



**LABORATOIRE INTERNATIONAL ASSOCIÉ**  
**Université d'Antananarivo – Université de Lyon 1**

Enceinte IST Ampasapito

Domaine Sciences et Technologie

Tél : +261 34 17 524 64 Madagascar

[Voahangy.vestalys@yahoo.fr](mailto:Voahangy.vestalys@yahoo.fr)

**Client: FLORIBIS SARL | LOT IVF 4 FITROAFANA | TALATAMATY 105 |  
MADAGASCAR**

**ÉVALUATION DE LA PROPRIÉTÉ RÉPULSIVE DU  
PRODUIT « MOUSTIFLORE » VIS-À-VIS DES  
MOUSTIQUES**

**Intervenants :**

Superviseurs : Pr Marc Lemaire & Pr Voahangy Vestalys Ramanandraibe

Responsable : Mbolatiana Tovo Andrianjafy, PhD

Assistants(es) : Sarah Vonisoa Ralimanana & Nirry Hasinandrianina  
Ramarosandratana

## Sommaire

1. Objectifs.....	3
2. Résumé .....	3
3. Matériels et méthodes.....	4
3.1. Matériels.....	4
3.2. Méthodologie .....	4
4. Résultats.....	7
4.1. Résultats des tests sur volontaires au laboratoire.....	7
4.2. Résultats des tests sur volontaires « <i>in natura</i> » .....	9
5. Conclusion.....	13
6. Références .....	13
7. Règlement éthique des volontaires.....	13

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Effectif des genres de moustiques capturés à l'intérieur et à l'extérieur des maisons pendant les deux nuits consécutives d'échantillonnage.....	9
<b>Tableau 2</b> : Pourcentage de protection de Deet 20% à l'intérieur et à l'extérieur dans chaque site et moyenne générale.....	12
<b>Tableau 3</b> : Pourcentage de protection de Moustiflore SV2 à l'intérieur et à l'extérieur dans chaque site d'étude et moyenne générale .....	12

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Pourcentage de protection ( $\pm$ ET) de Moustiflore en fonction du temps vis-à-vis d' <i>Aedes albopictus</i> .....	8
<b>Figure 2</b> : Pourcentage de protection ( $\pm$ ET) de Moustiflore en fonction du temps vis-à-vis de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	8
<b>Figure 3</b> : Pourcentage des espèces de moustiques capturés dans les deux sites : Tsarasambo et Antetezambaro.....	10
<b>Figure 4</b> : Moyennes ( $\pm$ ET) du nombre de moustiques capturés sur les volontaires témoins et traités à Tsarasambo (gauche) et à Antetezambaro (droite).....	11
<b>Figure 5</b> : Moyennes du nombre de tentative de piqûre sur les volontaires témoins et traités à Tsarasambo (Gauche) et à Antetezambaro (droite).....	11

## 1. Objectifs

Au laboratoire : évaluer l'activité répulsive du produit moustiflore vis-à-vis de *Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus*.

*In natura* : tester l'efficacité réelle du produit moustiflore vis-à-vis des différentes espèces de moustiques sur terrain

## 2. Résumé

Produit testé : moustiflore (liquide sous forme spray)

Méthodes : tests directs sur volontaires au laboratoire et « *in natura* »

Insectes cibles : moustiques (*Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* et autres espèces)

Paramètres mesurés : pourcentage de protection (PR) et durée d'efficacité (DE)

Résultats au laboratoire : PR>99% et DE> 7 heures pour *Aedes albopictus*  
et PR>99% et DE>12 heures pour *Culex quinquefasciatus*

Résultats « *in natura* » : PR>98% et DE >10 heures

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Matériels

Matériels biologiques	: femelles adultes de <i>Aedes albopictus</i> et <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptères : Culicidae) provenant des quartiers de la ville d'Antananarivo, Madagascar
Insectarium du Laboratoire International Associé, campus IST Antananarivo, Madagascar	: salle (6×5×3 m <sup>3</sup> ) maintenue à ±26°C, ±70 % d'humidité relative et 12h/12 photopériode. Elle est équipée des matériels suivants : cages Gauze ou cages d'élevage pour les adultes, étagères, palettes, bacs d'élevage pour les stades pré-imaginaux, bocaux en verre pour les pupes, radiateurs, cuvettes remplies d'eau, thermo-hygromètre, pipettes à poire, aspirateurs à bouche respectivement pour la collecte nymphes et la capture des adultes, ovitraps ou pièges à ponte.  Les consommables utilisés pour l'élevage des moustiques sont : gants, coton, papier filtre, sucre
Tests sur volontaires au laboratoire et <i>in natura</i>	: volontaires (hommes et femmes adultes), cages de test (40×40×40 cm <sup>3</sup> ), aspirateur à bouche, gants, micropipette, lampes torches, minuteur, moustiflore, éthanol à 70°, Deet, aspirateur avec gobelet, Maisons tests, GPS, loupe binoculaire

#### 3.2. Méthodologie

##### ➤ *Collecte et élevage des moustiques*

Les larves et les nymphes d'*Aedes albopictus* et de *Culex quinquefasciatus* ont été collectées à l'aide des récipients en plastique munis d'une manche en bois. Les individus collectés ont été transvasés avec leur eau de gîte respectif dans des sceaux puis transportés à l'insectarium du Laboratoire International Associé. L'élevage des spécimens collectés a été réalisé avec les conditions suivantes : une température de 25 ±2 °C, une humidité relative aux de 70% environ et une photopériode de 12h/12. Les larves d'*Aedes albopictus* ont été nourries quotidiennement par des poudres de biscuits pour chien riche en Tetramin®. Les nymphes ont été triées et séparées des larves, puis elles ont été transférées dans des bocaux. Ces derniers ont été placés dans les cages d'élevage pour leur émergence. Les adultes (mâles et

femelles) émergents ont été élevés ensemble dans les mêmes cages afin d'assurer la reproduction et des cotons imbibés de solution de saccharose à 10% ont été suspendus à l'intérieur des cages pour servir de nourriture. Deux repas de sang (cochon d'Inde) par semaine ont été offerts aux femelles adultes âgées afin d'assurer la ponte pour obtenir de nouvelles générations. Des pièges à ponte ont été utilisés pour collecter les œufs pondus. Les papiers contenant ces œufs ont été immergés dans des bacs d'élevage remplis d'eau pour l'éclosion. Les femelles nullipares âgées de 5 à 12 jours ont été destinées aux tests. Pour le cas de *Culex quinquefasciatus*, la conduite d'élevage est la même que celle de *Aedes* mais elle s'arrêtait au stade adulte seulement ou les femelles émergentes ont été destinées directement aux tests.

➤ **Produits testés**

Trois produits ont été testés : le « moustiflore » dont le principe actif est le citriodiol, le deet (contrôle positif) et l'éthanol à 70° (contrôle négatif).

➤ **Tests sur volontaires au laboratoire (suivant le protocole OMS, 2009)**

50 moustiques femelles, âgées de 5 à 9 jours, préalablement mises à jeun pendant 12 h, ont été introduites dans une cage de test et des personnes (hommes et femmes) adultes âgés de 20 à 60 ans ont été choisies comme volontaires dans cette expérience. Pour *Aedes albopictus*, le nombre total de volontaires testés est de 24 dont 10 hommes et 14 femmes. Pour le cas de *Culex quinquefasciatus*, le nombre de volontaires testés est de 12 dont 6 hommes et 6 femmes.

Le test a été conduit sur une surface d'environ 600 cm<sup>2</sup> de la peau de l'avant-bras du volontaire. Tout d'abord, l'avant-bras de chaque volontaire a été nettoyé avec de l'eau du robinet puis séché avec une serviette. Ensuite, pour le contrôle négatif ou test témoin, la surface de la peau à traiter a été imprégnée de 1 ml d'éthanol 70° à l'aide d'une micropipette. Une fois que la surface de la peau a été séchée, l'avant-bras du volontaire a été introduit pendant 3 min dans la cage contenant les 50 moustiques femelles. La main du volontaire a été protégée contre les piqûres de moustiques à l'aide d'un gant en latex. Les moustiques qui ont atterri et/ou ont tenté de piquer sur la surface de la peau traitée du volontaire ont été comptés. Pour le cas du test avec le produit, nous avons effectué les mêmes manipulations que précédemment mais en changeant l'éthanol avec la solution de produit à tester. L'observation de l'activité répulsive a été faite toutes les 30 minutes sans ré-imprégnation du produit. Compte tenu des rythmes d'activité et d'agressivité des espèces de moustiques, les tests sur

*Aedes albopictus* ont eu lieu le jour à partir de 9h jusqu'à 16h tandis que les tests sur *Culex quinquefasciatus* se sont déroulés la nuit à partir de 18h jusqu'à 6h du matin. La lumière de la salle a été laissée éteinte toute la nuit mais des torches ont été utilisées pour toutes les observations.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de protection (PR%) du produit et ont été calculés par l'équation suivante :

$$PR\% = [(T - P)/T] \times 100$$

*T* : nombre de moustiques qui ont tenté de piquer l'avant-bras non traité (contrôle négatif ou témoin)

*P* : nombre de moustiques qui ont tenté de piquer l'avant-bras traité

➤ **Tests sur volontaires « in natura » (suivant le protocole OMS, 2009)**

L'évaluation sur terrain a été effectuée pendant le mois de Juillet 2021 dans les deux sites : Tsarasambo (S19°26'09,5''; E048°52'57,9'') et Antetizambaro (S18°00'50,6''; E049°24'07,2'') dans la côte Est de Madagascar. La méthode utilisée est la même que celle du test sur volontaire au laboratoire mis à part la surface de la peau traitée (600 cm<sup>2</sup>) qui se trouve à la jambe (du genou à la cheville). Les volontaires ont été constitués de 8 personnes dont 4 hommes et 4 femmes âgés de 20 à 67 ans parmi lesquels 2 personnes ont été désignées comme des volontaires témoins et 6 comme des volontaires traités dont 4 traités avec le « Moustiflore » et 2 traités avec le Deet 20%. Les volontaires ont été informés de l'objectif des tests et des consignes à suivre. Et ils ont été formés au préalable à la technique de capture des moustiques utilisant l'aspirateur avec gobelet.

Deux nuits consécutives d'échantillonnage ont été réalisées dans chaque site. Chaque nuit, 4 maisons distantes d'au moins 20 m ont été utilisées pour le test. Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants : maisons habitées, construites en bois avec une toiture en Falafa (constituée par des feuilles sèches de plantes).

L'une des jambes de chaque volontaire qui allait servir pour le test a été nettoyée par de l'eau et du savon non parfumé. Lorsque la surface de la peau de la jambe a séché, 1 ml d'éthanol à 70° a été imprégné sur la surface de la peau à traiter de chaque volontaire à l'aide d'une micropipette. Puis sur la peau des volontaires traités, 1 ml du produit (moustiflore ou Deet) a été imprégné. Les volontaires témoins ont été imprégnés seulement à l'éthanol. Tous le reste du corps des volontaires a été couvert pour éviter les piqûres sur les parties non traitées.

Les tests ont été conduits pendant 12h de temps à partir de 18h du soir jusqu'à 6h du matin. Durant le test, les volontaires ont capturé les moustiques qui ont tenté de piquer la surface de la peau traitée. Les moustiques capturés ont été mis dans les gobelets de capture. Ces gobelets ont été codés de façon à reconnaître la tranche d'heure de la capture, le produit imprégné sur le volontaire et son emplacement. Ils ont été collectés et remplacés toutes les tranches d'heures. Une surveillance régulière des volontaires a été faite pour assurer la fiabilité des données obtenues. Les moustiques capturés ont été triés puis identifiés morphologiquement sur le terrain à l'aide d'une loupe binoculaire (MOTIC ST-30, Chine) et en utilisant des clés d'identification des moustiques.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage par comparaison des moyennes du nombre de moustiques qui ont tenté de piquer la peau des volontaires (témoins et traités).

Le pourcentage de protection (PR%) du produit a été calculé par l'équation suivante :

$$PR\% = [(T - P)/T] \times 100$$

*T* : moyenne du nombre de moustiques capturés par les volontaires témoins à une heure donnée

*P* : moyenne du nombre de moustiques capturés par les volontaires traités à la même heure de test

#### 4. Résultats

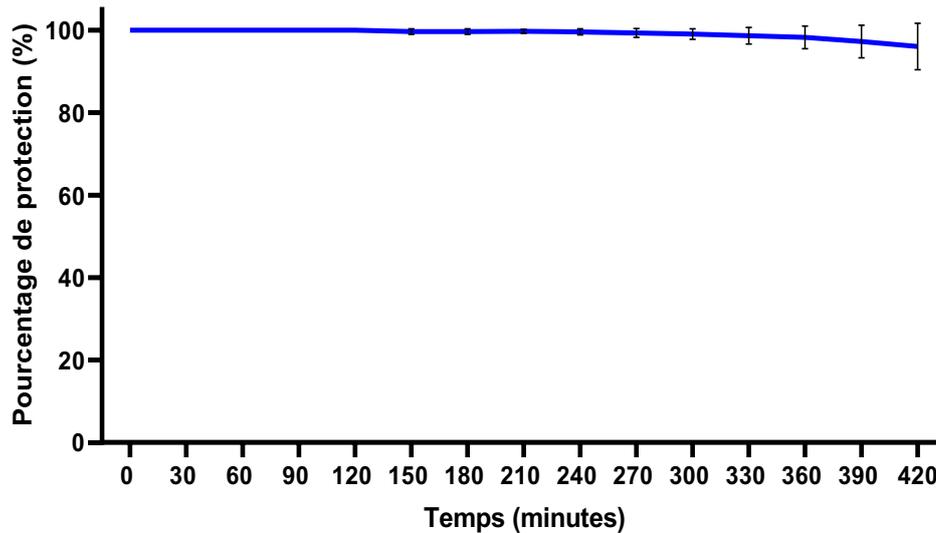
##### 4.1. Résultats des tests sur volontaires au laboratoire

###### ➤ Tests avec l'éthanol (contrôle négatif)

Les tentatives de piqûre sont observées dès le début jusqu'à la fin du test. La fréquence de ces tentatives varie suivant le rythme d'activité et d'agressivité des moustiques durant le test. Le pourcentage de protection est quasiment nul.

###### ➤ Test sur *Aedes albopictus*

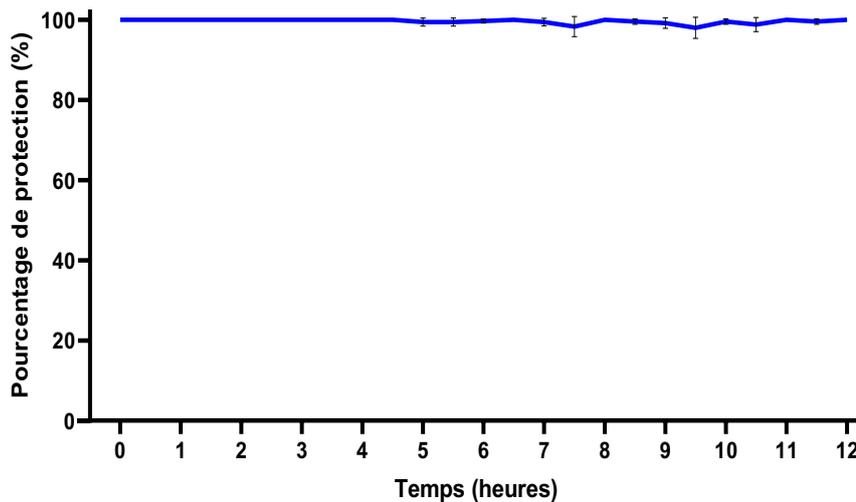
Le produit « Moustiflore » présente un pourcentage de protection de 100% même après 120 minutes d'application. Au delà de cette durée, les tentatives de piqûre ont été également enregistrées. L'effet répulsif du produit reste élevé et supérieur à 95% tout le long du test. La moyenne du pourcentage de protection de « Moustiflore » vis-à-vis d'*Aedes albopictus* est égale à 99,2 ±1% pendant 7 heures (Figure 1).



**Figure 1 :** *Pourcentage de protection ( $\pm$ ET) de Moustiflore en fonction du temps vis-à-vis d'Aedes albopictus*

➤ Test sur *Culex quinquefasciatus*

Le produit « Moustiflore » présente un pourcentage de protection de 100% même après 4 heures d'application. Les premières tentatives de piqûres sont observées à partir de 5h mais l'effet répulsif du produit reste élevé >95% jusqu'à la fin du test. La moyenne du pourcentage de protection de « Moustiflore » vis-à-vis de *Culex quinquefasciatus* est de  $99,6 \pm 0,4\%$  pendant 12 heures (Figure 2).



**Figure 2 :** *Pourcentage de protection ( $\pm$ ET) de Moustiflore en fonction du temps vis-à-vis de Culex quinquefasciatus*

**4.2.Résultats des tests sur volontaires « in natura »**

- Nombre des genres de moustiques capturés dans les deux sites : Tsarasambo et Antetezambaro

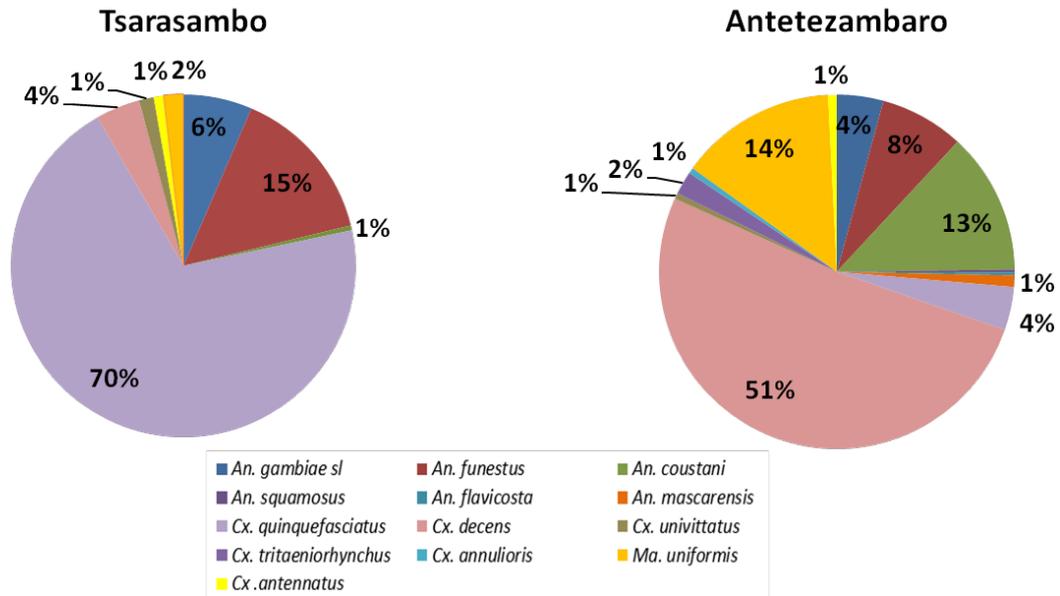
Nous avons capturé trois genres de moustiques dans les deux sites dont *Culex* est le plus abondant suivi d'*Anopheles* et de *Mansonia*.

**Tableau 1** : Effectif des genres de moustiques capturés à l'intérieur et à l'extérieur des maisons pendant les deux nuits consécutives d'échantillonnage

Sites	Genres	Intérieur	Extérieur	Total
<b>Tsarasambo</b>	<i>Anopheles</i>	13	34	47
	<i>Culex</i>	80	86	166
	<i>Mansonia</i>	2	2	4
	<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>122</b>	<b>217</b>
<b>Antetezambaro</b>	<i>Anopheles</i>	49	51	100
	<i>Culex</i>	76	149	225
	<i>Mansonia</i>	19	35	54
	<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>235</b>	<b>379</b>

- Pourcentage des espèces de moustiques capturés

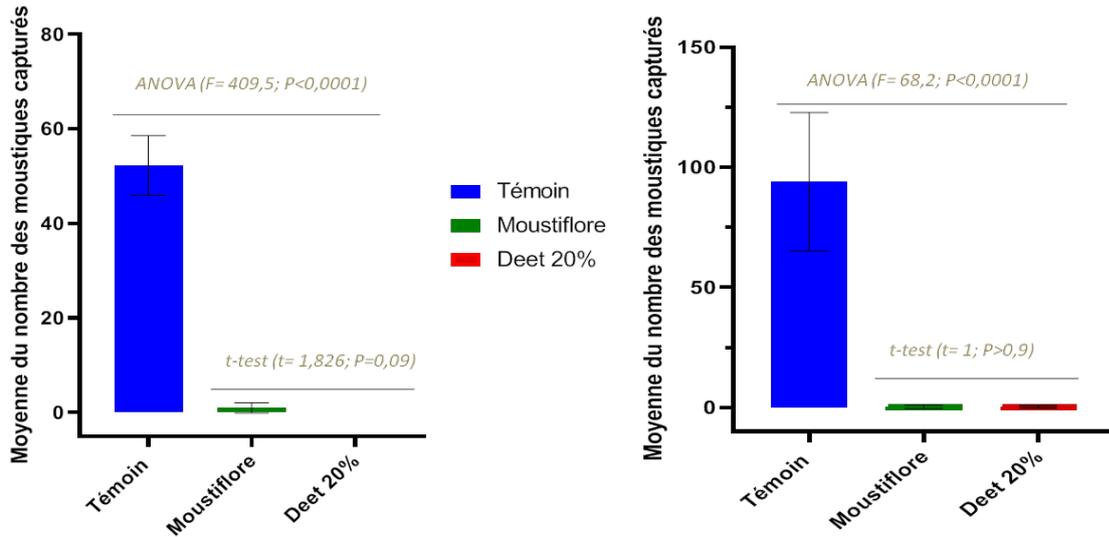
Les nombres d'espèces capturées dans les sites Tsarasambo et Antetezambaro sont de 8 et 13, respectivement. Les pourcentages de ces espèces sont détaillés dans la figure 3.



**Figure 3 :** Pourcentage des espèces de moustiques capturés dans les deux sites : Tsarasambo et Antetetzambaro

- Comparaison des moyennes du nombre des moustiques capturés chez les volontaires témoins et traités (Moustiflore et Deet)

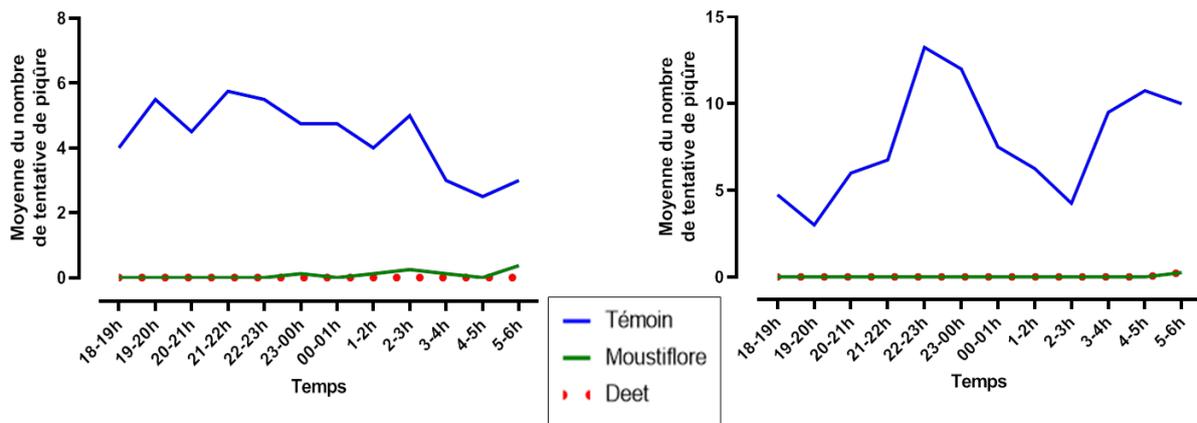
La moyenne du nombre de moustiques capturés chez les volontaires témoins est significativement supérieure à celle enregistrée chez les volontaires traités au Moustiflore et au Deet 20% (Figure 4). Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes du nombre de moustiques capturés chez les volontaires traités au Moustiflore et celles traitées au Deet 20% ( $P > 0,05$ ).



**Figure 4 :** Moyennes ( $\pm ET$ ) du nombre de moustiques capturés chez les volontaires témoins et traités à Tsarasambo (gauche) et à Antetezambaro (droite)

- Comparaison des moyennes du nombre de tentatives de piqûre sur les volontaires témoins et traités (Moustiflore et Deet)

A Tsarasambo, nous avons 3 à 6 tentatives de piqûre chez les volontaires témoins. Aucune tentative chez les volontaires traités au Moustiflore durant les 5 premières heures. A partir de la 6<sup>ème</sup> heure, on observe un nombre faible de tentative de piqûre par rapport à celui chez les volontaires témoins. Pour le site Antetezambaro, 3 à 14 tentatives de piqûre ont été enregistrées chez des volontaires témoins tandis qu’aucune tentative n’est enregistrée chez les volontaires traités au Moustiflore et au Deet sauf en fin de test (Figure 5).



**Figure 5 :** Moyennes du nombre de tentative de piqûre sur les volontaires témoins et traités à Tsarasambo (Gauche) et à Antetezambaro (droite)

➤ Pourcentage de protection (PR%)

Le Deet 20% présente une activité répulsive élevée contre les moustiques avec une moyenne de pourcentage de protection >99% pendant 12 heures sur terrain. Les pourcentages de protection à l'intérieur et à l'extérieur des maisons dans les deux sites sont indiqués dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Pourcentage de protection par le Deet 20% à l'intérieur et à l'extérieur dans chaque site et moyenne générale**

PR (ET) %					
Tsarasambo			Antetezambaro		
Temps (h)	Intérieur	Extérieur	Intérieur	Extérieur	
0 à 11	100	100	100	100	
12	100	100	94,7(5,3)	100	<b>Moyenne générale</b>
<b>Moyennes</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99,6(0,8)</b>	<b>100</b>	<b>99,9(0,2)</b>

Pour le cas du produit Moustiflore, il présente des effets répulsifs similaires à ceux du Deet à 20% durant le test mais on observe des variations du pourcentage de protection à partir de 6 heures de test notamment dans le site Tsarasambo et à l'extérieur des maisons. Ainsi, le pourcentage de protection a tendance à diminuer en fonction du temps. Cependant la moyenne enregistrée à l'extérieur des maisons dans ce site reste >95% à la fin du test. En général, le Moustiflore a un pourcentage de protection > 98% en moyenne sur 12 heures et de 100% jusqu'à 5 heures (Tableau 3).

**Tableau 3 : Pourcentage de protection de Moustiflore à l'intérieur et à l'extérieur des habitations dans chaque site d'étude**

PR (ET) %					
Tsarasambo			Antetezambaro		
Temps (h)	Intérieur	Extérieur	Intérieur	Extérieur	
0 à 5	100	100	100	100	
6	100	95,8(6,2)	100	100	
7	100	100	100	100	
8	95,5(6,2)	100	100	100	
9	100	93,8(6,3)	100	100	
10	100	87,5(18,8)	100	100	
11	100	100	100	100	
12	100	83,3(16,7)	94,7(7,9)	100	<b>Moyenne générale</b>
<b>Moyennes</b>	<b>99,6 (0,7)</b>	<b>96,7 (4,4)</b>	<b>99,5 (0,8)</b>	<b>100</b>	<b>98.85 (1,2)</b>

## 5. Conclusion

Le Moustiflore présente une bonne activité répulsive contre les moustiques aussi bien au laboratoire que sur terrain. Au laboratoire, il a un pourcentage de protection >99% contre les deux espèces *Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus* pendant 7h et 12h, respectivement. Les résultats sur terrain confirment ces observations avec un pourcentage de protection > 98% contre une large gamme d'espèces de moustiques appartenant aux trois genres : *Aedes*, *Culex* et même *Anopheles*.

## 6. Références

Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin - WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4.

Product Performances Test Guidelines OPPTS 810.3700 Insect repellents to be applied to Human Skin –United States Environmental Protection Agency EPA 2010.

Guidance on the Biocidal Products Regulation – Volume II Efficacy – Assessment and Evaluation (Parts B + C); ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY), Version 3.0 – April 2018.

American Society for Testing and Materials. (2006) E 939-94 Standard Test Method of Field Testing Topical Applications of Compounds as Repellents for Medically Important and Pest Arthropods (Including Insects, Ticks and Mites): I Mosquitoes.

Carroll, S. P. (2007) Chapter 12: Evaluation of topical insect repellents and factors that affect their performance. In *Insect Repellents: Principles, Methods and Uses*. Debboun, Frances, and Strickman, eds. CRC Press. (495 p.)

## 7. Règlement éthique des volontaires

Tous les sujets (bénévoles) se portent volontairement pour participer au test.

- Les volontaires ont été pleinement informés de la nature et des objectifs du test et de toutes les conséquences sur la santé physique et mentale. Ils n'ont pas été identifiés par leur nom dans les formulaires de collecte de données ou dans les rapports d'étude.
- Les volontaires sont autorisés à arrêter la procédure à tout moment sans pénalité et ils sont indemnisés pour leur temps et leur peine. Le niveau d'indemnisation n'est pas si élevé pour qu'il n'y ait pas une quelconque incitation à participer aux tests, ni si bas pour susciter l'intérêt de tous mais pas uniquement les personnes économiquement

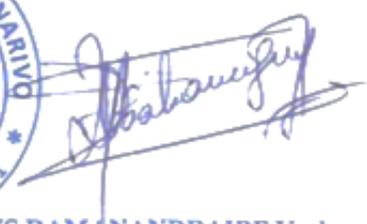
défavorisées. Malgré l'indemnisation, les sujets peuvent cesser à tout moment leur participation pour quelques raisons que ce soit, sans sacrifier les avantages auxquels ils ont droit.

- Les volontaires sont aptes à participer aux tests s'ils n'ont pas utilisé de parfums, de produits répulsifs et/ou de l'alcool dans les 12 heures avant et pendant le test. Ils ne sont pas des fumeurs, ou du moins ils sont sensés ne pas fumer les 12 heures avant et pendant le test.
- Les femmes âgées de moins de 18 ans et les personnes enceintes ou allaitantes ne sont pas éligibles comme volontaires pour l'étude. Les membres de certaines populations vulnérables, y compris les personnes à capacité mentale limitée, les personnes en mauvaise santé ou dont le système immunitaire est affaibli, ceux qui sont sensibles aux produits chimiques, sensibles aux répulsifs ou aux piqûres d'insectes sont exclus.
- Les volontaires ont été formés à la capture des moustiques à l'aide des aspirateurs à gobelets avant qu'ils se fassent piquer.

Fait à Antananarivo, le 03 novembre 2021

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO  
laboratoire  
international  
santé  
UNIVERSITE DE LYON 1

La Directrice



ESTALYS RAMANANDRAIBE Voahangy  
Professeur