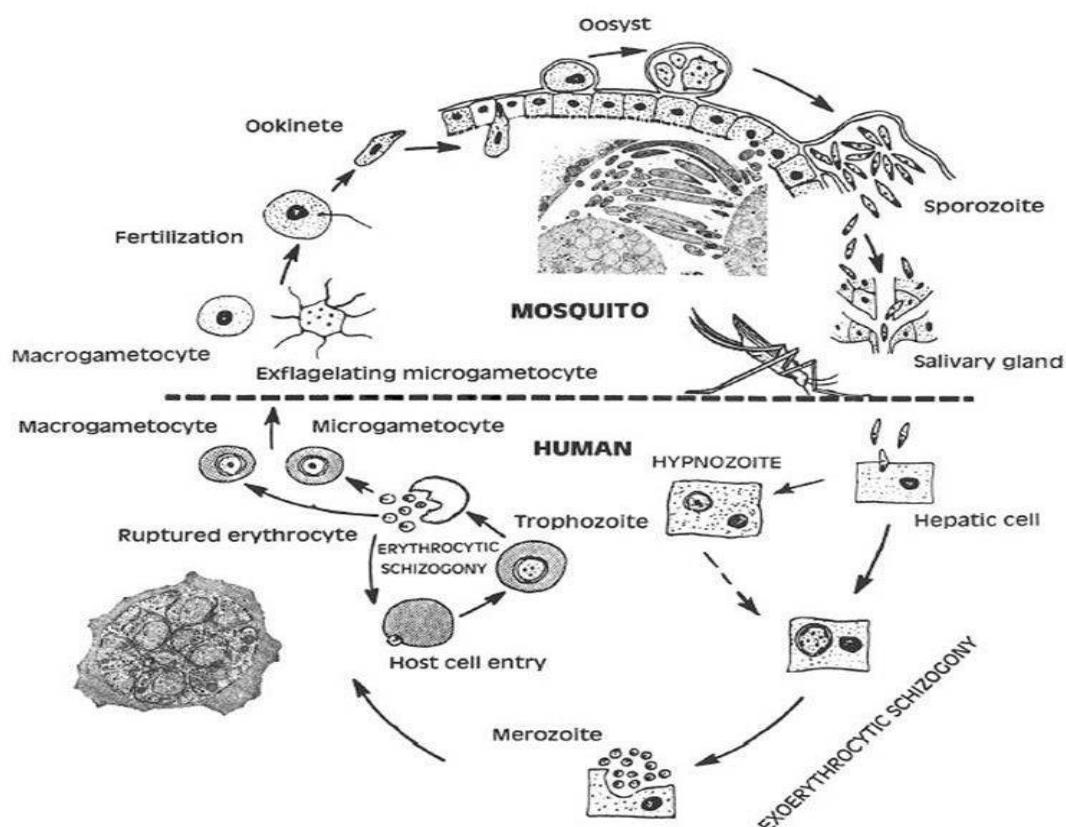


Figure 6: Cycle biologique de *Plasmodium* chez *Anopheles* et chez l'homme (Fujioka et Aikawa, 2002)

a. Cycle chez l'homme

Cycle exo-érythrocytaire (Shortt et al., 1949; Kappe & Duffy, 2006; Cox, 2010)
Le cycle de transmission débute quand l'anophèle femelle infectée injecte à l'homme les sporozoïtes. Ceux-ci gagnent le foie à partir de la circulation sanguine. Suite à des divisions

actives dans les cellules hépatiques (cellules du foie), chaque sporozoïte donne naissance, en quelques jours, à des milliers de "mérozoïtes".

Cycle érythrocytaire (Manson, 1894; MacCallum, 1898; Cox, 2010)

Les mérozoïtes regagnent la circulation sanguine après éclatement des cellules hépatiques, puis ils envahissent les globules rouges et s'y multiplient. Les globules rouges s'éclatent à leur tour, libérant ainsi les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Les mérozoïtes infectent de nouveaux globules rouges. Après quelques nombreuses invasions des globules rouges, les **gamétocytes** (formes sexuelles) sont formés.

b. Cycle chez l'anophèle (Ross, 1898; Mayne, 1938; Cox, 2010)

Lors d'un repas sanguin sur une personne infectée, l'anophèle femelle ingère les gamétocytes et le cycle sporogonique démarre. Ainsi, les gamétocytes se transforment en gamètes dans l'estomac du moustique. Leur fécondation engendre un zygote, qui se différencie en oocyste dans le tube digestif du moustique. Les oocystes produisent des sporozoïtes, qui vont migrer vers les glandes salivaires du moustique dans lesquelles ils sont prêts pour un nouveau cycle.

II-1.5.3. Signes cliniques et traitement du paludisme

Les symptômes cliniques classiques du paludisme sont caractérisés par des accès de fièvre intermittente avec frissons et sueurs, qui pourraient évoluer vers une anémie sévère (Nguefack et al., 2012), une splénomégalie et parfois un ictere (Haidaro et al., 1991). Les symptômes commencent à se manifester à partir 8 à 30 jours après l'infection (Gompel et al., 1989) lors de l'invasion des hématies du sang par les mérozoïtes, durant le deuxième stade de développement du parasite chez l'homme (Cox, 2010). Les symptômes palustres varient selon l'espèce plasmodiale : le paludisme causé par *Plasmodium falciparum* est caractérisé par une fièvre survenant toutes les 36-48 heures ou une fièvre continue (tierce maligne), celui causé par *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* provoquent une fièvre tous les deux jours (tierce bénigne), et enfin, celui causé par *Plasmodium malariae* provoque une fièvre survenant tous les trois jours (fièvre quarte) (Ascenzi, 1999; Coluzzi, 2002).

Sans traitement, le paludisme est mortel. Les personnes les plus vulnérables sont principalement les nourrissons (Nagalo et al., 2014), les enfants en bas âge (souvent de moins de cinq ans) (Ratsimbasona et al., 2012; PMI, 2014), les adultes non immuns (en particulier, les voyageurs dans les zones d'endémie palustre) (Gompel et al., 1989; Duvallet & Gentile,

2012) et les femmes enceintes (WHO, 2005). Les traitements préventifs et curatifs concernent particulièrement ce genre de personnes.

Les interventions se reposent sur deux activités principales (WHO, 2003; PNLP, 2011; 2012) : 1) l'activité préventive ou la chimio prophylaxie par diagnostic précoce (TDR ou test de diagnostic rapide) surtout chez les personnes vulnérables, et 2) l'activité curative par le traitement en masse de cas surtout lors d'une explosion épidémique. Du fait de l'augmentation de la résistance de *Plasmodium* à la chloroquine (Greenwood & Mutabingwa, 2002), les médicaments administrés pour le traitement préventif intermittent (TPI) chez les femmes enceintes sont la combinaison de *Sulfadoxine-Pyriméthamine* (SP) et thérapie à base de la combinaison d'*artémisinine* (CTA ou ACT) chez les autres personnes vulnérables et pour le traitement de cas simple. La quinine est réservée pour le traitement des cas graves.

Ainsi à Madagascar, dans la perspective de diagnostiquer et de traiter correctement les cas de paludisme à tous les niveaux de la pyramide sanitaire, le PNLP a mis à l'échelle nationale les ACT et les TDR depuis 2008. Aujourd'hui, l'utilisation des TDR et ACT est effective dans tous les Centres de Santé de Base (CSB) avec une planification d'extension au niveau communautaire. De même, les femmes enceintes bénéficient des traitements préventifs intermittents TPI avec la combinaison SP. L'enquête sur les indicateurs du paludisme 2011 (INSTAT/PNLP/IPM, 2012) rapporte que moins de 42% des femmes enceintes ont pris des traitements préventifs intermittents (TPI) au cours de leur dernière grossesse. La part la plus importante (90%) concerne les femmes enceintes (INSTAT/PNLP/IPM, 2012). Le traitement de la fièvre à domicile chez les enfants moins de 5 ans par des antipaludéens est une des stratégies recommandées par l'OMS et l'UNICEF, pour réduire de 50% la mortalité palustre (DVSSE, 2012; INSTAT/PNLP/IPM, 2013).

II-2. Généralités sur la transmission résiduelle du paludisme

II-2.1. La transmission résiduelle du paludisme : un nouveau concept, un vieux problème

Au cours même de la réalisation de la stratégie d'éradication mondiale du paludisme dans les années 60, la persistance de la transmission paludéenne a été déjà enregistrée dans les pays endémiques du paludisme (Mouchet, 1963). La résistance des vecteurs aux insecticides utilisés lors des campagnes de lutte anti-vectorielle (PID/AID) a été le plus connu comme cause de cet échec (Davidson, 1963; Hamon & Garrett-Jones, 1963; Diabaté et al., 2001). Pourtant, des études ont révélé dans certaines régions endémiques que certains vecteurs locaux sont capables d'assurer un degré de transmission du paludisme dû au comportement des vecteurs même s'ils sont sensibles aux insecticides utilisés. On parle de changement comportemental des vecteurs lié ou non à la pression des insecticides à l'intérieur des maisons et leur comportement naturel (exophagie, exophilie) (Muirhead-Thomson, 1960; Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014; WHO, 2015b). La *transmission résiduelle du paludisme* ou « residual malaria transmission » (RMT) est donc définie ici comme étant toutes les formes de transmission du paludisme qui persistent après une couverture universelle avec des interventions efficaces au moyen de MIILD et PID contenant des molécules actives auxquelles la population des vecteurs locaux sont complètement susceptibles (Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014).

L'existence de la RMT est déjà enregistrée dans plusieurs régions endémiques du paludisme du monde (Durnez & Coosemans, 2013) : en Afrique, en Asie et en Amérique latine. Particulièrement, elle est plus marquée dans les régions paludiques de l'Afrique dû au fait que les vecteurs majeurs de *Plasmodium* y appartiennent au complexe *gambiae* (Durnez & Coosemans, 2013). Ce complexe d'espèce est capable de s'adapter à des conditions environnementales variées (Muriu et al., 2008; Arcaz et al., 2016).

Dans de nombreux endroits, la transmission résiduelle est ou sera d'une ampleur suffisante pour rendre l'élimination du paludisme impossible si on utilise uniquement ces outils d'intervention classique. Pour surmonter les limites actuelles à l'impact potentiel de bonnes MIILD et PID, il faut mettre au point de nouvelles méthodes de lutte anti-vectorielle ou des méthodes améliorées (Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014).

II-2.2. Déterminants entomologiques de la transmission résiduelle du paludisme

Les déterminants entomologiques sont les facteurs liés aux vecteurs qui pourraient être impliqués dans la transmission résiduelle du paludisme. Dans la plupart des temps, on associe toujours la persistance de la transmission du paludisme ou de l'échec d'une intervention à la résistance aux insecticides. Pourtant, il est rare de les associer au comportement, qu'il s'agit d'un changement ou non, des vecteurs (Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014). Plusieurs études ont montré que le changement de comportement chez les vecteurs est de loin la principale cause de la RMT et définit la limite fondamentale des outils de LAV bien que les vecteurs locaux sont physiologiquement sensibles aux insecticides utilisés (Killeen, 2014). Cette étude va se focaliser sur l'adaptation comportementale chez les vecteurs du paludisme.

II-2.2.1. Résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides

Selon l'OMS, la résistance aux insecticides a été définie comme « la résistance d'une souche ou (race) d'un insecte vis-à-vis d'un insecticide correspond au développement d'une capacité de tolérer des doses de toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus d'une population normale de la même espèce » (OMS, 2004a).

On distingue trois catégories de mécanisme de résistance (Haubrige & Amichot, 1998) :

- **La résistance comportementale** : on distingue deux catégories de mécanismes comportementaux de “résistance”, qui permettent aux individus d'éviter le contact avec le produit toxique ou qui limitent la durée de ce contact (Haubrige & Amichot, 1998). Il y a la résistance associée à l'immobilité de l'insecte (Sparks et al., 1989), et la résistance associée à la mobilité de l'insecte (Davidson, 1953 ; Lockwood et al., 1984).
- **La résistance physiologique** : Des modifications affectant la physiologie de l'insecte peuvent être à la base de la résistance aux pesticides : la cinétique de pénétration, la séquestration ou l'excrétion. On a la modification de la cinétique de pénétration de l'insecticide à travers la cuticule (Stone, Brown, 1969), et l'excrétion des insecticides (Chaudry, 1997)
- **La résistance biochimique** : c'est le phénomène de résistance le plus important parmi les trois qui existe (Haubrige & Amichot, 1998).
 - **Augmentation de l'activité des systèmes de détoxication** : De nombreuses toxines possèdent un caractère lipophile et peuvent devenir plus hydrosolubles par biotransformation dans l'insecte, et de ce fait plus facilement excrétables.

Les possibilités qu'ont les insectes de dégrader les insecticides sont associées aux systèmes enzymatiques de détoxication (Haubrûge & Amichot, 1998).

- **Modification des cibles :** Plus de 90 % des insecticides de synthèse sont des organophosphorés, des carbamates et des pyréthrinoïdes, avec des sites d'action localisés dans le système nerveux. Parmi les cibles moléculaires, les trois plus importantes sont : le canal sodium “voltage-dépendant” (Csvd), l’acétylcholinestérase (AChE) et le récepteur de l’acide gamma aminobutyrique (GABA_R) (Haubrûge & Amichot, 1998).

Des études récentes ont apporté des réponses plus précises sur la nature et la localisation des mutations impliquées, ainsi que sur les réactions biochimiques responsables des processus de détoxication des insecticides (Darriet, 2007).

II-2.2.2. Changement de comportement des vecteurs du paludisme

Les différentes espèces de vecteurs susceptibles de transmettre le paludisme malgré le degré élevé de couverture par les MIILD et PID présentent une ou plusieurs des caractéristiques comportementales ci-dessous qui leur permettent d'échapper à une exposition fatale aux insecticides appliqués à l'intérieur des habitations. Ces formes d'adaptation ne sont pas toujours dues au changement de comportement chez les anophèles comme il est observé dans la majorité de cas. Il a été montré que, même avant l'utilisation généralisée de mesures de lutte anti-vectorielle, une hétérogénéité de comportement existait déjà entre et au sein des espèces. De ce fait, les moustiques ont différentes possibilités d'échapper à l'effet létal ou à l'action excito-répulsive des insecticides utilisés dans les MILD ou PID (Mouchet, 1963; Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014; Killeen & Chitnis, 2014; Moiroux et al., 2014; Sougoufara et al., 2014; Killeen et al., 2016) :

- Elles ont tendance à l'exophagie, ce qui atténue la protection personnelle et toute protection communautaire potentielle assurée aux humains dormant sous des MIILD ou dans des habitations traitées avec des PID ;
- Elles ont tendance à l'exophilie, leur évitant ainsi le contact avec les surfaces traitées à l'insecticide des MIILD ou avec les murs ou les toits traités par PID ;
- Elles sortent précocement après avoir piqué à l'intérieur des habitations, minimisant ainsi leur exposition à l'insecticide ;
- Elles peuvent chercher d'autres endroits hors de la portée des MIILD ou PID où il y a des hôtes disponibles (humains ou animaux domestiques) et non protégés ;

- Elles ont tendance à piquer tôt ou tard dans la nuit ou même piquer avant le coucher du soleil ou après le lever du jour périodes auxquelles les gens sont encore actifs surtout ceux qui sont à l'extérieur des maisons protégées par les MIILD ou PID.
- Elles préfèrent piquer des animaux plutôt que des humains, ce qui permet aux moustiques de minimiser le contact avec les MIILD et les PID.

Les causes et les mécanismes induisant ces changements de comportement chez les vecteurs ne sont pas encore bien élucidés. Qu'il s'agit de la résistance comportementale ou de l'expression de traits comportementaux préexistantes ou une combinaison des deux (Govella et al., 2013; Killeen & Chitnis 2014). Cependant, les MIILD et PID peuvent sélectionner chez les populations de vecteurs, des comportements qui sont principalement responsables de la transmission résiduelle. Elles devront être délibérément et spécifiquement ciblés avec de nouveaux outils de lutte anti-vectorielle pour obtenir l'élimination du paludisme (Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014).

III- MATERIELS ET METHODES

III-1. Site d'études : Village de Tsararano (district de Marovoay, Région de Boeny)

Les enquêtes entomologiques ont été effectuées dans le village de Tsararano, Chef-lieu de la commune de Tsararano et appartenant au district de Marovoay situé dans la région du Boeny au Nord-Ouest de Madagascar (Figure 7).

Le choix du site d'étude a été basé sur les critères suivants :

i) Marovoay fait partie d'un faciès épidémiologique du paludisme où la transmission est considérée comme stable presque pendant toute l'année (Laventure et al., 1995; Cot et al., 2006). ii) C'est une zone dont la lutte anti-vectorielle est basée sur la distribution de MIILD (INSTAT/PNLP/IPM, 2012; 2013; SLAV/PNLP, 2015). iii) Marovoay est le deuxième grenier du riz à Madagascar après la région d'Alaotra, sachant que la prévalence du paludisme est associé à la présence des rizières (Laventure et al., 1995; Boelee, 2003; Boudin & Robert, 2003). iv) Des études antérieures ont montré la présence de vecteurs du paludisme dans ce site d'étude (Duchemin et al., 2001). v) et la présence de cas de paludisme (TDR positif) même après une récente distribution de MIILD (CSB II Tsararano, 2016).

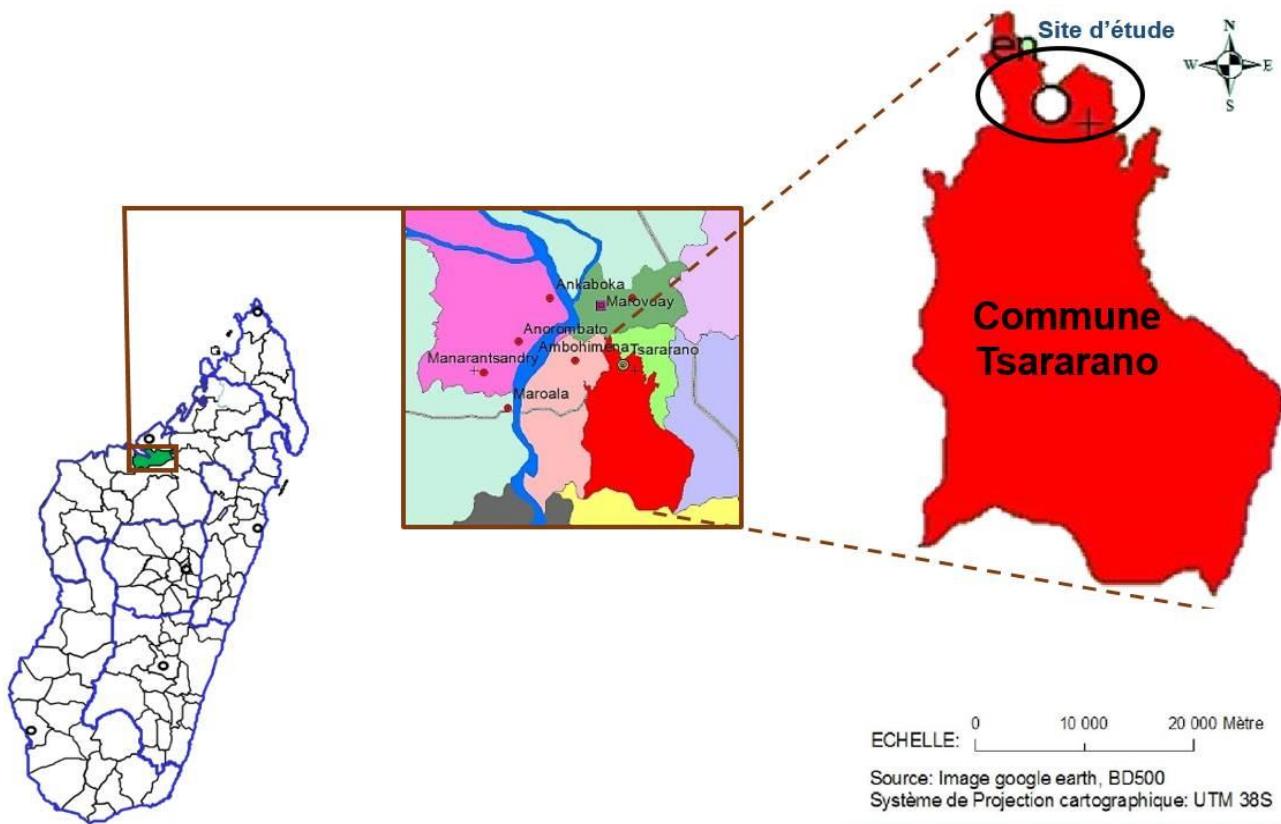


Figure 7 : Carte représentant le site d'étude dans la commune de Tsararano, région Boeny

III-1.2. Situation géographique et climatique de Tsararano

La commune de Tsararano ($S\ 16^{\circ}10'42.4''$, $E\ 046^{\circ}40'13.6''$) se trouve à 10 Km au Sud-Est de Marovoay et à environ 90 Km de Mahajanga. Elle s'étend sur 180 Km^2 de superficie avec une altitude moyenne autour de 20 m (Figure 7). Le village de Tsararano a été construit sur une plaine entouré par des zones rizicoles, des grandes collections d'eaux permanentes ou temporaires (marais, marécages) transformées en champs de rizières pendant les saisons sèches, qui constituent des gîtes potentiels supplémentaires des larves de moustiques au cours de cette saison (Photo 2a et 2b).

Le village bénéficie d'un climat subhumide chaud (Jeanne et *al.*, 2002) et présente deux saisons : une saison sèche de 7 mois (d'Avril à Octobre) et une saison chaude et pluvieuse de 5 mois (de Novembre à Avril). La température moyenne annuelle est de $26,5^{\circ}\text{C}$ avec des minima de 20°C à 24°C en Juin et en Juillet (mois les plus froids) et des maxima de 30°C à 34°C en Octobre et en Novembre (mois les plus chauds). La pluviométrie moyenne annuelle varie entre 1000 mm et 1502 mm dont les maxima sont observés pendant le mois de Janvier où la précipitation varie entre 1200 mm et 1502 mm (Figure 8).

Au cours de la période d'étude à Tsararano, le climat a été théoriquement optimal pour le développement et la survie des moustiques : la température moyenne varie entre $21,40^{\circ}\text{C}$ – $29,83^{\circ}\text{C}$ avec une moyenne annuelle de $26,49^{\circ}\text{C}$. La pluviométrie moyenne est de 543 mm avec des variations pouvant atteindre 2900mm par mois. L'humidité relative moyenne varie généralement entre 70% et 80% avec une moyenne de 82,4% (Figure 9).

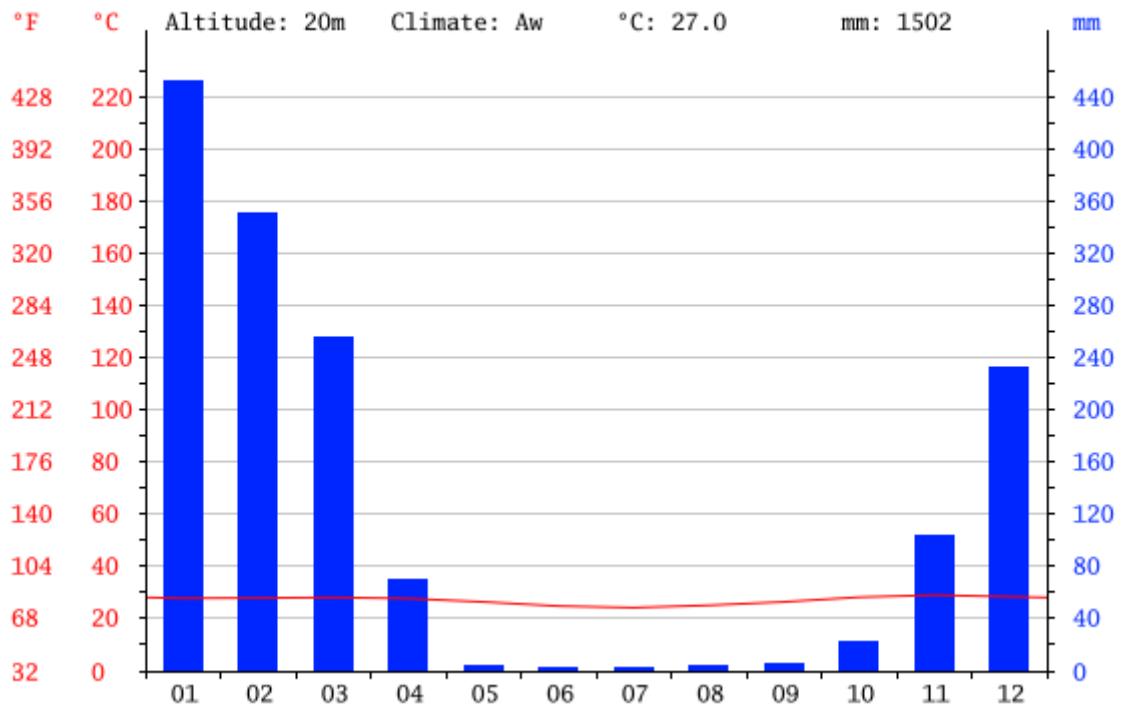


Figure 8 : Diagramme climatique du district de Marovoay (<http://fr.climate-data.org/location/30215/>)

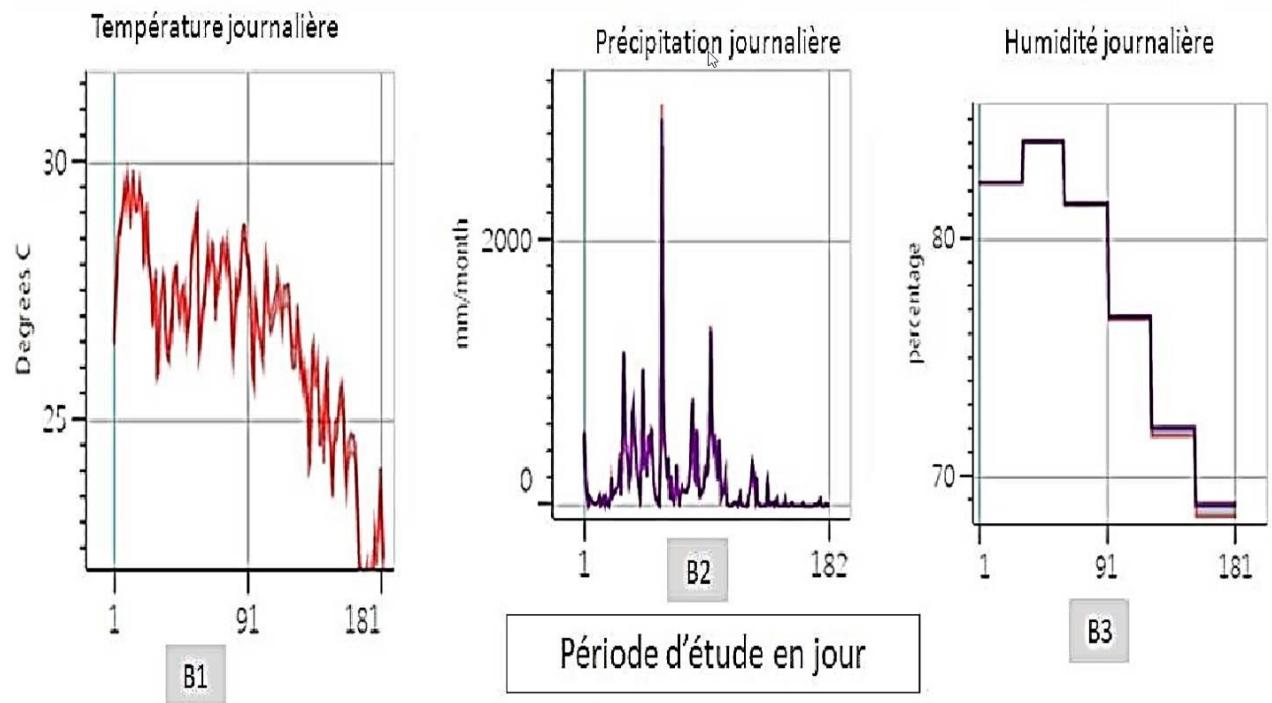


Figure 9 : Caractéristique climatique journalière de Tsararano durant la période d'étude de 6 mois (environ 180 jours) entre janvier et juin 2016. B1-B3 : variations journalières, température en Degrée C, précipitation en mm/mois, humidité en pourcentage. (<http://fetchclimate2.cloudapp.net>)

I-1.3. Situation sociale et description des lieux d'habitations de Tsararano

Parmi les 13736 habitants recensés dans la commune de Tsararano, le village de Tsararano regroupe plus de 2000 habitants répartis dans cinq quartiers : Antananjiva, Antanambao, Ambalapamba, Ambalakida, Ambalavary. La population est composée principalement de sept groupes ethniques : Sakalava, Betsileo, Antesaka, Antefasy, Antandroy, Merina et Tsimihety.

Le village est constitué par différents types de maisons allant de maisons faites de briques à des maisons où les murs sont faits en tôles, en terre battue, de bambous ou de bois. Les toits sont faits en tôles (Photo 1a), pailles ou en « satrana ». Les pièces sont plus sombres dans les maisons où les murs sont faits en terre battue ou de briques avec des toits en pailles ou en satrana. Dans les rizières, des habitats temporaires faites de pailles « tronomololo » sont présents et servent à ceux qui gardent le riz dans les champs contre les voleurs la nuit et contre certains oiseaux (dans la famille des hérons) qui chassent des poissons dans les rizières et détruisent ainsi les tiges de riz (Photo 1b).



Photo 1: Type de maison fait en tôles (a) et habitat temporaire (b) à Tsararano

III-1.4. Principales activités des villageois de Tsararano

L'agriculture tourne autour de la culture du riz qui constitue les principales sources de revenus des villageois et leur alimentation de base comme tous les Malagasy. On distingue en général quatre tours de production ou saisons de culture de riz chaque année. Ces tours sont répartis dans trois typologies de riziculture : 1) la riziculture pluviale : le « vary asara » s'effectuant pendant les périodes de pluie entre Janvier et Avril, 2) la riziculture semi irriguée : le « vary atriatty » entre Avril et Juillet (pendant les périodes fraîches), 3) les rizicultures irriguées : le premier, le « vary jeby » entre Juillet et Septembre/Octobre, et la seconde, le « vary dimby alitra » entre Octobre et Décembre (pendant les périodes sèches) (Photo 2a et 2b).

Les autres cultures vivrières telles que la culture de maïs, de manioc et d'arachide sont saisonnières et constituent avec l'élevage des activités secondaires et complémentaires de sources d'argent pour la population.

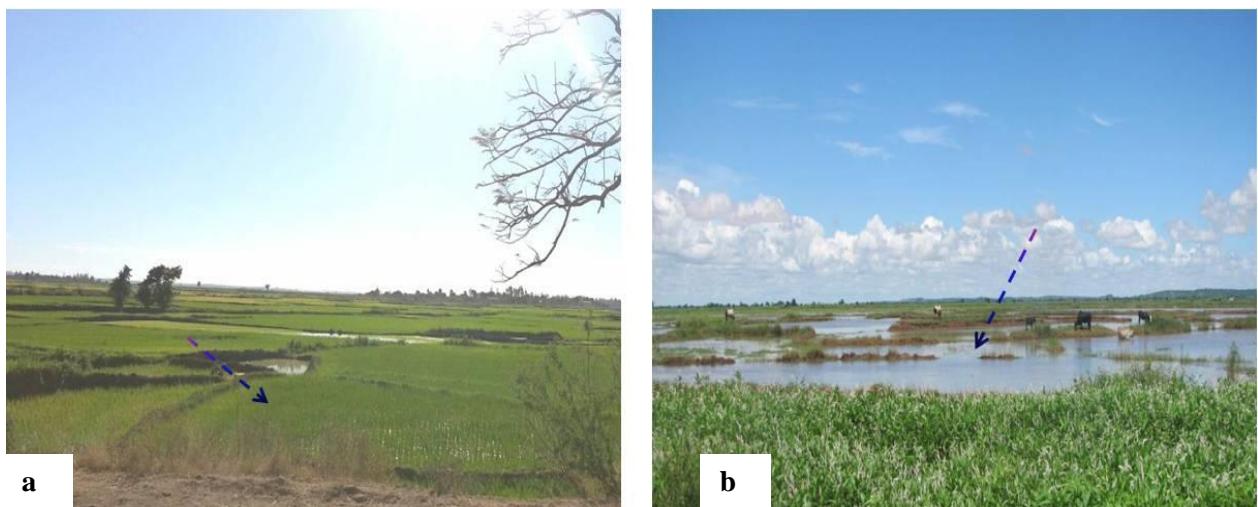


Photo 2: Rizières en saison sèche durant les cultures de riz irriguées (vary jeby) (a) et collections d'eau non accessibles durant la période de pluies (b), mais transformées en rizières lors de la période sèche à Tsararano

Les principaux animaux d'élevage observés dans le village sont les bovins, les moutons, les chèvres, les porcs, les oies, canards, les poules, etc. mais l'élevage des bovins est le plus dominant.

Les activités nocturnes commencent généralement vers 18h et finissent vers 22h. Ce sont surtout des activités de loisirs comme la projection de film dans les salles de vidéos, les réunions dans les bars, les jeux de cartes sur la place publique (Photo 3a et 3b), etc... Mais en particulier les activités dans les lieux de cultes (mosquée, églises) s'effectuent vers la fin de

l'après-midi jusqu'au début du soir (entre 17h et 20h) et vers la fin de la nuit jusqu'au lever du jour (entre 04h et 07h).

Le jour du marché dans le village de Tsararano se passe tous les samedis et où les marchands ambulants, qui passent de village en village, arrivent la nuit pour réserver leur place et dorment sur la place publique jusqu'au matin. Ils sont non protégés par les MIILD.

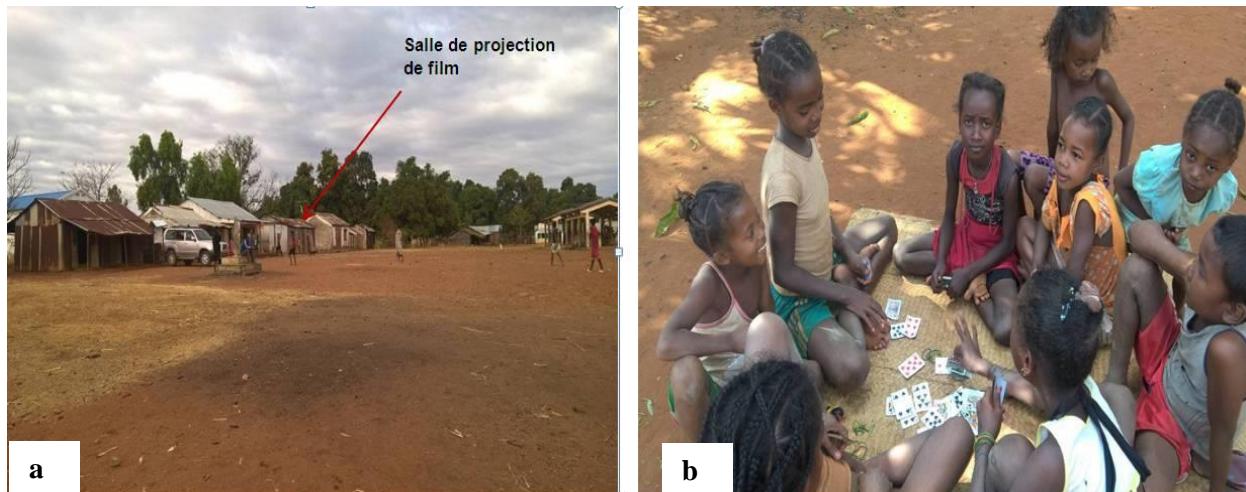


Photo 3: Une salle de vidéo (a) et des enfants en train de jouer aux jeux de cartes avant le coucher du soleil (b) à Tsararano

III-2. Méthodologies

III-2.1. Période d'étude

Les collectes de moustiques ont été faites tous les mois entre Janvier et Juin 2016 pendant 3 nuits et 3 jours consécutifs.

III-2.2. Méthodologie d'étude entomologique de la transmission résiduelle du paludisme

La méthode d'étude adoptée est la méthode de capture sur homme (WHO, 1973; WHO, 1975; Bitsindou, 1986; OMS, 2014a). Cette étude bénéficie de l'accord du comité national d'Ethique auprès du Ministère de la Santé publique (N° 122 – MSANP/CE).

III-2.2.1 La méthode de capture sur homme, la méthode de référence Principe

Cette méthode a longtemps été considérée par l'OMS comme la méthode de référence pour l'échantillonnage des populations anophéliennes agressives vis-à-vis de l'homme. Développée par KERR (1933) en Afrique de l'Ouest, elle a été améliorée et standardisée par KUMM et NOVIS (1938) en Amérique Latine puis par HADDOW (1954) en Afrique de

l'Est. Le principe est simple, l'homme sert à la fois d'appât et de « captureur ». Assis sur une chaise ou par terre et muni d'une lampe torche, il attrape les moustiques qui se posent sur ses jambes dénudées à l'aide de tubes individuels sans attendre l'engorgement (Photo 6a et 6b).

Mode opératoire

Les captures nocturnes de moustiques ont été faites par deux équipes de deux captureurs volontaires formés pour ce travail, travaillant chacun une heure sur deux. Le « captureur » reste dans l'obscurité, assis et à jambes nues, muni d'une lampe torche qu'il allume dès qu'il perçoit le contact d'un moustique prêt à se gorger (Photo 6a et 6b). C'est en ce moment qu'il surprend le moustique avec un tube à hémolyse qu'il bouche avec du coton avant de l'introduire dans le sac correspondant à l'heure et au lieu de capture. Les sacs de capture ont été ramassés par tranche d'heure dans chaque site de capture (Photo 5b). Des rondes à des heures variables ont été faites pour s'assurer que les captureurs ont suivi toutes les consignes.

III-2.2.2 Les méthodes de mesure des déterminants de la transmission résiduelle du paludisme

Au total, 4 postes de capture sur homme ont été installées dans les maisons (Figure 10) : 2 à l'intérieur des maisons et 2 à l'extérieur. Dans chaque poste, deux captureurs se relaient une heure sur deux entre 18h et 06 heures du matin : c'est la capture classique. Elle permet de mesurer le comportement exophage et le décalage d'heure d'agressivité nocturne des vecteurs étant considérés comme les deux premiers déterminants de la transmission résiduelle du paludisme.

Pour mesurer les autres déterminants de la transmission résiduelle, des captures de moustiques sont faites au-delà des heures habituelles, c'est-à-dire 3 heures avant (15h) et trois heures après (09h) les captures classiques à l'intérieur comme à l'extérieur des habitations afin de mesurer le degré d'agressivité des populations de vecteurs en dehors de la nuit.

Au même moment de la capture classique, des captures de moustiques se font uniquement à l'intérieur des mosquées et églises (Figure 10, Photo 4a et 4b) entre 18h et 06h du matin afin de mesurer la déviation de l'agressivité des vecteurs vers les lieux publics où les MIILD sont absentes. Cette étude qui entre dans le cadre de suivi longitudinal implique la considération des deux maisons et les deux lieux publics sélectionnés fixe.

Matériels de capture (Photo 5a)

- Tubes à hémolyse

- Sacs collecteurs

- Lampes torches

- Chronomètres

- Coton

- Tabourets

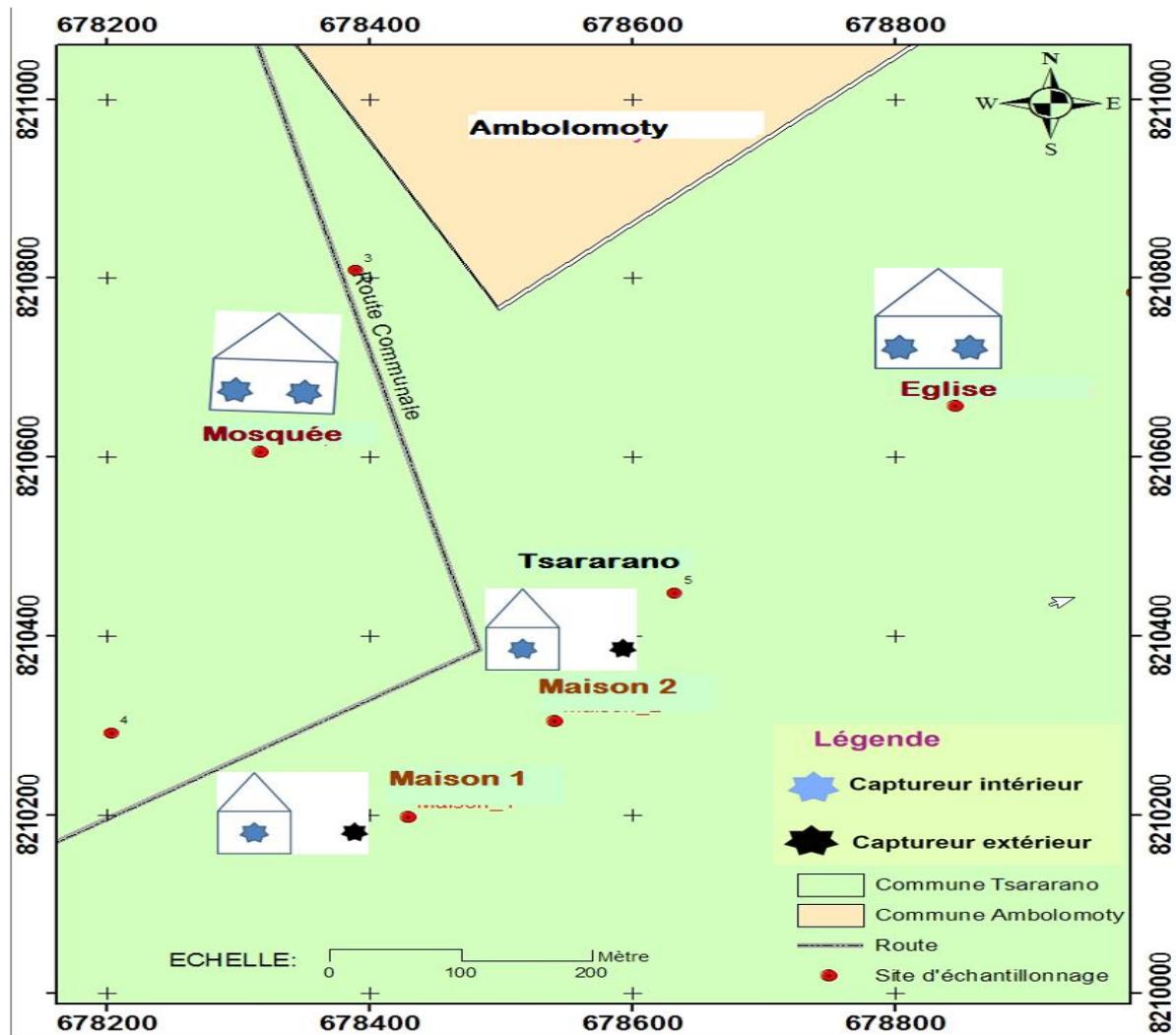


Figure 10 : Carte représentant les lieux d'échantillonnage de moustiques à Tsararano (Deux maisons : maison 1, maison 2 ; deux lieux de culte : une église et une mosquée) avec la disposition des captureurs dans chaque site de capture (intérieur et extérieur).



a



b

Photo 4: Vue de profil des deux lieux de cultes où les captures ont été faites : mosquée (a) et église (b)

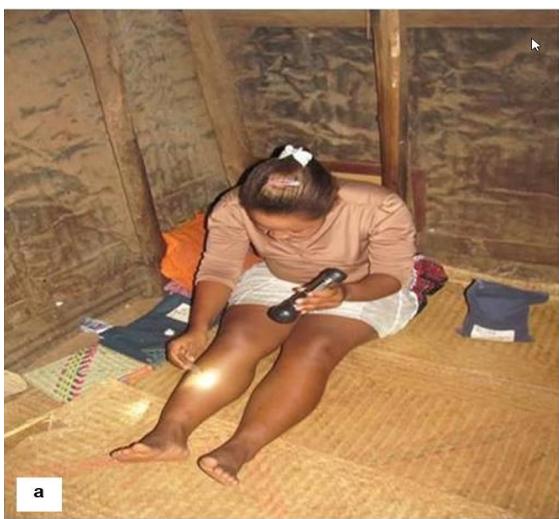


a



b

Photo 5: Quelques matériels de base utilisés sur terrain : 1-Loupe binoculaire, 2-Tubes à hémolyse avec coton, 3-Sacs de capture : heures, 4-Aspirateurs à bouche, 5-Plaques de microtitration, 6-Gobelets munis de voiles, 7-Torches, 8-GPS (a) et ramassage par tranche d'heure des sacs de capture dans la mosquée(b)



a



b

Photo 6: Capture nocturne sur homme à l' intérieur de maison (a) et à l'intérieur de la mosquée (b)

III-2.3. Traitement des moustiques capturés

III-2.3.1 Traitement des moustiques sur le terrain

Après chaque séance de capture, les moustiques sont acheminés au niveau du bureau du Fokotany qui fait office de laboratoire sur le terrain où ils sont tués au chloroforme, puis identifiés morphologiquement à partir de clés de détermination (Grjebine, 1966; Fontenille, 1989). Les anophèles femelles sont ensuite dénombrés et classées selon le lieu et l'heure de capture avant d'être individuellement placées dans une plaque de microtitration pour des études complémentaires, la détection d'infection chez les anophèles par ELISA-CSP et l'identification des membres du complexe *gambiae* par PCR diagnostique, au laboratoire de l'Institut Pasteur de Madagascar (Photo 7b). Les données sont enregistrées dans un cahier sur le terrain (Photo 7a).



Photo 7 : Identification des moustiques capturés et enregistrement des données dans le cahier de terrain (a), préparation des échantillons à broyer pour l'extraction d'ADN (b).

III-2.3.2 Traitement des moustiques au laboratoire

La tête et thorax de chaque anophèle sont utilisés pour chercher les protéines sporozoïtiques par ELISA CSP ou Enzym-linked immunosorbent assay Circums Sporozoits Proteins nécessitant deux anticorps monoclonaux de capture (ELISA sandwich) (Burkot et al., 1984; Wirtz et al., 1987) (Cf. annexe 3). Les pattes et les ailes pour extraire les ADN génomiques avec la méthode standard de PCR-ADNr (Polymerase Chain Reaction) du complexe *gambiae* (Collins et al., 1987; Scott et al., 1993; Collins & Paskewitz, 1996), selon la technique d'extraction d'ADN au Chelex 100 à 5% (Musapa et al., 2013) et par utilisation du Dream Taq Master Mix (Cf. annexe 4). Les autres moustiques sont conservés dans des microtubes Eppendorf contenant de l'alcool.

III-3. Paramètres entomologiques étudiés

Plusieurs paramètres ont été étudiés :

- **l'abondance et la diversité anophélienne** : Elle représente la richesse anophélienue rencontrait dans la région et permet également de les dénombrer.
- **la densité agressive (ma), c'est le taux de piqûres sur homme ou Human Biting Rate (HBR)** est estimée par le nombre de moustiques capturés par homme, par nuit et par jour dans chaque espèce. On déterminera graphiquement les variations mensuelles du *ma*, et selon le lieu de collecte, les densités agressives du cycle horaire d'agressivité des espèces vectrices étudiées. Ceci permettra d'identifier le lieu et la période maximale d'agressivité de chaque espèce et de dépister les remplacements d'une espèce par une autre.
- **le taux d'infection ou indice sporozoïtique (s)**, exprimé en pourcentage, est estimé par le rapport du nombre de moustiques positifs en ELISA CSP sur le nombre total de moustiques testés multiplié par 100.
- **le taux d'inoculation entomologique (TIE)** : est estimé par le nombre de piqûres infectantes par homme pour 6 mois. Le TIE sera déterminé par le produit du taux de piqûre sur l'homme avec l'indice sporozoïtique (%) divisé par 100.
- **la composition spécifique et la proportion du complexe *gambiae*** sont déterminées suite à l'analyse des résultats obtenus par les moustiques passés à la PCR diagnostique.

III-4. Gestion et analyse des données

Toutes les références des moustiques ainsi que les résultats des différentes analyses sont saisis dans une base de données. Les noms des genres sont saisis selon la liste d'abréviation de genres de Reinert (2009) : *Anopheles* = *An.*; *Aedeomyia* = *Ad.*; *Aedes* = *Ae.*; *Culex* = *Cx.*; *Mansonia* = *Ma.* et *Uranotaenia* = *Ur.*

Les taux d'agressivité et les taux d'infestation sont calculés en utilisant les méthodes standards (FONTENILLE et al., 1997a ; 1997b ; LEMASSON et al., 1997). Les tests d'homogénéité des pourcentages sont effectués par le test classique du χ^2 et le seuil de signification fixé à 0,05 par le logiciel R (R core Team (2016). R : A language & environement for statistical computing. R Foudation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>). Les comparaisons des moyennes par le test U de Mann et Whitney classique (test non paramétrique) sont utilisées pour confirmer les tests d'homogénéité du χ^2 .

IV- RESULTATS ET INTERPRETATIONS

IV-1. Résultats globaux des captures sur homme

Durant les six mois d'enquêtes entomologiques à Tsararano, entre Janvier et Juin 2016, 599 moustiques femelles adultes appartenant au genre *Anopheles* ont été capturés en 36 hommes/nuits et jours. La faune anophélienne est représentée par au moins 8 espèces dont trois sont considérées comme des vecteurs de *Plasmodium* : *An. gambiae s.l.* (53,81%), un complexe d'espèces et est l'espèce la plus abondante durant les périodes de collectes, *An. funestus* (11,29%) et *An. mascarensis* (0,15%) avec une fréquence relativement faible. Quant aux autres espèces restantes, leur abondance est relativement faible : *An. pauliani* (11,43%), *An. coustani* (10,85%), *An. pharoensis* (9,38%), *An. squamosus/cydippis* (2,20%), *An. fuscicolor* (0,15%) et 5 individus non identifiés dans le même genre. L'abondance relative et la diversité de la faune anophélienne collectée entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano après analyse par PCR de l'échantillon du complexe *gambiae* sont représentées dans le Tableau 1. 3920 sur 4519 individus appartenant au genre *Culex*, *Mansonia*, *Uranotaenia*, *Aedeomyia* et *Phlebotomus* ont été collectés pendant la même période d'étude.

IV-2. Composition spécifique et proportion du complexe *gambiae*

Le résultat de la détermination de la composition spécifique du complexe *gambiae* montre que la proportion globale de *An. gambiae s.l.* passée à la PCR diagnostique est constituée par *An. arabiensis* (90,06 %), et *An. gambiae* (9,94 %). En effet, quel que soit le lieu de collecte, cette proportion de *An. arabiensis* est toujours supérieure à 80% (Figure 11).

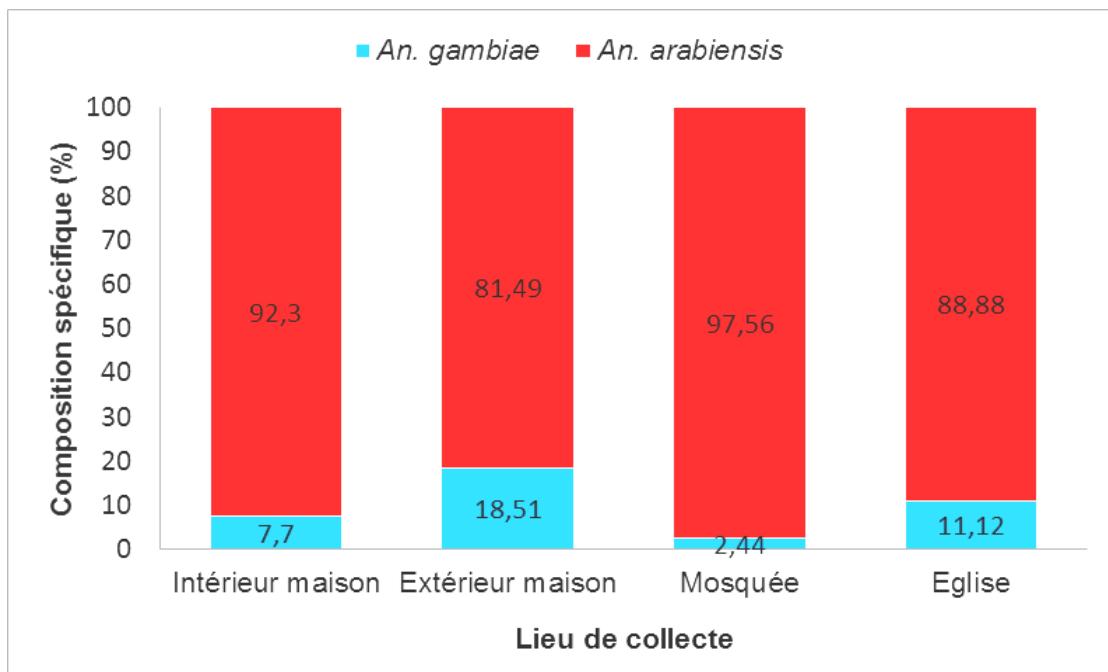


Figure 11: Composition spécifique des membres du complexe *gambiae* capturés entre janvier et juin 2016 après analyse par PCR en fonction de lieu de collecte (Intérieur et extérieur maison, intérieur mosquée et église).

Tableau 1: Abondance relative et diversité de la faune anophélien collectée entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano

espèce	Maison 1		Maison 2		Mosquée		Eglise		Total
	HINT	HEXT	HINT	HEXT	MHINT1	MHINT2	EHINT1	EHINT2	
<i>An. gambiae</i>	1	9	3	14	1	1	2	1	32
<i>An. arabiensis</i>	17	39	34	76	36	22	40	20	284
<i>An. funestus</i>	8	1	20	22	6	5	6	6	74
<i>An. coustani</i>	1	17	2	21	9	7	9	6	72
<i>An. mascarensis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>An. pauliani</i>	4	12	3	23	4	4	8	4	62
<i>An. pharoensis</i>	2	12	3	13	4	8	6	7	55
<i>An. squamosus/cydippis</i>	2	4	1	3	0	0	3	0	13
<i>An. fuscicolor</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>An. sp</i>	0	0	0	0	2	0	1	2	5
Total	34	95	66	172	62	47	77	46	599

HINT : Capture sur homme à l'intérieur. HEXT : Capture sur homme à l'extérieur. MHINT : Capture sur homme à l'intérieur de la mosquée. EHINT : Capture sur homme à l'intérieur de l'église.

IV-3. Résultats de la mesure des déterminants de la transmission résiduelle

IV-3.1. Variation mensuelle de la densité agressive

Durant la période d'étude, les densités agressives moyennes (ma) des principaux vecteurs *An. arabiensis* et *An. funestus* ont été faibles (Figure 12). Quel que soit le mois, *An. arabiensis* prédomine sur *An. funestus*. En effet, les densités agressives de ces deux espèces pendant les quatre premiers mois d'étude, après la distribution MIILD en novembre 2015, sont très faibles. Elles sont autour d'une piqûre par homme et par nuit. Il semble même que la densité aggressive de *An. funestus* est relativement nulle au mois de février. Cependant, l'agressivité moyenne de *An. arabiensis* augmente brusquement au mois de mai et atteint un pic au mois de juin avec $4,77 \pm 0,95$ piqûres sur homme ou Human Biting Rate (HBR), cinq mois après la distribution des MIILD (novembre 2015).

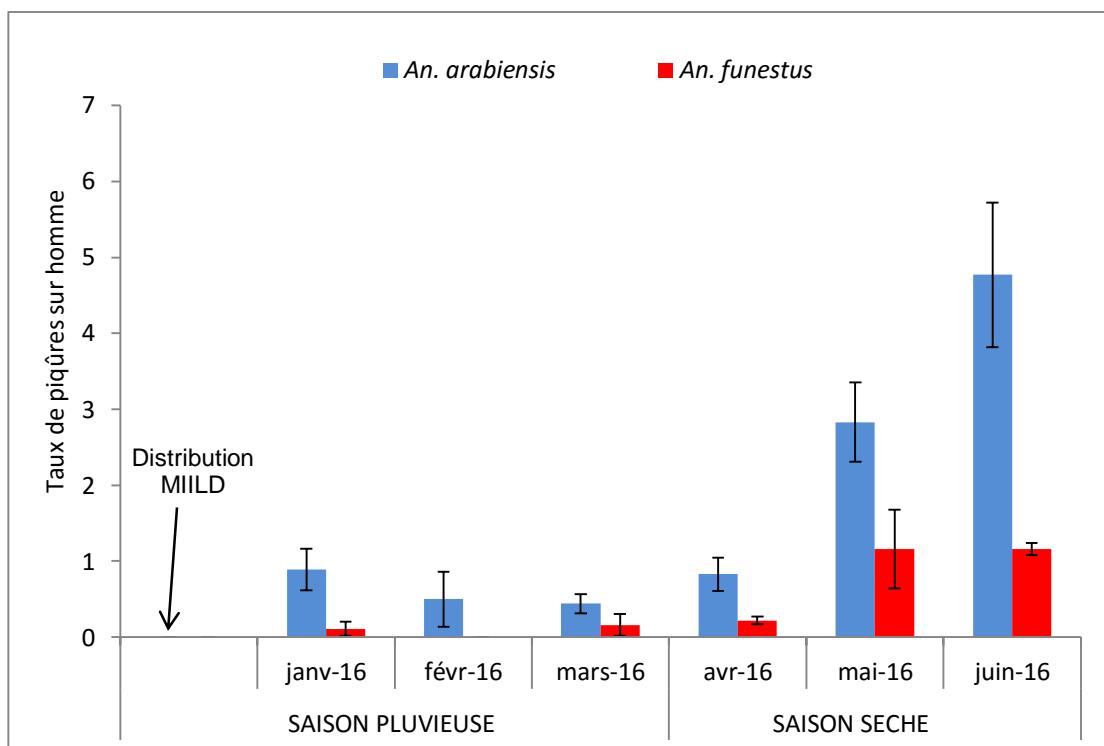


Figure 12 : Variation mensuelle de la densité aggressive moyenne de *An. arabiensis* et *An. funestus* entre Janvier et Juin 2016 deux mois après la mise en place des MIILD à Tsararano.

IV-3.2. Densité agressive des vecteurs dans les maisons

La Figure 13 représente la densité agressive moyenne observée à l'intérieur et à l'extérieur des habitations des principaux vecteurs, *An. arabiensis* et *An. funestus*, durant la période d'étude à Tsararano. Elle montre que *An. arabiensis* a un comportement beaucoup plus exophage. Le ratio exo-endophagie chez *An. gambiae s.l* montre un comportement 2 fois plus agressif à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations ($\chi^2 = 37.92$, df= 1, p< 0,001) ; son agressivité à l'extérieur représente 73,68% de l'agressivité totale. Par contre, aucune différence d'agressivité n'a été observée entre l'intérieur et l'extérieur chez *An. funestus* ($\chi^2 = 0.32$, df= 1, p>0,05). Ceci montre que cette espèce adopte un comportement endo-exophage.

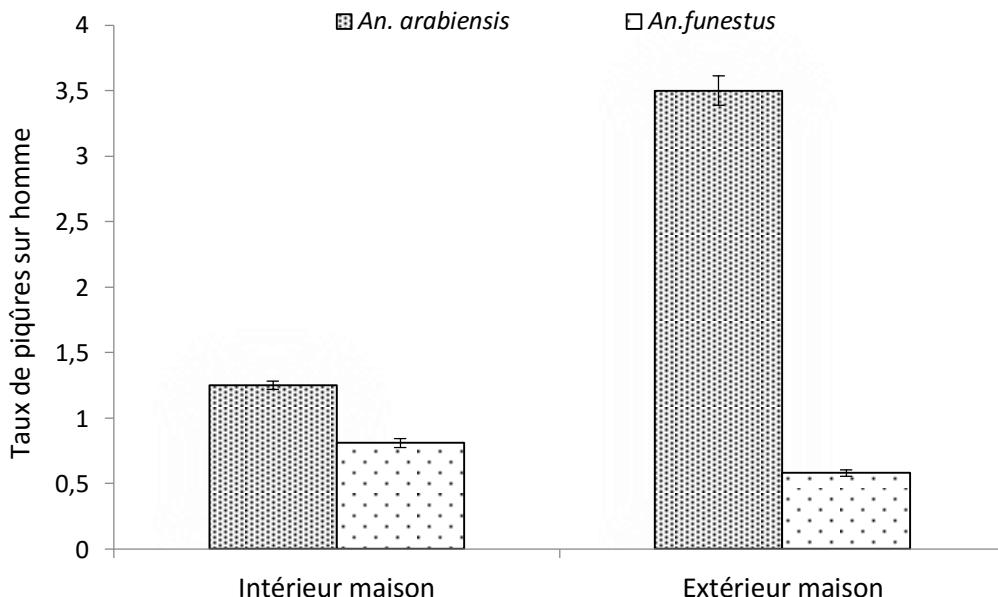


Figure 13 : Densité agressive moyenne des espèces vectrices, *An. arabiensis* et *An. funestus*, du paludisme à l'intérieur et à l'extérieur des maisons à Tsararano.

IV-3.3. Cycle d'agressivité des vecteurs dans les maisons

La Figure 14 représente le cycle d'activité horaire moyenne de *An. arabiensis* et *An. funestus* observés au niveau des maisons entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano.

A l'intérieur des maisons, le taux d'agressivité de *An. arabiensis* a été noté surtout pendant la deuxième moitié de la nuit où on enregistre le premier pic (0,25 PHN) entre 01h et 02h du matin. Cette agressivité pourrait commencer avec un très faible taux avant le coucher du soleil à partir de 17h pour cette espèce et pourrait s'étendre jusqu'à 07h du matin au cours duquel se situe son deuxième pic d'agressivité à l'intérieur entre 06h et 07h. Cette extension d'agressivité jusqu'à 07h est aussi observée chez certaines populations de *An. funestus* mais

avec un faible taux d'agressivité. Chez cette espèce, le rythme d'agressivité augmente régulièrement de 18h à 23h où on enregistre un pic de 0,14 PHN entre 22h et 23h, l'agressivité décroît ensuite progressivement puis on enregistre un deuxième pic entre 03h et 04h du matin.

Par contre, à l'extérieur, *An. arabiensis* est plus agressif pendant la première moitié de la nuit (avant 23h) où on enregistre 53,10% de l'agressivité globale de cette espèce et 74,47% de son agressivité totale observée à l'extérieur ; le pic d'agressivité (0,78 P/H/N) se situe entre 19h et 20h . Des faibles taux d'agressivité sont observés à l'extérieur, lors des captures diurnes, de 15h à 18h de l'après-midi et de 06h à 09h du matin. Pour *An. funestus*, son cycle d'agressivité à l'extérieur se synchronise en général avec celui qui est observé à l'intérieur avec un léger décalage du pic d'agressivité (0,14 P/H/N) entre 23h et 00h.

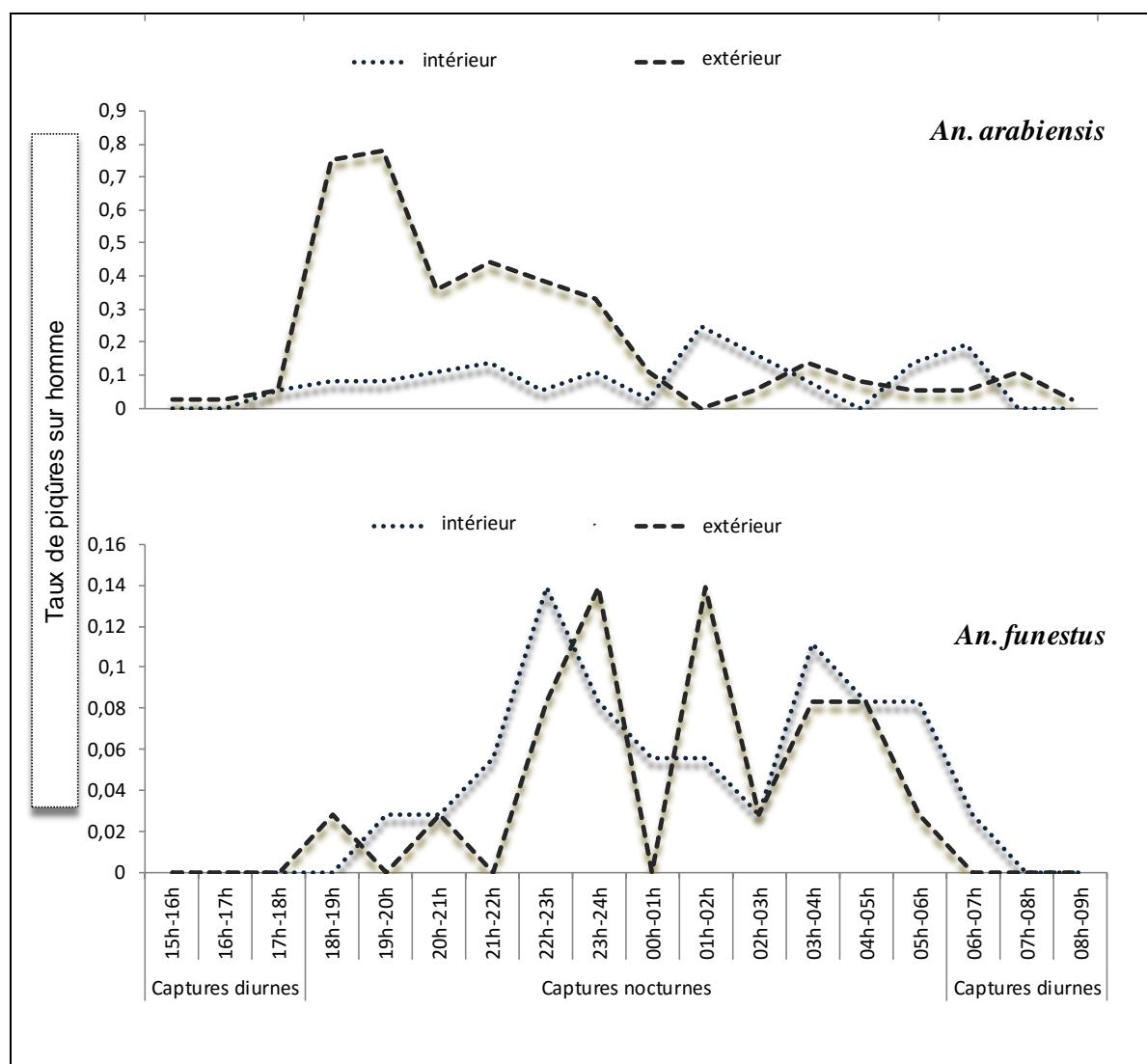


Figure 14 : Cycle d'agressivité horaire moyenne de *An. arabiensis* et celui de *An. funestus* à l'intérieur et à l'extérieur des habitations, entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano

IV-3.4. Densité agressive des vecteurs en fonction des lieux de collecte

La Figure 15 représente la variation du nombre de piqûres par homme et par nuit des principaux vecteurs, *An. arabiensis* et *An. funestus*, observée à l'intérieur des habitations et à l'intérieur des lieux publics durant la période d'étude à Tsararano. Un fort taux d'agressivité a été observé au niveau des lieux de cultes (église et mosquée) surtout pour *An. arabiensis* ; pour cette espèce, il y représente 35,76% (mosquée) et 37,47% (église) de l'agressivité totale à l'intérieur des lieux de collecte. Cependant, *An. funestus* reste toujours plus agressif à l'intérieur des maisons ($\chi^2 = 9.64$, $df= 2$, $p<0.01$) tandis que *An. arabiensis* est aussi bien agressif dans les habitations que dans les lieux publics ($\chi^2 = 2.53$, $df= 2$, $p> 0.05$). Particulièrement, au niveau des lieux publics, aucune différence significative de l'agressivité n'a été observée chez les deux espèces vectrices (*An. arabiensis* : $\chi^2 = 0.008$, $df= 1$, $p> 0.05$; *An. funestus* : $\chi^2 = 0.043$, $df= 1$, $p> 0.05$).

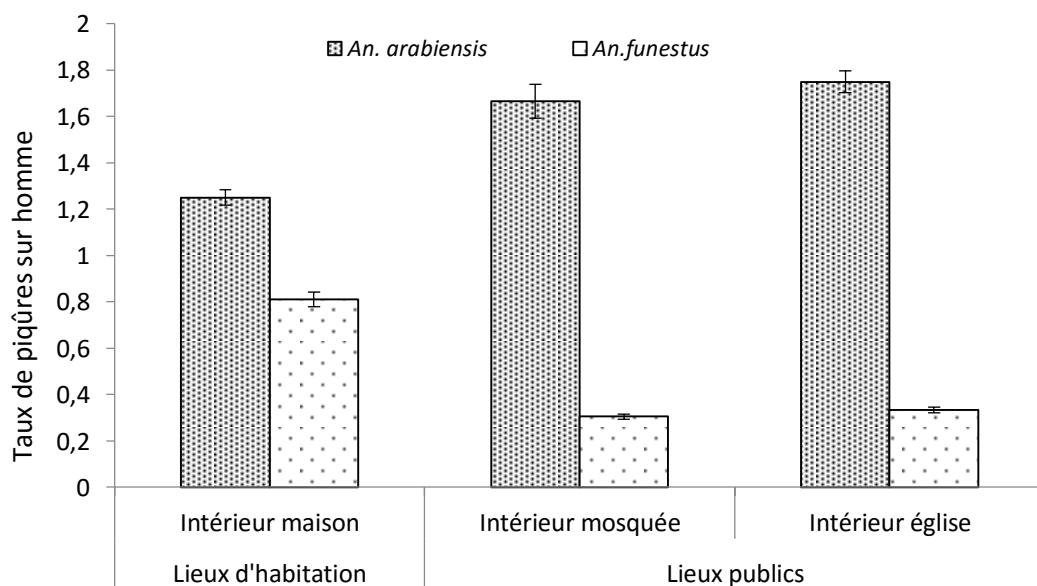


Figure 15 : Densité agressive moyenne des espèces vectrices, *An. arabiensis* et *An. funestus*, du paludisme capturées à l'intérieur des maisons, de la mosquée et de l'église de Janvier à Avril 2016 à Tsararano.

IV-3.5. Cycle d'agressivité des vecteurs en fonction de lieux de collecte

La Figure 16 représente le cycle horaire d'agressivité moyenne de *An. arabiensis* et celui de *An. funestus* observés à l'intérieur des maisons et à l'intérieur des lieux de cultes durant la période d'étude à Tsararano . Au niveau des lieux de collecte, *An. arabiensis* et *An. funestus* sont actifs toute la nuit, de 18h à 06h. *An. arabiensis* est plus actif après minuit avec un pic d'agressivité de 0,25 P/H/N entre 01h et 02h dans les habitations. Au niveau des lieux publics, son agressivité maximale est observée entre 20h et 21h (0,47 P/H/N) dans la mosquée qui représente 28,28% de l'agressivité totale mosquée. Dans l'église, le premier pic d'agressivité (0,27 P/H/N), 15,87% de l'agressivité totale, est observé au début de la nuit entre 18h-19h. Un autre pic (0,30 P/H/N), soit 17,46% de l'agressivité totale, se situe entre 03h et 04h du matin. Quant à *An. funestus*, l'agressivité observée dans les lieux publics est assez irrégulière. Son agressivité y est enregistrée surtout avant 21h du soir (mosquée) et vers 02h du matin (église). En effet, le pic se trouve aussi entre 20h-21h dans la mosquée (0,08 P/H/N) et 04h-05h dans l'église (0,1 P/H/N).

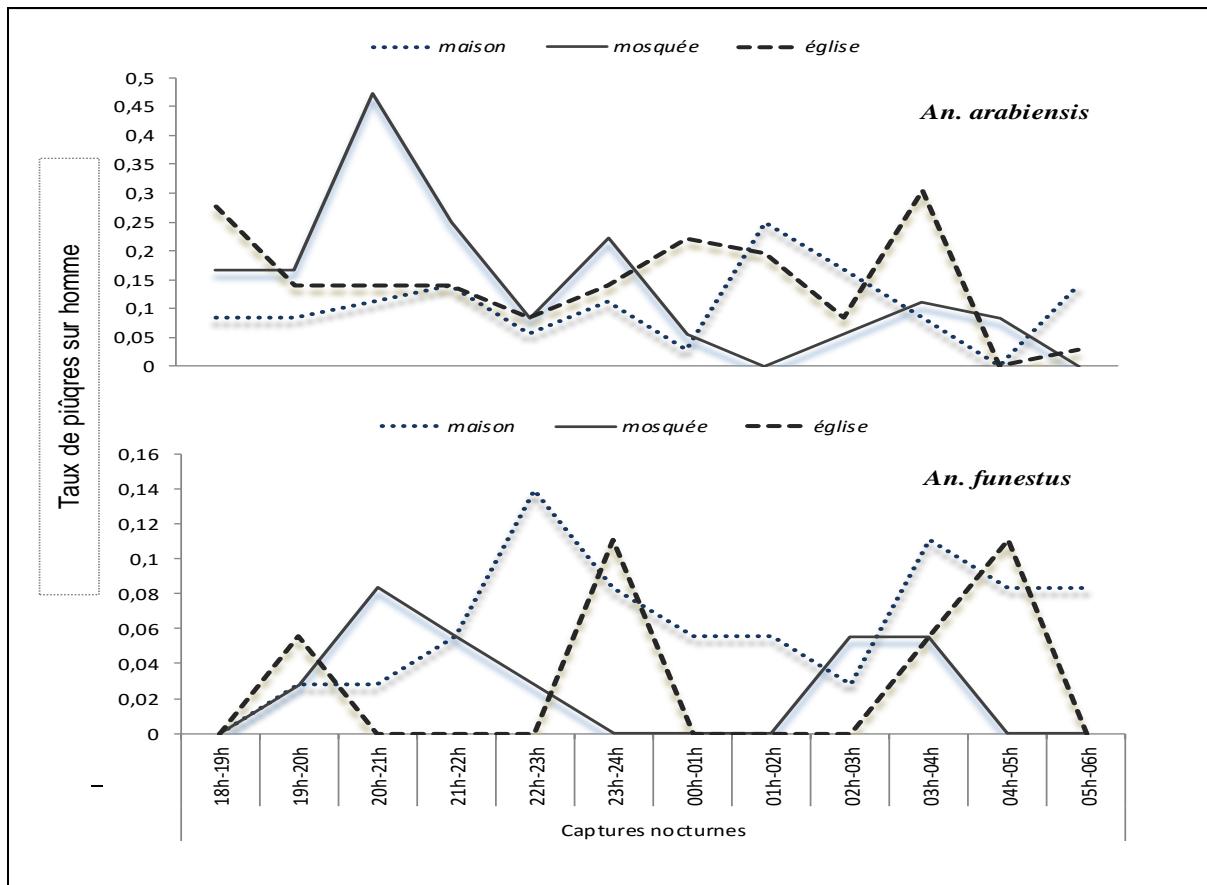


Figure 16 : Cycle d'agressivité horaire moyen de *An. arabiensis* et celui de *An. funestus* à l'intérieur des habitations, de la mosquée et de l'église entre Janvier et Juin 2016 à Tsararano.

IV-4. Taux d'infection et taux d'inoculation entomologique des principaux vecteurs du paludisme

Sur un total de 599 anophèles femelles testées à l'ELISA CSP, un (1) seul individu a été trouvé positif. Aucun moustique infecté n'a été trouvé à l'intérieur des maisons et dans les lieux publics (Tableau 2). Le taux d'infection moyen (s) chez *An. arabiensis* à l'extérieur des habitations est $1/138 \times 100 = 0,72\%$. Le taux d'inoculation entomologique (TIE) de *An. arabiensis* correspondant est donc de $3,5 \text{ piqûres} \times 0,0072 \times 182 \text{ jours} = 4,59 \text{ piqûres infectantes}$ pour les six mois qui est en moyenne de 0,76 piqûres infectantes, soit moins d'une piqûre infectante par mois.

Tableau 2 : Taux d'infection (s) des vecteurs capturés entre janvier et juin 2016 après analyse par ELISA-CSP selon les lieux de collecte (Intérieur et extérieur maison, intérieur mosquée et église).

Lieu de collecte	Intérieur maison	Extérieur maison	Mosquée	Eglise
Moustiques analysés	83	161	71	75
<i>An. arabiensis</i> (positif)	55(0)	138(1)	60(0)	63(0)
Indice sporozoïtique	0	0,72	0	0
<i>An. funestus</i> (positif)	28(0)	23(0)	11(0)	12(0)
Indice sporozoïtique	0	0	0	0

V- DISCUSSION

Dans un contexte marqué par une distribution généralisée de MIILD, l'étude menée à Marovoay a pour objectif de quantifier la transmission résiduelle du paludisme par rapport à la transmission globale du paludisme. Elle a montré que :

a) Les moustiquaires imprégnées semblaient avoir une action directe sur la densité de la population anophélienne puisqu'un mois après la distribution le nombre de piqûres a baissé considérablement. Les MIILD sont connus par ses capacités à réduire la densité des moustiques (Carnevale et al., 1992; Zoulani et al., 1994) dont les plus ciblés sont surtout les vecteurs anthropophiles et endophiles (Gillies & De Meillon 1968; Takken & Verhulst 2013). Mieux, une étude effectuée par INSTAT en collaboration avec le PNLP et l'IPM a montré que le taux de couverture en moustiquaires imprégnées dans le district de Marovoay était de plus de 81% (INSTAT/PNLP/IPM, 2013). Ce taux dépasse de loin le seuil critique qui est de 60% pour permettre une réduction de l'incidence palustre (Moiroux et al., 2012). Les mêmes observations ont été faites au Kenya en 2010 par Bayoh et al. ,au Nigeria en 2009 par Nwankwo et Okafor et au Sénégal par Trape et al. en 2011.

Cependant cette efficacité semble être de courtes durées car 4 mois après on observe une augmentation progressive de l'agressivité des vecteurs, en particulier celle de *An. arabiensis*, qui peut être due à plusieurs facteurs comme la résistance aux insecticides (Ranson et al., 2001; Hemingway et al., 2002; Wondji et al., 2009) ou à la dégradation de l'insecticide contenues dans les MIILD. Les études effectuées au Benin par Azondekon en 2007 et à Madagascar par Kesteman et al. en 2016 ont montré que la majorité des MIILD distribuées ou commercialisées ne respectent pas la norme d'efficacité et de durabilité qui est en moyenne de deux ans selon les recommandations de l'OMS (WHO, 2003). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les causes réelles.

b) Une série d'adaptation a été observée chez les populations de vecteurs, particulièrement chez *An arabiensis*, après le déploiement de MIILD :

i) La tendance des vecteurs à piquer à l'extérieur des habitations ou l'exophagie.

Les mêmes observations ont été faites dans plusieurs régions d'Afrique : comme au Zambie par Fornadel et al. en 2010, au Bénin par Padonou et al. en 2012 et au Sénégal par Sougoufara et al. en 2014. Toutefois, une tendance à l'endophagie a été démontrée au Kenya par Mwangangi et al. en 2013 et dans la République de Yémen par Al-Eryani et al. en 2016 même après les interventions.

- ii) La tendance des vecteurs à piquer tôt ou tard dans la nuit ainsi que l'apparition progressive des populations agressives en dehors de la nuit. Celles-ci sont confirmées par des observations récentes réalisées au Tanzanie par Govella et al. en 2010, à Bénin par Moiroux en 2012, au Sénégal par Sougoufara et al. en 2014 et au Kenya par Ototo et al. en 2015. Pourtant, d'après des études antérieures, il a été observé que les vecteurs piquent surtout dans la seconde partie de la nuit, sur laquelle l'efficacité de la mesure de lutte anti-vectorielle par les MIILD a été basée : au Congo par Zoulani et al. en 1994 et au Kenya par Githcko et al. en 1996.
- ii) Le développement des populations de vecteurs qui piquent dans les endroits non protégés par les MIILD, majoritairement dans les lieux de cultes (lieux publics). Ce comportement qui semble opportuniste observé chez les populations de vecteurs dont *An. arabiensis* et *An. funestus* a été démontré par plusieurs études comme celle réalisée au Tanzanie selon Killeen & Chitnis en 2014, Killeen et al. en 2016.

Ces observations suggèrent trois raisons :

- 1) soit il y aurait l'expansion des populations de vecteurs à comportements opportunistes et exophages dues à l'utilisation des MIILD comme déjà observé au Guinée équatorial par Reddy et al. en 2011,
- 2) soit un changement de comportement a été déjà observé chez ces populations anophéliennes comme les mêmes observations faites au Tanzanie par Govella et al. en 2010, et par Russell et al. en 2011,
- 3) soit elles sont déjà opportunistes et exophages bien avant même le déploiement de MIILD (Bayoh et al., 2010; Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014; Killeen et al., 2016).

D'une manière générale, la tendance à l'exophagie des anophèles vecteurs et la déviation de leurs pics d'activité au crépuscule ou à l'aube favorise considérablement le risque de la transmission du *Plasmodium* à la population locale non protégée pendant cette période (Moiroux, 2012; Sougoufara et al., 2014). Un autre fait marquant mérite d'être souligné, notre étude a montré qu'une bonne partie des anophèles ont été retrouvée dans les mosquées et églises (représentants essentiels des places publiques). Les pratiquants non protégés pendant les prières sont donc fortement exposés aux piqûres des moustiques, constituant ainsi un risque de transmission du paludisme.

Deux causes principales indépendantes de vecteurs sont connues comme responsables de l'adaptation comportementale chez la population des vecteurs : la pression des insecticides et les habitudes de la population locale (villageois) :

Sous la pression des insecticides, les vecteurs peuvent développer un phénomène d'évitement comportemental (Darriet, 2007 ; Carnevale et al., 2009 ; Durnez & Coosemans, 2013 ; Killeen, 2014 ; Killeen et al., 2016) : soit due à l'évitement de l'effet létal des insecticides (Durnez & Coosemans, 2013; Killeen, 2014), soit par leur effet irritant (le moustique entre dans les habitations puis sort avant le dose létale de l'insecticide) détecté surtout chez le DDT (Fernandez-Salas et al., 1993) ou par leur effet excito-répulsif (le moustique entre dans les habitations puis sort très rapidement pour éviter le contact avec l'insecticide ou il n'y entre pas) détecté essentiellement chez les pyréthrinoïdes (Darriet, 2007). Rappelons que la famille d'insecticides actuellement recommandée par l'OMS dans toutes les MIILD est seulement les pyréthrinoïdes (WHO, 2003).

Ensuite, les habitudes de la population locale par leurs activités sociales peuvent influencer le comportement des vecteurs. Ces activités sont surtout représentées par les réunions des villageois au crépuscule ou à l'aube dans les places publiques ou même à l'intérieur des habitations pendant qu'ils soient à l'extérieur de leurs moustiquaires (Moiroux, 2012; Sougoufara et al., 2014; Al-Eryani et al., en 2016; Killeen et al., 2016)). Notons que la majorité des gens à Tsararano sont encore actifs avant 22h et vers 04h du matin à l'extérieur des habitations protégés par des MIILD.

Des études complémentaires sont nécessaires pour bien connaître les mécanismes responsables de ces processus d'adaptation chez les vecteurs. Par ailleurs, selon des études qualitatives, ces différentes mécanismes d'adaptation décrites chez les populations d'anophèles vecteurs (notamment *An. gambiae* s.l.) sont dictés par des mécanismes génétiques (Ralisoa, 1996; Ayala et al., 2014). Dans ce cas, l'étude de la génétique de population de ces vecteurs est aussi à recommander dans les prochaines étapes du suivi des vecteurs du paludisme à Tsararano.

VI- CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

A l'issue de cette étude préliminaire, une série de mécanismes d'adaptation a été observée chez les populations de vecteurs de paludisme à Tsararano, essentiellement chez *An. arabiensis*, une zone à intervention de MIILD. Ces processus d'adaptation peuvent se traduire par l'expansion des populations de vecteurs à comportement opportuniste et exophage vis-à-vis de leurs heures et lieux d'agressivité ou de leur choix d'hôtes. Ils constituent des facteurs de risque de transmission résiduelle du paludisme dans cette localité. Les causes de ces facteurs sont en relation étroite avec l'impact probable de la mise en place des MIILD et le comportement des habitants locaux. Quel que soit le mécanisme responsable de ces processus d'adaptation, notre étude a montré que, la proportion des principaux vecteurs qui piquent à l'extérieur, piquent plutôt ou plus tard dans la nuit et piquent dans les endroits non protégés par les MIILD est relativement élevée, ce qui contribue à la transmission résiduelle du paludisme.

En perspectives, il devient urgent d'adapter la lutte anti-vectorielle en mettant l'accent sur les lieux publics, notamment les lieux de cultes. Il faudra aussi surveiller le niveau de la résistance aux insecticides et étudier les facteurs génétiques impliqués dans les changements de comportement anophélien.

RECOMMANDATIONS ET PROPOSITIONS

Au terme de notre étude, il nous paraît utile de faire les recommandations et propositions suivantes :

Puisque l'étude a été réalisée seulement dans un seul district parmi les 109 districts endémique du paludisme à Madagascar (PNLP, 2012; SLAV/PNLP, 2015), il serait mieux de mener la même étude dans d'autres régions afin d'estimer d'une manière générale la présence de la transmission résiduelle du paludisme à Madagascar qui existe probablement dans toutes ses régions endémiques du paludisme.

Afin de maintenir les efforts entrepris dans la lutte antipaludique face à la menace de la transmission résiduelle du paludisme, il faudra :

- i) Renforcer et intégrer la suivie du changement comportemental chez les vecteurs locaux dans les surveillances entomologique en insistant sur la biologie et génétique de la population anophélien.
- ii) Améliorer l'efficacité et la durabilité des méthodes déjà déployées : MIILD, PID, sensibilisation de la population.

iii) Mettre au point de nouvelles méthodes de lutte anti-vectorielle complémentaires pour surmonter les limites actuelles à l'impact potentiel de MIILD et PID :

- Etendre la couverture des mesures de lutte anti-vectorielle pour pouvoir éliminer les moustiques adultes lorsqu'ils piquent les humains à l'extérieur des habitations ;
- Cibler les efforts de réduction à la source, à savoir les stades précoce de développement des moustiques dans leurs habitats aquatiques.
- Enfin il faudra une couverture en PID beaucoup plus large : dans les lieux publics et les écoles etc... pour réduire considérablement la transmission.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Eryani, S. M. A., Kelly-Hope, L., Harbach, R. E., Briscoe, A. G., Barnish, G., Azazy, A., and McCall, P. J. 2016.** Entomological aspects and the role of human behaviour in malaria transmission in a highland region of the Republic of Yemen. *Malaria Journal* 15: 1-17.
- Alvarado, C. A., and Bruce-Chwatt, L. J. 1962.** Scientific American.
- AMS/OMS. 2015.** Paludisme : projet de stratégie technique mondiale pour l'après-2015, pp. 36, Soixante-huitième Assemblée Mondiale de la Santé.
- Arcaz, A. C., D. L. Huestis, A. Dao, A. S. Yaro, M. Diallo, J. Andersen, Blomquist, G. J. and Lehmann, T. 2016.** Desiccation tolerance in *Anopheles coluzzii*: the effects of spiracle size and cuticular hydrocarbons. *Journal of Experimental Biology* 219: 1675-1688
- Ascenzi, A. 1999.** Malaria diseases and parasites. *Parasitologia* 41: 33-8.
- Asenso-Okyere, K., Asante, F. A., Tarekegn, J., and Andam, K. S. 2011.** A review of the economic impact of malaria in agricultural development. *Agricultural economics* 293-304.
- Audran, M. 2015.** Le paludisme gagne du terrain à Madagascar, pp. 1-4, *Santé et Médecine*. 31 Août 2016. <http://www.rfi.fr/afrique/20150519-madagascar-paludisme-epidemie-antananarivo-test-anophele>.
- Ayala, D., Le Goff, G., Robert, V., de Jong, P., and Takken, W. 2006.** Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in Madagascar and Comoros. *Acta tropica* 97: 292-300.
- Ayala, V., Ullastres, A., and González, J. 2014.** Adaptation through chromosomal inversions in *Anopheles*. *frontiers in GENETICS* 5: 10.
- Bayoh, M. N., Mathias, D. K., Odiere, M. R., Mutuku, F. M., Kamau, L., and Gimnig, J. E. 2010.** *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in western Nyanza Province, Kenya. *Malaria Journal* 9.

- Bitsindou, G. G. P. 1986.** Influence de l'urbanisation sur la répartition des moustiques (*Culex*, *Anopheles*) et l'intensité de la transmission du paludisme à Brazzaville. *Journées d'Etude sur Brazzaville. Acte du colloque. Brazzaville*, 25-28 avril 1986 : 449-457.
- Blanchy, s., Rakotonjanabelo, A., Ranaivoson, G., and Rajaoanarivelo, V. 1993.** Épidémiologie du paludisme sur les hautes terres malgaches depuis 1878. *Cahiers Santé* 3: 155-161.
- Boele, E. 2003.** Malaria in irrigated agriculture. *Wiley InterScience* 52: 65-69.
- Boudin, C., and Robert, V. 2003.** *Plasmodium falciparum*: épidémiométrie de la transmission homme-moustique et de l'infection chez le vecteur. *Bull Soc Pathol Exot* 96: 335-340.
- Boundenga, L., Makanga, B., Ollomo, B., Gilabert, A., Rougeron, V., Mve-Ondo, B., Arnathau, C., Durand, P., Moukodoum, N. D., Okouga, A.-P., Delicat-Loembet, L., Yacka-Mouele, L., Rahola, N., Leroy, E., Ba, C. T., Renaud, F., Prugnolle, F., and Paupy, C. 2016.** Haemosporidian Parasites of Antelopes and Other Vertebrates from Gabon, Central Africa. *PLoS ONE* 11: e0148958.
- Bruce-Chwatt, L. J. 1981.** Alphonse Laveran's discovery 100 years ago and today's global fight against malaria. *Journal of the Royal Society of Medicine* 74: 531-536.
- Burkot, T. R., Williams, J. L., and Schneider, I. 1984.** Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33: 783-788.
- Capanna, E. 2006.** Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? *International Microbiology* 9: 69-74.
- Carnevale, P., Robert, V., Le Goff, G., Fondjo, E., and Mouchet, J. 1992.** L'apport des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme. *Bull.liais.doc. - OCEAC* 99: 7.
- Carnevale, P., Robert, V., Manguin, S., Corbel, V., Fontenille, D., Garros, C., Rogier, C., and Roux, J. 2009.** Les anophèles: Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte anti-vectorielle, pp. 402. *IRD éditions*, Marseille.

- Chaudry, M. Q. 1997.** A review of mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pestic. Sci.* 49: 213–219.
- Chauvet, G., Gillies, M. T., Coz, J., Adam, J. P., and Mouchet, J. 1968.** Ecologie, physiologie et comportement des vecteurs du paludisme humain et animal en région éthiopienne. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd.* 4: 265-272.
- Coetzee, M., Hunt, R., Wilkerson, R., Della, T. A., Coulibaly, M. B., and Besansky, N. J. 2013.** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619: 246–274.
- Collins, F. H., and Paskewitz, S. M. 1996.** A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology* 5: 1-9.
- Collins, F. H., Mendez, M. A., Rasmussen, M. O., Mehaffey, P. C., Besansky, N. J., and Finnerty, V. 1987.** A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 37: 37-41.
- Collins, W. E., and Jeffery, G. M. 2007.** *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews* 20: 579-592.
- Coluzzi, M. 2002.** *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne : Spéciation récente des vecteurs, transmissibilité, évolution de la pathogénèse / contrôle de la maladie, et capacité vectorielle, pp. 19. Elsevier, Paris, FRANCE.
- Cot, S., Matra, R., Rabarijaona, L., Robert, V., Raharimalala, L., Raveloson, A., and Ariey, F. 2006.** Mise en évidence d'une transmission urbaine autochtone du paludisme à Antananarivo, Madagascar. *Médecine tropicale* 66: 143-148.
- Cox, F. E. G. 2010.** History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* 3: 1-9.
- CSB II Tsararano. 2016.** Registre sur la consultation interne du CSB II de Tsararano (données non publiées).
- Darriet, F. 2007.** Moustiques imprégnés et résistance des moustiques aux insecticides, pp. 117. IRD éditions.
- Davidson, G. 1963.** DDT-resistance and dieldrin-resistance in *Anopheles albimanus*. *Bulletin*

of the World Health Organization 28: 25-33.

- Delmont, J., Pichard, R., Jaureguiberry, S., Marchou, B., Parola, P., and Simon, F. 2012.** e-Pilly TROP, Maladies infectieuses tropicales. *Editions Alinéa Plus, Paris.*
- Desenclos, J.-C., Fontenille, D., and Balenghien, T. 2009a.** Quelle est la contribution de l'évaluation des risques vectoriels à l'évaluation du risque épidémique ? pp. CD-ROM : 1-218, La lutte anti-vectorielle en France. *IRD Éditions, coll. Expertise collégiale, 536 p. + CD-ROM, Marseille.*
- Desenclos, J.-C., Lecollinet, S., Balenghien, T., Fontenille, D., Lagadic, L., Lagneau, C., Lefait-Robin, R., and Yebakima, A. 2009b.** Le contexte de la lutte anti-vectorielle en France, pp. CD-ROM : 1-218, La lutte anti-vectorielle en France. *IRD Éditions, coll. Expertise collégiale, 536 p. + CD-ROM, Marseille.*
- Diabaté, A., T. Baldet, F. Chandre, M. Akogbeto, P. Guillet, T. R. Guiguemde, and Hougard, J. M. 2001.** Impact des variations spacio-temporales chez *An. gambiae* et les formes moléculaires sur l'état de la résistance aux pyrethrinoïdes et au DDT au Burkina Fasso. *Hararé: MIM/AFRO/OMS/TDR.*
- Duchemin, J. B., Pock Tsy, L. J. M., Rabarison, P., Roux, J., Coluzzi, M., and Costantini, C. 2001.** Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Medical and veterinary entomology* 15: 50-57.
- Duchemin, J. B., Rabarison, P., Le Goff, G., Marrama, L., Laventure, S., Ratovonjato, J., Zeller, H., Rakotondraibe, E., and Robert, V. 2002.** Les vecteurs du paludisme à Madagascar, pp. 11-13, Atlas évolutif du paludisme à Madagascar. *Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo.*
- Durnez, L., and Coosemans, M. 2013.** Residual Transmission of Malaria: an old issue for new approaches. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors. Manguin. 5th edition.: 671-704.*
- Duvallet, G., and de Gentile, L. 2012.** Protection personnelle anti-vectorielle, pp. 355. *IRD Editions, Marseille.*
- DVSSE. 2012.** Le paludisme à Madagascar : un défi pour nous tous! *Bulletin périodique d'informations N°15: 2.*

- Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E., and Lal, A. A. 1998.** The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8124-9.
- Fernandez-Salas, I., D. R. Roberts, Rodriguez, M. H., Rodriguez, M. C. and Marina-Fernandez, C. F. 1993.** Host selection patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* under insecticide spraying situations in southern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 375-384.
- Fontenille, D. 1989.** Clé d'identification des moustiques adultes de Madagascar. *Document interne de l'Institut Pasteur de Madagascar.*
- Fontenille, D. 1992.** Hétérogénéité de la transmission des paludismes à Madagascar. *Mém. Soc. r. belge Ent.* 35: 129-132.
- Fontenille, D., L. Lochouarn, N. Diagne, C. Sokhna, J. J. Lemasson, M. Diatta, L. Konate, F. Faye, C. Rogier, and J. F. Trape. 1997.** High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 56: 247-253.
- Fontenille, D., L. Lochouarn, M. Diatta, S. C., I. Dia, N. Diagne, J. J. Lemasson, K. Ba, A. Tall, C. Rogier, and J. F. Trap. 1997.** Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 647-652.
- Fontenille, D., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., Kengne, P., Antonio-Nkondjio, C., Wondji, C., and Simard, F. 2005.** Vecteurs de paludisme : du terrain à la génétique moléculaire Recherches en Afrique. *Rev Epidemiol Sante Publique* 53 283-290.
- Fornadel, C. M., Norris, L. C., Glass, G. E., and Norris, D. E. 2010.** 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.* 83: 848–853.
- Fujioka, H., and Aikawa, M. 2002.** Structure and life cycle.
- Gantier, J.-C. 1998.** Paludisme et maîtrise des populations anophéliennes. *Insectes et Santé* 3: 5-10.
- Gillies, M. T., and De Meillon, B. 1968.** The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *Publication of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg.*

Gillies, M. T., and Coetzee, M. 1987. A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publications of the South African Institute for Medical Research* 55: 1-143.

Githeko, A. K., Adungo, N. I., Karanja, D. M., Hawley, W. A., Vulule, J. M., Seroney, K., Ofulla, A. V. O., Atieli, F. K., Ondijo, S. O., Genga, I. O., Odada, P. K., Situbi, P. A., and Oloo, J. A. 1996. Some Observations on the Biting Behavior of *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* and Their Implications for Malaria Control. *Experimental Parasitology* 82: 306–315.

Gompel, F. V., Ende, J. V. d., Clerinx, J., and Taelman, H. 1989. Prophylaxie et traitement du paludisme. Informations à l'attention des personnes séjournant pendant une période prolongés dans une zone à endémie palustre. *Tropicultura* 7: 36-40.

Govella, N. J., Okumu, F. O., and Killeen, G. F. 2010. Insecticide-treated nets can reduce malaria transmission by mosquitoes which feed outdoors. *Am J Trop Med Hyg* 82: 415–9.

Govella, N. J., Okumu, F. O. and Killeen, G. F. 2013. Insecticide-treated nets can reduce malaria transmission by mosquitoes which feed outdoors. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82: 415-419.

Greenwood, B. M., and Mutabingwa, T. 2002. malaria in 2002, pp. 670-672, *Nature*.

Grjebine, A. 1966. Insectes Diptères Culicidae Anophelinae, Faune de Madagascar, pp. 487. *Éditions ORSTOM et CNRS*, Paris.

Guiguemdé, T. R., Coulibaly, N., Coulibaly, S. O., Ouedraogo, J. B., and Gbary, A. R. 1997. Esquisse d'une méthode d'estimation du coût économique chiffré des accès palustres: application à une zone rurale au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest). *Tropical Medicine & International Health* 2: 646-653.

Haidaro, S. A., Doumbo, O., Traore, A. H., Koita, O., Dembele, M., Dolo, A., Pichard, E., and Diallo, A. N. 1991. La place du paludisme dans les syndromes fébriles en médecine interne. *Médecine d'Afrique Noire* 38.

Haddow, A. J. 1954. Studies of the biting-habits of african mosquitos. An appraisal of methods employed, with special reference to the twenty-four-hour catch. *Bulletin of Entomological Research*, 45(1), 199-242.

- Hamon, J., and Garrett-Jones, C. 1963.** La résistance aux insecticides chez des vecteurs majeurs du paludisme et son importance opérationnelle. *Bulletin of the World Health Organization* 28: 1-24.
- Harbach, R. E. 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of entomological research* 94: 537-553.
- Howes, R.E., Mioramalala, S.A., & Ramiranirina, B., Franchard, T., Rakotorahalahy, A.J., Bisanzio, D., Gething, P.W., Zimmerman, P.A., Ratsimbasoa, A. 2016.** Contemporary epidemiological overview of malaria in Madagascar: operational utility of reported routine case data for malaria control planning. *Malaria Journal* 15:502.
- Hemingway, J., Field, L., and Vontas, J. 2002.** An overview of insecticide resistance. *Science* 298: 96-97.
- Hemingway, J., Shretta, R., Wells, T. N. C., Bell, D., Djimdé, A. A., Achee, N., and Qi, G. 2016.** Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination: What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria? *PLoS Biol* 14: e1002380.
- Holstein, M. H. 1952.** Note sur l'épidémiologie du paludisme en Afrique-Occidentale Française. *Bulletin of the World Health Organization* 4: 463.
- INSTAT/PNLP/IPM. 2012.** Madagascar-Enquête sur les Indicateurs du Paludisme à Madagascar 2011.
- INSTAT/PNLP/IPM. 2013.** Madagascar-Enquête sur les Indicateurs du Paludisme à Madagascar 2013.
- Jeanne, I., Randremanana, R., Robert, V., Ariey, F., Tombo, M. L., Wilmé, L., Ranivoarisoa, S., and Duchemin, J. B. 2002.** Biogéographie de Madagascar, pp. 5-12, Atlas évolutif du paludisme à Madagascar. *Institut Pasteur de Madagascar*, Antananarivo.
- Joy, D. A., X. Feng, J. Mu, T. Furuya, K. Chotivanich, A. U. Krettli, M. Ho, A. Wang, N. J. White, and Suh, E. 2003.** Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *science* 300: 318-321.
- Kerr, J. A. 1933.** Studies on the abundance, distribution and feeding habits of some west African mosquitos. *Bull. ent. Res.* 24: 493-510.

- Kesteman, T., Rafalimanantsoa, S. A., Razafimandimby, H., Rasamimanana, H. H., Raharimanga, V., Ramarosandrata, B., Ratsimbasoa, A., Ratovonjato, J., Elissa, N., and Randrianasolo, L.** 2016. Multiple causes of an unexpected malaria outbreak in a high-transmission area in Madagascar. *Malaria journal* 15: 1.
- Killeen, G. F., Smith, T. A., Ferguson, H. M., Mshinda, H., Abdulla, S., Lengeler, C., and Kachur, S. P.** 2007. Preventing Childhood Malaria in Africa by Protecting Adults from Mosquitoes with Insecticide-Treated Nets. *PLoS Medicine* 4 13.
- Killeen, G.** 2014. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malaria Journal* 13: 1-1.
- Killeen, G. F., and Chitnis, N.** 2014. Potential causes and consequences of behavioural resilience and resistance in malaria vector populations: a mathematical modelling analysis. *Malaria Journal* 13: 97.
- Killeen, G. F., Govella, N. J., Lwetoijera, D. W., and Okumu, F. O.** 2016. Most outdoor malaria transmission by behaviourally-resistant *Anopheles arabiensis* is mediated by mosquitoes that have previously been inside houses. *Malaria Journal* 15: 225.
- Kumm, H. W., and Novis, O.** 1938. Mosquito studies on the ilha de Marajo, Para, Brazil. Am. J. Hyg., 27 (3) : 498-515.
- Laventure, S., Rabarison, P., Mouchet, J., Andrianaivolambo, L., Rakotoarivony, I., Rajaonarivelo, E., and Marrama, L.** 1995. Paludisme : perspectives des recherches en entomologie médicale à Madagascar. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* 5: 406-411.
- Laveran, A.** 1884. Traité des fièvres palustres avec la description des microbes du paludisme, pp. 574. In 8 [ed.]. *Octave Doin*, Paris.
- Lemasson, J. J., D. Fontenille, L. Lochouarn, I. Dia, F. Simard, K. Ba, A. Diop, M. Diatta, and Molez, J.-F.** 1997. Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkédji, a sahelian area of Senegal. *J. Med. Entomol* 34: 396-403.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., Ndjango, J.-B. N., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Locatelli, S., Gonder, M. K., Kranzusch, P. J., Walsh, T., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Georgiev, A. V., Muller, M. N., Shaw, G. M., Peeters, M., Sharp, P. M., Rayner, J. C., and Hahn, B. H.** 2010.

Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Natura* 467: 420-426.

Lockwood, J. A., Sparks, T. C. and Story, R. N. 1984. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behaviour. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30: 41–51.

MacCallum, M. D. 1898. On the Haematozoan infections of birds. *The Journal of Experimental Medicine* 3: 117-136.

Manson, P. 1894. On the nature and significance of the crescentic and flagellated bodies in Malarial blood. *The British Medical Journal*: 1306-1308.

Marrama, L., Laventure, S., Rabarison, P., and Roux, J. 1999. *Anopheles mascarensis* (De Meillon, 1947): vecteur principal du paludisme dans la région de Fort-Dauphin (Sud-est de Madagascar). *Thorax* 1: 7.

Martinsen, E. S., McInerney, N., Brightman, H., Ferebee, K., Walsh, T., McShea, W. J., Forrester, T. D., Ware, L., Joyner, P. H., Perkins, S. L., Latch, E. K., Yabsley, M. J., Schall, J. J., and Fleischer, R. C. 2016. Hidden in plain sight: Cryptic and endemic malaria parasites in North American white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Science Advances* 2.

Mayne, B. 1938. Graphic Reproduction of the Life Cycle of the Malaria Parasite in the Mosquito Host. *Bulletin of the National Institute of Health*.

Moiroux, N. 2012. Modélisation du risque d'exposition aux moustiques vecteurs de *Plasmodium spp.* dans un contexte de lutte anti-vectorielle, pp. 252. Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc.

Moiroux, N., Damien, G. B., Egrot, M., Djenontin, A., Chandre, F., Corbel, V., Killeen, G. F., and 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.

Mouchet, J. 1963. Les facteurs entomologiques impliqués dans la persistance de la transmission paludéenne au cours des campagnes d'éradication. *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie* 1: 17-26.

Mouchet, J. 1996. L'écologie du paludisme, pp. 253-269, Populations et environnement dans les pays du Sud. *KARTHALA-CEPED*, Paris.

- Mouchet, J. 1999.** Vecteurs et facteurs d'environnement du paludisme. *Transfusion clinique et biologique* 6: 35-43.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Fontenille, D., Ravaonjanahary, C., Richard, A., and Robert, V. 1993.** Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé* 3: 220-238.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., and Sircoulon, J. 2004.** Biodiversity of malaria worldwide, pp. 428. *John Libbey Eurotext*, Paris.
- Muriu, S. M., Muturi, E. J., Shililu, J. I., Mbogo, C. M., Mwangangi, J. M., Jacob, B. G., Irungu, L. W., Mukabana, R. W., Githure, J. I., and Novak, R. J. 2008.** Host choice and multiple blood feeding behaviour of malaria vectors and other anophelines in Mwea rice scheme, Kenya. *Malaria Journal* 7: 43.
- Musapa, M., Kumwenda, T., Mkulama, M., Chishimba, S., Norris, D. E., Thuma, P. E., and Mharakurwa, S. 2013.** A Simple Chelex Protocol for DNA Extraction from *Anopheles spp*. *Journal of Visualized Experiments* 71: 7.
- Mwangangi, J., Muturi, E. J., Muriu, S. M., Nzovu, J., MILDega, J. T., and Mbogo, C. 2013.** The role of *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coustani* in indoor and outdoor malaria transmission in Taveta District, Kenya. *Parasites & Vectors* 6: 114.
- Nagalo, K., Dao, F., Minodier, P., Sawadogo, O., Sanon, H., Tall, F. H., and Yé, D. 2014.** Le paludisme congénital maladie à *Plasmodium falciparum* : aspects épidémiologiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques et pronostiques à Ouagadougou, Burkina Faso. *PanAfrican Medical Journal* 18: 47.
- Nepomichene, T. N. J. J., Tata, E., and Boyer, S. 2015.** Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malaria journal* 14: 1.
- Nguefack, F., Chelo, D., Tejiokem, M. C., Pondy, A., Njiki kinkela, M. J., Dongmo, R., Awa, H. D. M., Taguebue, J., Guemkam, G., Vougmo Meguejio Njua, C., and Ndombo, P. O. K. 2012.** Fréquence des anémies sévères chez les enfants âgés de 2 mois à 15 ans au Centre Mère et Enfant de la Fondation Chantal Biya, Yaoundé, Cameroun. *The Pan African Medical Journal* 12: 46.

Nwankwo, B. O., and Okafor, O. j. 2009. Effectiveness of Insecticide-Treated Bednets (ITNs) in Malaria Prevention among Children Aged 6 Months to 5 Years in a Rural Community in Imo State, Nigeria. International Journal of tropical Medicine 4: 41-19.

OMS. 2014a. Entomologie du paludisme et lutte anti-vectorielle.

Ototo, E. N., Mbugi, J. P., Wanjala, C. L., Zhou, G., Githcko, A. K., and Yan, G. 2015. Surveillance of malaria vector population density and biting behaviour in western Kenya. *Malaria Journal* 14: 1-10.

Padonou, G. G., Gbedjissi, G., Yadouleton, A., Azondekon, R., Razack, O., Oussou, O., Gnanguenon, V., Rock, A., Sezonlin, M., and Akogbeto, M. 2012. Decreased proportions of indoor feeding and endophily in *Anopheles gambiae s.l.* populations following the indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions in Benin (West Africa). *Parasites & Vectors* 5: 1-10.

Perkins, P. V. 2014. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. *J. Parasitol.* 100: 11-15.

Pietra, V., Jambou, R., Rakotondramarina, D., Sahondra-Harisoa, J. L., Jeanne, I., Modiano, D., Romi, R., Ranaivo, L., Tombo, M. L., De Giorgi, F., Raveloson, A., Rabarijaona, L. P., and Raharimalala, A. L. 2002. Le paludisme sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar, pp. 23 - 26, Atlas évolutif du paludisme à Madagascar. *Institut Pasteur de Madagascar*, Antananarivo.

PMI. 2014. L'initiative présidentielle contre le paludisme, Huitième rapport Annuel.

PNLP. 2011. Revue du programme paludisme à Madagascar, pp. 176. Direction de Lutte contre le Paludisme.

PNLP. 2012. Plan stratégique de lutte contre le paludisme Madagascar 2013-2017, pp. 124. Direction de Lutte contre le Paludisme.

Pock Tsy, J.-M. L., Duchemin, J.-B., Marrama, L., Rabarison, P., Le Goff, G., Rajaonarivelo, V., and Robert, V. 2003. Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria journal* 2: 33.

Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N. J., and Anstey, N. M. 2007. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 77 79–87.

- Rabarijaona, L. P., Rabe, T., Ranaivo, L., Raharimalala, L. A., Rakotomanana, F., Rakotondraibe, E. M., Ramarosandrata, B., Rakotoson, J. D., Rakotonjanabelo, L. A., and Tafangy, P. B.** 2006. Paludisme sur les hautes terres centrales de Madagascar : Stratégie de lutte. *Med Trop* 66: 504-512.
- Ralisoa, R. B.** 1996. Biogéographie du complexe *Anopheles gambiae* de Madagascar, vecteur du paludisme., pp. 523 - 534., Biogéographie de Madagascar: Lourenço WR. Paris: ORSTOM Editions.
- Ralisoa, R. B., and Coluzzi, M.** 1987. Genetical investigations zoophilic and exophilic *Anopheles arabiensis* from Antananarivo (Madagascar). *Parassitologia* 29: 93-97.
- Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., and Corbel, V.** 2001. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in parasitology* 27: 91-98.
- Ratsimbasoa, A., Ravony, H., Vonimpaisomihanta, J.-A., Raherinjafy, R., Jahevitra, M., Rapelanoro, R., Rakotomanga, J. D. D. M., Malvy, D., Millet, P., and Ménard, D.** 2012. Management of uncomplicated malaria in febrile under five-year-old children by community health workers in Madagascar: reliability of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal* 11: 1-8.
- RBM.** 2014. Aspects économiques du paludisme, 2001-2010 Décennie des Nations Unies pour Faire reculer le paludisme.
http://www.rollbackmalaria.org/microsites/wmd2014/rbminfosheet_10fr. 22 octobre 2016.
- Reddy, M. R., Overgaard, H. J., Abaga, S., Reddy, V. P., Caccone, A., Kiszewski, A. E., and Slotman, M. A.** 2011. Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island. *Equatorial Guinea. Malaria J* 10.
- Reinert, J. F.** 2009. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *European Mosquito Bulletin* 27: 68-76.
- Ricklefs, R. E., Outlaw, D. C., Svensson-Coelho, M., Medeiros, M. C. I., Ellis, V. A., and Latta, S.** 2014. Species formation by host shifting in avian malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 14816-14821.

- Robert, V., Carnevale, P., and Mouchet, J. 1989.** Pyrethroid-impregnated bed nets in the malaria control strategy at community level. *Acta Tropica* 46: 267-268.
- Robert, V., van den Broek, A., Stevens, P., Slootweg, R., Petrarca, V., Coluzzi, M., Le Goff, G., Di Deco, M. A., and Carnevale, P. 1992.** Mosquitoes and malaria transmission in irrigated rice-fields in the Benoue valley of northern Cameroon. *Acta Tropica* 52: 201-204.
- Rodhain, J. 1939.** Les plasmodiums des anthropoïdes de l'Afrique centrale et leurs relations avec les plasmodiums humains. *Ann Soc Belge Med Trop* 19: 563-572.
- Ross, R. 1898.** The Role of the Mosquito in the Evolution of the Malarial Parasite. *The Lancet*: 488-489.
- Russell, T. L., Govella, N. J., Azizi, S., Drakeley, C. J., Kachur, S. P., and Killeen, G. F. 2011.** Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malaria Journal* 10.
- Sabbatani, S., Fiorino, S., and Manfredi, R. 2012.** *Plasmodium knowlesi*: from Malaysia, a novel health care threat. *Le Infezioni in Medicina*: 5-11.
- Scott, J. A., Broondon, W. G., and Collins, F. H. 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.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., and Kabaria, C. W. 2010.** The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors* 3: 1.
- Shortt, H. E., N. H. Fairley, G. Covell, P. G. Shute, and P. C. C. Garnham. 1949.** The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *The British Medical Journal*: 1006-1008.
- SLAV/PNLP. 2015.** Rapport du projet RCC4. Service Lutte Anti-vectorielle, pp. 26. Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme à Madagascar (données non publiées).

- Sougoufara, S., Harry, M., Doucouré, S., Sembène, P. M., and Sokhna, C. 2016.** Shift in species composition in the *Anopheles gambiae* complex after implementation of long lasting insecticidal nets in Dielmo, Senegal. *Medical and veterinary entomology*.
- Sougoufara, S., Diédhiou, S. M., Doucouré, S., Diagne, N., Sembène, P. M., Harry, M., Trape, J.-F., Sokhna, C., and Ndiath, M. O. 2014.** Biting by *Anopheles funestus* in broad daylight after use of long-lasting insecticidal nets: a new challenge to malaria elimination. *Malaria journal* 13: 1.
- Sparks, J. C., Lockwood, J. A., Byford, Graves, J. B. and Leonard, B. R. 1989.** The role of behaviour in insecticide resistance. *Pestic. Sci.* 26: 383–399.
- SSS. 2011.** Annuaire des statistiques du secteur santé de Madagascar 2011, pp. 702. Services Statistiques Sanitaires, Ministère de la santé publique.
- Stone, B. F., and Brown, A. W. A. 1969.** Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens*. *Bull. Organ. Mond. Santé* 40: 401–408.
- Takken, W., and Verhulst, N. O. 2013.** Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annual Review of Entomology* 58: 433-453.
- Tantely, M. L., Le Goff, G., Boyer, S., and Fontenille, D. 2016.** An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite* 23: 42.
- Trape, J.-F. o., Tall, A., Diagne, N., Ndiath, O., Ly, A. B., Faye, J., Dieye-Ba, F., Roucher, C. m., Bouganali, C., Badiane, A., Sarr, F. D., Mazenot, C., Touré-Baldé, A. s., Raoult, D., Druilhe, P., Mercereau-Puijalon, O., Rogier, C., and Sokhna, C. 2011.** Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *The Lancet Infectious Diseases* 11: 925-932.
- Wéry, M., and Coosemans, M. 1993.** Les coûts du paludisme et son impact socio-économique en Afrique. *Cahiers Santé* 3: 323-330.
- White, G. B. 2008.** *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases* 46: 172–173.
- WHO 1973.** Etude comparative de différentes techniques de récolte de Moustiques adultes (Diptera, Culicidae) faite au Maroc, en zone rurale.

WHO. 1975. Manual on practical entomology in Malaria. Part II. Methods and techniques. Geneva: World Health Organization Offset Publication 13: 197.

WHO. 2003. The Africa malaria report 2003. Geneva: World Health Organization

WHO. 2014. Guidance Note-Control of residual malaria parasite transmission. Geneva: World Health Organization, Global Malaria Programme: 5.

WHO. 2015a. World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization, Im Internet: http://www.apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf.

WHO. 2015b. Global Technical Strategy for Malaria for 2016-2030. Geneva: World Health Organisation, Global Malaria Programme: 32.

Wirtz, R. A., Zavala, F., Charoentivit, Y., Campbell, G. H., Burkot, T. R., Schneider, I., Esser, K. M., Beaudoin, R. L., and André, R. G. 1987. Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development. *Bulletin of the World Health Organization* 65: 39-45.

Wondji, C. S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N. F., Collins, F. H., Hunt, R. H., Coetzee, M., Hemingway, J., and Ranson, H. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Research* 19: 452-459.

Zoulani, A., Carnevale, P., and Penchenier, L. 1994. Influence of mosquito nets impregnated with deltamethrin on the aggressivity cycle of *Anopheles gambiae* in Djoumouna, Congo. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* 74: 83-91.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

<http://fr.climate-data.org/location/>

<http://fetchclimate2.cloudapp.net>

<http://gamapserver.who.int/mapLibrary>

<http://malagasyword.org/bins/teny2/>

<https://www.R-project.org/>

<http://dictionnaire-sante.com/>

<http://www.lefigaro.fr/sciences/>

<http://www.mosquitocatalog.org/>

Annexe

Annexe 1 : Systématique du vecteur et de l'agent de pathogène du paludisme

a-. Position Systématique de *Anopheles*

D'après Harbach (2004) la position systématique des anophèles est la suivante :

Règne	: Animal
Embranchement	: Arthropodes
Sous-embranchement	: Antennates
Classe	: Insectes
Section	: Oligonéoptères
Super-ordre	: Mécoptéroïdes
Ordre	: Diptères
Sous-ordre	: Nématocères
Famille	: Culicidae
Sous-famille	: Anophelinae
Genre	: <i>Anopheles</i> Meigen, 1918.

b-. Position Systématique de *Plasmodium*

Les agents causaux du paludisme sont des protozoaires hématophages appartenant au genre *Plasmodium*. Sa position systématique est la suivante selon Garnham en 1966 :

Règne	: Animal
Embranchement	: Protozoaires
Sous-embranchement	: Apicomplexa
Classe	: Sporozoaire
Ordre	: Coccidiomorphes
Sous-ordre	: Haemosporidae
Famille	: Plasmodiidae
Genre	: <i>Plasmodium</i> Garnham, 1966

Annexe 2 : Clé d'identification des anophèles adultes de Madagascar présents à Tsararano Marovoay (Grjebine, 1966; Fontenille, 1989)

La clé est basée surtout sur les femelles mais elle serait utilisable en grande partie pour les mâles.

1 - Abdomen sans écailles ou, au moins, avec les sternites largement chauves. Palpes de la femelle presque aussi longues que la trompe :

.....ANOPHELES MEIGEN, 1818.

2 - Segments abdominaux avec touffes latérales d'écailles saillantes sur segments 2-7

- Segment 5 du tarse postérieur généralement entièrement clair ; champ alaire largement clair :

.....*An. pharoensis*.

3 - Segments abdominaux avec touffes latérales d'écailles saillantes sur segments 2-7

- Segment 5 du tarse postérieur entièrement noir ; champ alaire largement sombre, avec des tâches claires d'écailles blanches :

.....*An. squamosus* ou *An. cydippis*.

4 - Pattes non tachetées de pâle mais pouvant avoir des anneaux ou segments entièrement pâles

- Troisième zone sombre principale de la nervure 1 interrompue par une tache pâle

- Pas de tache pâle préapicale sur fémur postérieur, articles 1-4 des tarses avec anneau apical pâle

:

.....*An. mascarensis*

5 - Palpes lisses à trois bandes pâles : une bande blanche apicale assez large recouvre le 5^{ème} article et l'apex, une bande blanche médiane recouvre l'apex du 3^{ème} et la base du 4^{ème} article, une bande blanche basale recouvre l'apex du 2^{ème} articles

- Segments 4 et 5 du tarse postérieur partiellement ou entièrement sombres

- Pattes tachetées de pâle.

- Aile avec une tache claire sur la troisième aire sombre principale de la nervure 1, parfois fusionnée avec la tache subcostale; tache claire (supplémentaire) présente sur la frange alaire entre extrémités de 5.2 et 6 :

.....complexe *gambiae* *An. arabiensis* (B)

.....*An. gambiae* (A)

.....*An. merus*.

6 - Pattes non tachetées de pâle mais pouvant avoir des anneaux ou segments entièrement pâles

- Segments 4 et 5 des tarses postérieurs au moins partiellement sombre

- Troisième zone sombre principale de la nervure 1 entière (ou absente, mais alors elle manque aussi sur la costa)

- Fémurs antérieurs et médians sans tache ou anneau pâle préapical

- Nervure 6 presque entièrement sombre palpes avec les anneaux pâles apicaux étroits, articles 1 à 4 des tarses postérieurs sombres :

.....*An. funestus*.

7 - Palpes avec 4 bandes claires (apex clair)

- Aile avec la deuxième aire principale sombre non la costa, mais seulement sur la première nervure claire étroite

- Segment 1 du tarse postérieur tacheté

- Palpes non hérissées à l'apex, bande claire de l'apex du palpe aussi longue que la bande sombre qui la précède :

.....*An. pauliani*

8 - Aile avec au plus 3 taches claires sur la costa, tache apicale incluse, moitié basale de la costa entièrement sombre

- Segments 4-5 du tarse postérieur entièrement clairs

- Tibia postérieur avec tache apicale claire au moins quatre fois plus longue que large; premier segment du tarse avec anneau clair basal presque aussi long que l'anneau du tibia

.....*An. coustani*

9 - Segment 4 du tarse postérieur partiellement clair; tibia moyen et postérieur avec bande apicale claire

- Segments 4-5 du tarse postérieur, au moins partiellement sombres

- Aile avec au plus 3 taches claires sur la costa, tache apicale incluse, moitié basale de la costa entièrement sombre

.....*An. f. fuscicolor*

Annexe 3 : Méthode de détection des anophèles infectés : Technique ELISA-CSP

Principe

Il s'agit de détecter l'antigène circumsporozoïtique (CSP) de *Plasmodium* humains chez les moustiques grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques d'espèce et de stade. La technique utilisée est celle de " l'ELISA sandwich " indirecte de BURKOT *et al.*, (1984) modifiée par WIRTZ *et al.*, (1987). Elle consiste à coincer l'antigène circumsporozoïtique (CSP) entre un anticorps monoclonal de capture anti-CSP (fixé sur les parois de la plaque) et un autre anticorps monoclonal anti-CSP conjugué à la peroxydase (Figure 17). L'identification est faite en deux phases. La première est un "screen" qui permet d'identifier les moustiques infectés sans tenir compte de l'espèce plasmodiale. La seconde est monospécifique et permet de confirmer l'infestation et d'identifier l'espèce plasmodiale en cause.

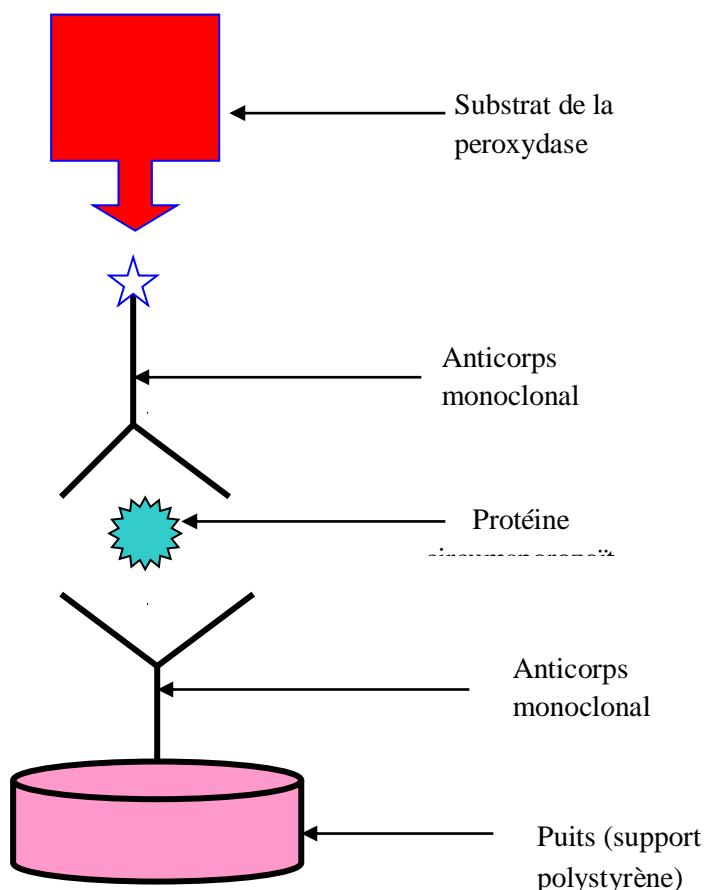


Figure 17 : Principe de l'ELISA sandwich

INSTITUT PASTEUR DE MADAGASCAR- ENTOMOLOGIE MEDICALE

MODE OPERATOIRE : ELISA CSP (Utilisation de deux anticorps monoclonaux de capture, ELISA sandwich)

Objectif : Tester les anophèles toutes espèces confondues, capturés lors d'une mission

I. Méthodologie

La manipulation suit le protocole Qualité-Procédure/Laboratoire de Paludologie – UMR 199/ELISA – Biologie moléculaire.

a. Sensibilisation

Suivant la quantité d'échantillon, préparer les plaques à sensibiliser dont le nombre dépend de la quantité de l'échantillon à tester. Sensibiliser ces plaques avec les anticorps monoclonaux de capture (Acm) déjà préparés (détails de la préparation dans le protocole Qualité-Procédure/Laboratoire de Paludologie – UMR 199/ELISA – Biologie moléculaire) et conservés à -20°C au laboratoire ou à préparer selon le cas.

Pour une plaque

P. falciparum 20 µl/5 ml PBS 1X

Pv 210 5 µl/5 ml PBS 1X

Pv 247 5 µl/5 ml PBS 1X

Puis verser dans chaque puit 50 µl de la solution d'Acm de capture et laisser incuber toute la nuit sur la paillasse.

b. Saturation

Vider les plaques sans les laver et ajouter 250 µl de BB CSP et laisser incuber 1h sur la paillasse.

c. Distribution

Vider les plaques sans les vider. Verser 50 µl de broyat tête-thorax de moustiques selon le modèle de plaque du protocole ELISA CSP de laboratoire de l'Unité d'Entomologie Médicale de l'IPM (figure 18). Ajouter dans les puits correspondants 50 µl de la solution de chaque témoin positif. Pour les témoins négatifs et le blanc, ajouter 50 µl de BB CSP par puit. Laisser incuber pendant deux heures (2h) sur la paillasse.

d. Ajout d'anticorps conjugués

Laver les plaques deux fois au PBS tween 20 puis mettre 50 µl du mélange d'AcM conjugués dans chaque puit et laisser incuber 1h sur la paillasse.

e. Révélation

Laver quatre fois de suite au PBS tween 20 les plaques puis mettre dans chaque puit 100 µl de peroxydase (détails de la préparation dans le protocole Qualité-Procédure/Laboratoire de Paludologie – UMR 199/ELISA – Biologie moléculaire). Laisser incuber à l'obscurité pendant 30 minutes.

f. Arrêt de la réaction

Mettre dans chaque puit 50 µl d'acide sulfurique 4 N pour arrêter la réaction.

II. Résultats

a. Lecture

Lire les densités optiques (DO) au spectrophotomètre à 450 nm avec le logiciel Gen 5 sous l'appareil Biotek.

b. Enregistrement

Enregistrer les résultats issus de la lecture des DO via le logiciel Gen 5. Exporter ces résultats sous format Excel puis coller dans la feuille Excel destinée au calcul du seuil de positivité afin de déterminer la DO des moustiques positifs.

	PC Pf S°II	PC Pv210 S° I	Mous 1	Mous2	Mous3	Mous4	Mous5	Mous6	Mous7	Mous8	Mous9
U	PC Pv247 S° I	T - Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous
Z	T - Mous	T - Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous
A	T - Mous	T - Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous
-	T - Mous	T - Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous
B	T - Mous	T - Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous
	T - Mous	T - Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous	Mous
	T - Mous	T - Mous	Mous67	Mous68	Mous69	Mous70	Mous71	Mous72	Mous73	Mous74	Mous75

Mous : moustique

Figure 18 : Modèle d'une plaque ELISA CSP

Annexe 4 : Méthode d'identification des membres du complexe *gambiae* par PCR

INSTITUT PASTEUR DE MADAGASCAR- ENTOMOLOGIE MEDICALE

MODE OPERATOIRE : PCR DIAGNOSTIQUE du complexe *Anopheles gambiae* (Utilisation de Chelex 100 et Dream Taq Master Mix)

Principe

La PCR sur le complexe *Anopheles gambiae* peut se réaliser de la manière suivante :

- Un primer universel « UN » s'hybride sur une partie de l'IGS (espace intergénique de l'ADN ribosomal)
- D'autres primers spécifiques pour *An. gambiae sensu stricto* « GA », *An. arabiensis* « AR », *An. merus* « MR », *An. quadriannulatus* « QD » ou *An. quadriannulatus A* « QDA » s'hybrident au niveau de la partie polymorphe de l'IGS.

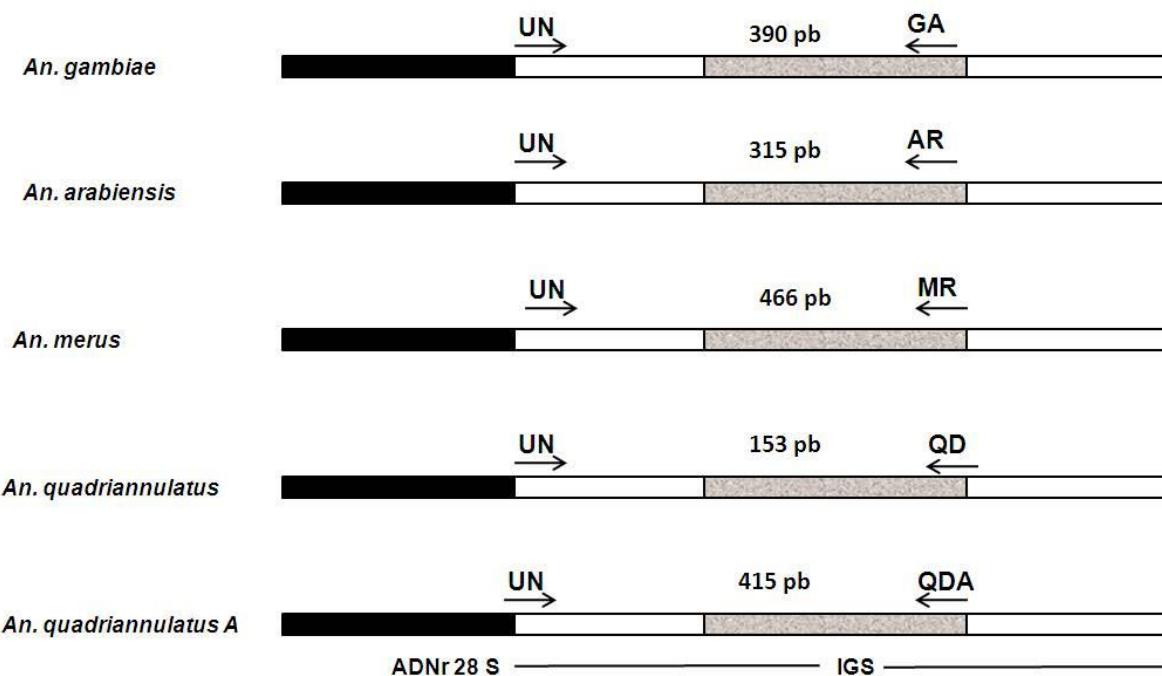


Figure 19 : Schéma de l'emplacement respectif de chaque primer spécifique sur les ADNr de 4 espèces du complexe *Anopheles gambiae*

Objet : Identifier les espèces du complexe *Anopheles gambiae*

I. Méthodes

A. Préparation des spécimens

- Inscrire sur des microtubes Eppendorf les numéros respectifs de chaque moustique vecteur du paludisme
- Faire des coupons avec des papiers essuie tout
- Prendre les spécimens conservés dans les microplaques
- A l'aide d'une pince fine rigide à bouts pointus, prélever 2 à 3 pattes par moustiques ou à défaut une aile et l'abdomen puis les mettre dans un microtube Eppendorf 1,5 ml portant le numéro du moustique
- Couper la tête-thorax de chaque moustique et la transférer dans un autre microtube Eppendorf portant le même numéro (pour ELISA CSP)
- Entre chaque spécimen, essuyer les bouts de la pince avec un coupon de papier essuie tout. Jeter le coupon après usage.

B. Extraction d'ADN de moustiques à partir de leurs pattes avec chelex 100 resin (sodium form)

- Mettre 2 pattes de moustique dans un tube Treff 1,5 ml numéroté
- Ajouter 20µl de PBS 1X
- Broyer à l'aide d'une bille de 3 mm à 30 vibrations par seconde pendant 1min 30sec (tissue lyser)
- Mettre un barreau aimanté dans le flacon contenant la solution de chelex extemporanément préparée
- Placer le flacon sur un agitateur magnétique et agiter à vitesse moyenne pour que les microbilles ne restent pas au fond du flacon lors de la distribution
- Ajouter 100µl de chelex dans chaque tube
- Vortexer 15 sec à grande vitesse
- Centrifuger à 14000 tours/min pendant 2 min (120 sec)
- Incuber à 95°C pendant 20min au bain marie
- Vortexer pendant 15 sec à grande vitesse
- Centrifuger à 14000 tours/min pendant 2 min
- Récupérer le surnageant dans un autre tube portant le même numéro que le tube d'origine (extrait d'ADN) et jeter le culot.

-Garder l'extrait à -20°C ou pas plus d'une semaine à + 4°C

NB : il ne faut pas toucher au culot contenant des microbilles qui inhibent la PCR (inhibition de l'activité de l'activité de la Taq polymerase)

Après usage, décontaminer les billes en les immergeant dans de l'eau savonneuse avec de la javel pendant au moins une demi-journée. Rincer puis autoclaver ces billes avant de les réutiliser.

C. Préparation du mix : utilisant dream Taq Master Mix (2X)

Le dream Taq Master Mix est fourni dans :

- 2X Dream Taq buffer
- 0,4 mM de chaque dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 4 mM MgCl₂

-Décongeler d'abord le dream Taq ensuite vortexer doucement

-Sur un bac à glace, préparer le mix suivant la composition ci-après pour une réaction

Constituants du mix (pour 1 tube V_f=24,5µl)	Volume en µl
Eau distillée	10,0
Primer AR	0,5
Primer GA	0,5
Primer MR	0,5
Primer UN	0,5
Dream Taq Master Mix	12,5

Multiplier la quantiter de chaque composition du Mix par le nombre de spécimens à diagnostiquer + quelques marges (3 à 5 spécimens)

Distribuer 24,5 µl par tube de la solution mix.

D. Ajout des extraits d'ADN, du témoin négatif et des témoins positifs

-Ajouter 0,5 µl par tube d'extrait d'ADN à tester dans chaque tube contenant le mix

-Mettre 0,5 µl d'eau distillée stérile comme témoin négatif

-Mettre respectivement 0,5 µl d'extrait d'ADN de *An. gambiae sensu stricto*, *An. arabiensis*, *An. merus* pour les témoins positifs.

-Boucher les tubes

E. Amplification d'ADN

-Editer au préalable dans le thermocycleur ce programme d'amplification

Processus	Température	Temps	Nombre cycle
Dénaturation initiale	95°C	5 min	1 cycle
Dénaturation suivante	95°C	30 sec	
Hybridation	58°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	30 cycles
Elongation finale	72°C	5 min	1 cycle
Maintien	4°C		

-Poser les tubes contenant le mélange mix-ADN dans les puits du thermocycleur

-Bien reboucher les tubes

-Choisir le programme et lancer l'amplification

F. Préparatifs avant électrophorèse

-Porter des gants Nitrile

-Fixer les 2 embouts sur le plateau servant de moule pour le gel. Poser le support de gel bien à l'horizontal sur la paillasse

-Placer le peigne correspondant aux nombres d'échantillons à migrer

-Préparer le gel d'agarose à 1,5 %

- Mettre 0,8 g d'agarose dans 40 ml de TBE 0,5 X pour la mini-cuve
- Mettre 4,5 g d'agarose dans 300 ml de TBE 0,5 X pour la mini-cuve

-Bouillir au four micro-onde avec haute intensité pendant 2-5 min pour dissoudre l'agarose

-Sortir le gel du four et laisser sur paillasse pour refroidir un peu

- Ajouter 1,6 µl de BET pour 40 ml de TBE 0,5 X
- Ajouter 10 µl de BET pour 300 ml de TBE 0,5 X

- Couler le gel dans le moule. Attendre au moins 20 min avant de l'utiliser pour la migration
- Mettre du TBE 0,5 X dans la cuve en quantité suffisante de manière à immerger le gel
- Enlever les 2 embouts. Placer le support de gel dans la cuve. Enlever soigneusement le peigne
- Poser une feuille de papier sombre sous la cuve de manière à mettre en évidence les puits dans le gel

G. Migration par électophorèse

- Découper une bande de parafilm de 20 à 25 cm, puis la poser sur la paillasse
- Mettre des gants Nitrile
- Déposer sur le parafilm des gouttes de 3µl de bleu. Le nombre de gouttes dépend du nombre d'amplifiât d'ADN à faire migrer
- Prélever 10µl d'amplifiât d'ADN, mélanger à chaque fois avec une goutte de bleu
- Déposer dans chaque puits respectif le contenu de chaque mélange. Changer de pointe entre chaque prélèvement d'ADN
- Déposer les 3 témoins respectifs *arabiensis*, *gambiae*, *merus* dans les trois derniers puits
- Prélever 10µl du marqueur de taille 100pb et en mettre dans le premier puits. Pour un grand gel, en mettre également au milieu et à la fin.
- Faire migrer à 150 V, 150 mA pendant 20 min pour la petite cuve et 180 V, 150 mA pendant 1h 30 pour la grande
- Contrôler la migration des bleus de façon à ce que la bande du bas ne déborde pas du gel

H. Prise de photo sur Gelscan (Cf. mode opératoire sur utilisation du Gelscan)

- Mettre en marche l'appareil Gelscan et l'ordinateur pilote
- Enlever le support de gel de la cuve
- Transférer le gel sur un plateau et le découper si nécessaire
- Transporter le gel sur le plateau vers le Gelscan en évitant de répandre le tampon
- Ouvrir le tiroir contenant l'enceinte UV
- Poser le gel sur le plateau UV
- Presser sur le bouton UV
- Cliquer sur l'icône « Quantity One » pour accéder au logiciel
- Prendre la photo et la sauvegarder dans un fichier
- Envelopper le gel dans du papier aluminium et le jeter dans la poubelle DAOM marron

Remarque :

- Utiliser une main nue durant la manipulation de l'appareil Gelscan et de l'ordinateur
- Changer le tampon de migration (TBE) dès que sa couleur devient bleue

II. Résultat et interprétation

- Si les témoins positifs ne sortent pas : la manipulation est à refaire
- S'il y a une bande au niveau du témoin négatif, il y a contamination : la manipulation est à refaire
- On a une bande au niveau de 466 pb pour *An. merus*
- On a une bande au niveau de 390 pb pour *An. gambiae*
- On a une bande au niveau de 315 pb pour *An. arabiensis*

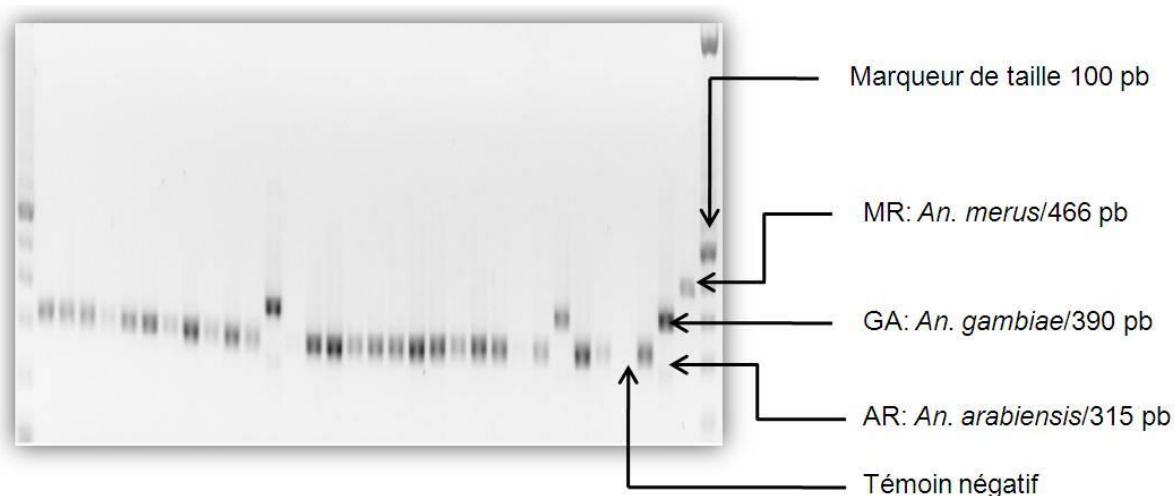


Figure 20 : Gel avec des bandes d'ADN de 3 espèces du complexe *Anopheles gambiae*
(source : auteur)

ABSTRACT

Persistent malaria transmission has been detected in several endemic areas where effective vector control tools (impregnated nets, indoor spraying) have been deployed. The aim of this study is to measure the entomological factors determining residual malaria transmission in Marovoay, Madagascar. Entomological surveys were carried monthly between January and June 2016 with three consecutive nights catches in Tsararano, Marovoay, after mass impregnated nets distributions deployment. Human landing catch was performed from 3:00 PM to 9:00 AM inside and outside the houses and from 6:00 PM to 6:00 AM in the public places (mosque, church). Mosquitoes were identified morphologically and by PCR for *An. gambiae* complex. At last, plasmodium infection was detected by ELISA-CSP. Positive behaviors favoring residual transmission have been observed in vectors, specifically in *An. Arabiensis*. This species is more exophagous (73,68% of total aggressiveness) whereas *An. funestus* occurs both indoors and outdoors. Surprisingly, *An. arabiensis* tends towards a twilight activity outside (74,47% of outdoor aggressiveness was observed before 23h) with a strong activity at dawn indoors. In addition, high rates of aggression are recorded in public places (35,76% in mosque and 37,47% in church) in the main vectors particularly in *An. Arabiensis*. These activities are much more pronounced during the periods, at dawn or in the evening, when villagers are active in these places. Although the mechanism responsible for these behavioral adaptations in vectors is not well understood, they will probably be responsible for the residual malaria transmission.

Key words: *Anopheles*, behavioral adaptations, malaria, residual transmission, Marovoay

RESUME

Des persistances de la transmission du paludisme ont été détectées dans plusieurs régions endémiques où des mesures de lutte anti-vectorielle efficace, moustiquaires imprégnées ou aspersions intra-domiciliaires, ont été déployés. L'objectif de cette étude est de mesurer les facteurs entomologiques déterminant la transmission résiduelle du paludisme à Marovoay, Madagascar. Des enquêtes entomologiques ont été menées entre janvier et juin 2016 durant trois séances consécutives de captures de moustiques par mois à Tsararano, District de Marovoay où des distributions massives des moustiquaires imprégnées ont été faites un mois avant les captures. Les captures sur homme ont été faites de 15h à 09h dans les maisons et de 18h à 06h dans les lieux publics (mosquée, église). Les moustiques ont été identifiés morphologiquement puis les membres du complexe *gambiae* par PCR. Le dépistage des moustiques infectés pour la détection de l'infection plasmodiale a été fait par ELISA-CSP. Des comportements favorables à la transmission résiduelle ont été observés chez les vecteurs, spécifiquement chez *An. arabiensis*. Cette espèce est plus exophage (73,68% de l'agressivité totale) tandis que *An. funestus* pique aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations. D'une manière surprenante, *An. arabiensis* tend vers une activité crépusculaire à l'extérieur (74,47% de son agressivité à l'extérieur a été observé avant 23h) avec une forte activité à l'aube à l'intérieur. De plus, des forts taux d'agressivité (35,76% dans la mosquée et 37,47% dans l'église) sont enregistrées dans les lieux publics chez les principaux vecteurs principalement chez *An. arabiensis*. Ces activités sont beaucoup plus marquées pendant les périodes auxquelles les villageois sont actifs dans ces endroits. Bien que le mécanisme responsable de ces adaptations comportementales chez les vecteurs ne soit pas bien élucidé, ils seront probablement responsables de la transmission résiduelle du paludisme.

Mots clés : *Anopheles*, adaptations comportementales, paludisme, transmission résiduelle, Marovoay

Rapporteurs :

Pr. RAFARASOA Lala « Professeur d'ESR », Université d'Antananarivo

Dr. NDIATH Ousmane « HDR », Institut Pasteur de Madagascar

Rakotonaina Mihajarilala TANJONA

Lot Vs 52 Hb Ter C, Avaratr'Ankatso, Antananarivo

Tel: (+261)32 75 927 00 / 033 29 978 78