

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY
LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE
LABORATORY OF PARASITOLOGY AND ECOLOGY

Analyse de la résistance aux insecticides des populations d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae), vecteurs d'arboviroses au Cameroun

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Animaux
Option : Parasitologie et Ecologie

Par

YOU GANG Aurélie Prisca

Matricule : 11Q0768

Master ès Sciences

Sous la co-direction de

WONDJI Charles Sinclair
Professeur
Liverpool School of Tropical
Medicine

NJIOKOU Flobert
Professeur
Université de Yaoundé I



Le 30 juin 2022 devant le jury suivant :

Président :	FOMENA Abraham, Professeur	Université de Yaoundé I ;
Rapporteurs :	NJIOKOU Flobert Professeur	Université de Yaoundé I ;
	WONDJI Charles Sinclair, Professeur	Liverpool School of Tropical Medicine ;
Membres :	DJIETO Lordon Champlain, Professeur	Université de Yaoundé I ;
	TCHUENGUEM FOHOUE Fernand, Professeur	Université de Ngaoundéré ;
	TOMBI Jeannette, Maître de Conférences	Université de Yaoundé I.

Année académique 2021-2022

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET
PHYSIOLOGIE ANIMALES
BP 812 – Tél : (237) 222-56-59
Fax : (237) 233-46-96
CAMEROUN

ATTESTATION DE CORRECTION

Conformément à l'autorisation de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D N°22/1505/UYI/VREPD TIC/DAAC/DEPE/SSPE/CB-AP du 13 juin 2022 de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I, la thèse intitulée « **Analyse de la résistance aux insecticides des populations d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae), vecteurs d'arboviroses au Cameroun** » a été présentée et soutenue publiquement le **jeudi 30 juin 2022** par l'étudiante **YOUGANG Aurélie Prisca**, Matricule **11Q0768**. Le document final a été corrigé suivant les recommandations du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le 04 novembre 2022

Examineur


F. J. TOMBÉ

Président du Jury


A. U. FONTENA

Le Chef de Département




Charles Félic
Bilong Bilong
Professeur

11 NOV 2022

ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affaires
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal,
Maître de Conférences

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :
AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOU Marceline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste

25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste

33	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Assistant	En poste
34	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Assistant	En poste
35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (51)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste

9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste

37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	AMPON NSANGO Indou	Assistant	En poste
43	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
44	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
45	FEUGANG YOUNSSI François	Assistant	En poste
46	FOKAM Alvine Christelle Epse KEGNE	Assistante	En poste
47	GONWOUE NONO Legrand	Assistant	En poste
48	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
49	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
50	NWANE Philippe Bienvenu	Assistant	En poste
51	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (31)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste

11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
13	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

25	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Assistant	En poste
26	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
27	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
28	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
29	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
30	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
31	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>

4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
13	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
14	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

20	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
21	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
22	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
23	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
24	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
25	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
26	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
27	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINPROFF
28	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
29	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

30	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
31	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste

32	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste
----	-------------------	-----------	----------

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (40)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasia	Maître de Conférences	En poste

26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
35	NONO NONO Éric Carly	Assistant	En poste
36	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Assistante	En poste
37	TCHAMGOUE Joseph	Assistant	En poste
38	TSAFFACK Maurice	Assistant	En poste
39	TSAMO TONTSA Armelle	Assistante	En poste
40	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste

10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (35)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UYI</i>

9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11			
12	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
13	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
17	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
18	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
26	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29	LOUMNGAM KAMGA Victor	Assistant	En poste
30	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
31	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
32	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
33	OGADOA AMASSAYOGA	Assistant	En poste
34	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste
35	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (21)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
8	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste

14	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
17	MONI NDEDI Esther Del Florence	Assistante	En poste
18	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
19	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
20	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Assistante	En poste
21	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (44)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UIYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmélina
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	DJOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Assistante	En poste
41	LAMARA Maurice	Assistant	En poste
42	OTTOU ABE Martin Thierry	Assistant	En poste
43	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
44	WANDJI NYAMSI William	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
---	----------------------------	-----------------------	-------------------------

9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste

38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	05 (02)	40 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	10 (03)	51 (15)
BPV	07 (01)	9 (01)	8 (06)	07 (01)	31 (9)
CI	10 (01)	09 (02)	10 (02)	03 (0)	32 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	08 (02)	40 (9)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	09 (02)	34 (7)
MIB	3 (0)	5 (03)	05 (01)	06 (02)	19 (6)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	08 (03)	46 (8)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42 (7)
Total	75 (5)	104 (30)	115 (31)	66 (16)	360 (86)

Soit un total de	360 (86) dont :
- Professeurs	75 (5)
- Maîtres de Conférences	104 (30)
- Chargés de Cours	115 (31)
- Assistants	66 (16)
 () = Nombre de Femmes	 86

DEDICACE

A ma maman, **NONO Virginie Flore**. Maman c'est ton courage, ta témérité et plein d'autres vertus que tu as, qui ont forgé en partie, la personne que je suis. Ces quelques mots ne pourraient suffire pour te dire merci pour tous les sacrifices que tu as dû faire pour l'épanouissement de mes frères et moi. Que ce travail et ses fruits puissent changer tout chagrin et toute douleur en joie et en allégresse dans ta vie.

REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'aboutissement de quatre années de travail acharné. Elle vient ici témoigner la grâce incommensurable de l'Éternel sur ma vie. Je viens donc dire toute ma reconnaissance à l'Alpha et l'Omega de ma vie pour la santé, l'intelligence, la force, les ressources et pour toutes les personnes qu'il a utilisées pour la réalisation de ce travail qui a bénéficié du soutien financier du projet Wellcome Trust Training Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (204862) accordé au Dr David Basile KAMGANG MBOUHOM.

Ainsi ma reconnaissance va à l'endroit de toutes les personnes qui ont contribué de quelques manières que ce soit, aussi par leurs enseignements, ou conseils, ou soutiens moraux, ou soutiens spirituels et soutiens financiers.

Mes sincères remerciements A/Au/Aux :

- **Professeur Charles Sinclair WONDJI** qui n'a pas seulement accueilli une étudiante, mais également une fille. Je me souviens du premier échange lors de mon interview, quand il m'a demandé quel pouvait être le frein pour mes travaux ? Et j'ai répondu les finances. La réponse de ce jour m'a donné de vouloir toujours me surpasser en toute chose. Il est pour moi un véritable mentor et sa rigueur scientifique n'est plus à démontrer ;
- **Professeur Flobert NJIOKOU** qui a accepté de suivre ce travail et qui m'a orienté, il y'a quelques années vers l'unité de recherche de la "Liverpool School of Tropical Medicine" (LSTM) devenue "Centre for Research in Infectious Disease" (CRID). Merci pour tous les conseils et critiques pour améliorer ce travail ;
- **tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales** pour la qualité des enseignements reçus. Je pense en particulier aux Professeurs **Charles Félix BILONG BILONG**, **Abraham FOMENA**, **Sevilor KEKEUNOU** et **Jeannette TOMBI...** ;
- **Experts et Membres du Jury** qui ont bien voulu accepter d'évaluer ce travail dont les corrections et les commentaires amélioreront la qualité du document final ;
- **Docteur David Basile KAMGANG MBOUHOM**, qui plus qu'un encadreur, est un père pour moi. Il a su me transmettre ses connaissances en entomologie médicale notamment en ce qui concerne le monde des *Aedes* et des arbovirus ;
- Docteurs **Emmanuel ELANGA**, **Billy TENE FOSSOG**, **Huguette SIMO**, **Delia DJUICY**, **Trésor TANEKOU MELACHIO**, **Marcel SANDEU Magellan TCHOUAKUI**, **Benjamin MENZE**, **Caroline FOUET**, **Colince KAMDEM** et

Professeur Cyrille NDO, pour les conseils et orientations apportées au cours de ce travail ;

- madame **Murielle WONDJI** avec qui j'ai fait mes premiers pas dans les techniques de biologie moléculaire ;
- membres de mon équipe : **TEDJOU Armel, WILSON-BAHUN Theodel** pour la bonne atmosphère de travail qu'ils ont créée, pour leur soutien dans la collecte des échantillons, l'analyse et l'interprétation de certains résultats de ce travail ;
- mes camarades de laboratoire **DJOUNKWA Lynda, MUGENZI Léon, NAKEBANG Amen, KOUAMO Mersimine, SANDEU Ruth, BINYANG Achille, FOTSO Yvan, WAMBA Amelie, MAFFO Claudine, SADO Francine, DJONABAYE DOUMANI, BOUAKA Calmes, NKEMGO Francis, ASHU Fred, AMBADIANG MAE Marilene** pour leur collaboration et les moments de détente ;
- mon cadet de laboratoire **KEUMEGNI Christophe** pour son dynamisme et sa volonté à apprendre ;
- techniciens de laboratoire : **TCHAPGA Williams, TCHOUPPO Mi-carême, EBAI TERENCE, MBAKAM Bertrand, TCHAWA Thierry** pour leur collaboration ;
- chauffeurs du CRID : **M. DAOUDA Robert**, le "chauffeur entomo" et **M. WIRSIY Charles** pour leur disponibilité à me conduire sur le terrain pour la collecte d'échantillons à chaque fois que c'était nécessaire ;
- reste du staff du CRID pour leur disponibilité et leur accessibilité ;
- mon essentiel, mon champion, mon merveilleux époux, le **Dr. Daniel NGUIFFO NGUETE**. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude pour tous les efforts qu'il a consentis pour l'accomplissement de ce travail. Je me souviens encore comment il me mettait la pression pour que je puisse finir ma thèse, jusqu'à aller établir un plan de rédaction par partie ;
- mes oncles papa **NJAMPOU Joseph**, tonton **TCHASSE Wulfried** et à ma tante maman **TCHANTCHOU Anne** pour leur amour et leur soutien ;
- couple **FOFIE**, leur maison a été pour moi, un nid d'amour. Merci encore pour les conseils et surtout le soutien spirituel ;
- couple **CHOUAKAM** pour leur grand amour et leur soutien multiforme ;
- Pasteur **Joseph-Calvin TSESSIDE et son épouse**, merci pour tous les conseils et le soutien spirituel ;
- Papa **NGUETE Philippe** et maman **NGUETE Philomène Claire**, mes seconds parents, pour leur amour et leur soutien multiforme ;

- mes frères et sœurs : **NGUEPJOUO Gaël, NJAMPOU Ariel, KAMGUE Daniel, SIGNE Jean Pierre, MBEKAM Myriam, MABAH Marie Joseph, NDE Divine, GATEU Victoria, TSESSIDE Selma, NGOMO Aurel et NDEMBWE Aurélie.** Merci pour leur amour et leur soutien chacun à sa façon ;
- **grandes familles** généalogiques et par alliances auxquelles j'appartiens, pour l'amour, l'encadrement et l'éducation reçus ;
- monsieur **FEZEU Billy Romuald**, dont l'amitié a été pour moi un grand moteur d'encouragement dans la réalisation de ce travail ;
- monsieur **YONKEU Theris DJEUKAM**, plus qu'un ami, il est un frère. Il a été là toujours pour moi.

SOMMAIRE

ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTE DES SCIENCES.....	i
DEDICACE	xviii
REMERCIEMENTS	xix
SOMMAIRE.....	xxii
LISTE DES FIGURES	xxv
LISTE DES TABLEAUX.....	xxvi
LISTE DES ABREVIATIONS	xxvii
RESUME	xxviii
ABSTRACT.....	xxx
Introduction.....	1
Chapitre I : Revue de littérature	5
I.1. Définition des arbovirus	6
I.2. Description des arboviroses.....	6
I.2.1. Cas de la dengue.....	6
I.2.2. Cas du chikungunya	8
I.2.3. Cas du Zika	9
I.2.4. Cycle de transmission de la dengue, du chikungunya et du Zika.....	10
I.2.5. Facteurs responsables de l'émergence de la dengue, du chikungunya, et du Zika.....	11
I.2.6. Situation de la dengue, du chikungunya, et du Zika au Cameroun	12
I.3. Vecteurs des virus de la dengue, du chikungunya, et du Zika	13
I.3.1. Position systématique des <i>Aedes</i>	13
I.3.2. Biologie et cycle de vie des <i>Aedes</i>	13
I.3.3. Interaction entre <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i>	16
I.3.4. Distribution d' <i>Aedes aegypti</i> et d' <i>Aedes albopictus</i> au Cameroun.....	17
I.4. Lutte contre la dengue, le chikungunya, et le Zika	19
I.4.1. Traitements médicamenteux et prise en charge	19
I.4.2. Vaccins	20
I.4.3. Lutte anti-vectorielle	20
I.5. Classification des insecticides	22
I.5.1. Organochlorés.....	23

I.5.2. Organophosphorés	23
I.5.3. Carbamates	23
I.5.4. Pyréthrinoïdes	24
I.5.5. Autres familles d'insecticides	24
I.6. Résistance aux insecticides chez les moustiques	25
I.6.1. Généralités sur la résistance	25
I.6.2. Mécanismes de résistance aux insecticides	26
I.6.3. Résistance par modification de cible	27
I.6.4. Résistance métabolique	29
I.7. Etat de la résistance aux insecticides chez les <i>Aedes</i> au Cameroun	30
I.8. Quelques techniques de biologie moléculaire utilisées dans cette étude	31
I.8.1. Extraction de l'ADN	31
I.8.2. Réaction de polymérisation en chaîne	31
I.8.3. Séquençage de l'ADN génomique	33
I.8.4. Electrophorèse et révélation des produits amplifiés par PCR	33
Chapitre II : Matériel et méthodes	34
II.1. Matériel	35
II.1.1. Cadre d'étude	35
II.1.2. Quelques éléments caractéristiques des différentes localités prospectées.	36
II.1.3. Matériel biologique	40
II.1.4. Matériel non biologique	40
II.2. Méthodes	41
II.2.1. Récolte du matériel biologique	41
II.2.2. Tests de sensibilité aux insecticides	42
II.2.3. Recherche des mécanismes impliqués dans la résistance métabolique aux insecticides chez <i>A. aegypti</i> et <i>A. albopictus</i>	45
II.2.4. Recherche des mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides par modification de cible d' <i>Aedes aegypti</i> et d' <i>Aedes albopictus</i> au Cameroun	47
II.2.5. Exploitation et analyses des données	51
Chapitre III : Résultats et discussion	55
III.1. Résultats	56

III.1.1. Niveau de sensibilité aux insecticides des populations naturelles d'<i>Aedes aegypti</i> et d'<i>Aedes albopictus</i> du Cameroun.....	56
III.1.2. Mécanismes de résistance métabolique impliqués dans la résistance aux insecticides chez <i>A. aegypti</i> et <i>A. albopictus</i> au Cameroun.....	64
III.1.3. Mécanismes de résistance impliqués dans la résistance aux insecticides par modification de cible chez <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i> au Cameroun	67
III.2. Discussion.....	75
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	82
ANNEXES	Error! Bookmark not defined.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition mondiale des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika.....	8
Figure 2 : Cycles de transmission des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika.....	11
Figure 3 : Cycle de développement des <i>Aedes</i>	14
Figure 4 : Photo des larves d' <i>Aedes</i>	15
Figure 5 : Photographie des moustiques <i>Aedes aegypti</i> (A) et <i>Aedes albopictus</i> (B).....	16
Figure 6 : Mécanismes de résistance aux insecticides	27
Figure 7 : Principaux domaines climatiques du Cameroun	36
Figure 8 : Carte du Cameroun montrant les différents sites de collecte des échantillons de moustiques.....	42
Figure 9 : Photo montrant la mise en œuvre des bio-essais larvaires	43
Figure 10 : Procédure du test de sensibilité aux insecticides	45
Figure 11 : Exemple de chromatogramme d'une portion du gène canal sodium	53
Figure 12 : Expression des gènes <i>CYP9M6F88/87</i> , <i>CYP9J28a</i> , <i>CYP9J10</i> et <i>CYP9J32</i> au sein des échantillons d' <i>A. aegypti</i> provenant de Meiganga	65
Figure 13 : Expression des gènes <i>CYP9M6F88/87</i> , <i>CYP9J28a</i> , <i>CYP9J10</i> , <i>CYP9J32</i> et <i>GSTe2</i> au sein des échantillons d' <i>A. aegypti</i> provenant de Douala.....	66
Figure 14 : Expression du gène <i>CYP6P12</i> au sein des échantillons d' <i>A. albopictus</i> provenant de Bafang et de Bertoua.....	67
Figure 15 : Séquençage d'une portion du gène du canal sodium voltage dépendant couvrant la mutation F1534C.....	69
Figure 16 : Diversité et polymorphisme génétique au sein du canal sodium voltage dépendant couvrant la mutation F1534C chez <i>Aedes aegypti</i>	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Localités et périodes de collecte des échantillons d' <i>Aedes</i>	39
Tableau II : Séquences d'amorces pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR et leurs origines chez <i>Aedes albopictus</i>	47
Tableau III : Séquences d'amorces pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR et leurs origines chez <i>Aedes aegypti</i>	47
Tableau IV : Composition du milieu réactionnel de la PCR permettant de révéler la mutation F1534C chez <i>Aedes aegypti</i>	49
Tableau V : Composition du milieu réactionnel de la PCR permettant de révéler la mutation F1534C chez <i>Aedes albopictus</i>	50
Tableau VI : Composition du milieu réactionnel de la PCR permettant d'amplifier le domaine III du VGSC chez <i>Aedes aegypti</i>	51
Tableau VII : Sensibilité des larves d' <i>Aedes albopictus</i> et d' <i>Aedes aegypti</i> vis-à-vis du téméphos	57
Tableau VIII : Sensibilité des larves d' <i>Aedes albopictus</i> vis-à-vis <i>Bti</i>	58
Tableau IX : Niveau de sensibilité des différents échantillons d' <i>Aedes albopictus</i> exposés aux insecticides	60
Tableau X : Niveau de sensibilité des différents échantillons d' <i>Aedes aegypti</i> exposés aux insecticides	63
Tableau XI : Effectifs des génotypes et fréquence des allèles au locus F1534C chez <i>Aedes aegypti</i>	68
Tableau XII : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène VGSC chez <i>Aedes aegypti</i> du Cameroun.....	71

LISTE DES ABREVIATIONS

Ace : Acétylcholinestérase

Bti : *Bacillus thuringiensis israeliensis*

CDC : "Centers for Disease Control and Prevention"

CHIKV : virus du chikungunya

CRID : "Centre for Research in Infectious Disease"

DDT : Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane

DEM : DiEthylMaléate

DEN-1 : dengue sérotype 1

DEN-2 : dengue sérotype 2

DEN-3 : dengue sérotype 3

DEN-4 : dengue sérotype 4

DENV : virus de la dengue

dNTPs : dinucléotides triphosphates

F1534C : changement de la phénylalanine en cystéine à la position 1534 du domaine III du canal sodium et associé à la résistance aux pyréthriinoïdes

GABA : Acide Gamma AminoButyrique

GSTs : Glutathion-s-transférases

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

Nm : nanomètre

mA : milliampère

Kdr : "Knockdown resistance"

Pb : paire de bases

PBO : Piperonyl ButOxyde

ULV: ultra-low volume

ZIKV : virus du Zika

RESUME

Les arboviroses notamment la dengue, le chikungunya, la fièvre jaune et le Zika sont de plus en plus signalées au Cameroun. Les virus responsables de ces affections sont transmis par la piqûre infectante de moustiques du genre *Aedes*, principalement *Aedes aegypti* Linné, 1762 et *Aedes albopictus* Skuse, 1894. En absence de traitements spécifiques et de vaccins efficaces contre ces arboviroses, la lutte anti-vectorielle demeure la mesure la plus efficace pour prévenir la transmission des virus responsables de ces maladies et pour faire face aux épidémies. Au Cameroun, les données sur la résistance aux insecticides de ces vecteurs et sur les mécanismes de résistance sous-jacents restent rares, ce qui ne permet donc pas de préparer une riposte efficace en cas de survenue d'une épidémie de ces maladies. C'est ainsi que cette étude vise à analyser à l'échelle nationale, le profil de résistance d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* aux insecticides et d'explorer les potentiels mécanismes de résistance impliqués.

Pour ce faire, les stades pré imaginaires des *Aedes* ont été collectés dans 24 localités du Cameroun entre mars et juillet 2017. Transportés à l'insectarium, ces derniers ont été élevés et maintenus jusqu'à obtention des générations 1, 2 et 3. Les tests de sensibilité aux insecticides ont été réalisés aussi bien pour les larves que les adultes suivant le protocole de l'OMS. Les adultes de génération 0 (G0) ont été utilisés pour le génotypage d'une portion du gène canal sodium voltage dépendant, contrôlant la mutation F1534C, et l'analyse de la diversité génétique. Dans le but d'évaluer le rôle de la résistance métabolique, des tests avec une préexposition aux synergistes piperonyl butoxide (PBO) et diéthyl maléate (DEM) ont été réalisés d'une part et d'autre part des PCR en temps réel pour évaluer l'expression de certains gènes connus impliqués dans la résistance aux insecticides.

Les bio-essais larvaires avec le téméphos et/ou *Bacillus thuringiensis israelensis* ont montré une sensibilité pour les deux espèces. Les bio-essais adultes ont montré un profil de résistance variable en fonction de l'espèce, de la molécule insecticide testée et de la localité. Ainsi tandis qu'on a observé un niveau élevé de sensibilité aux pyréthrinoïdes dans la plupart des échantillons d'*A. aegypti*, ceux d'*A. albopictus* ont plutôt présenté des niveaux de résistance très élevés notamment à la perméthrine (34,16% - 85,23% de taux de mortalité). Les deux espèces se sont révélées résistantes au DDT (12,42% - 87,1%), au propoxur (60,8% - 88,9%) mais totalement sensibles au fénitrothion. Il a été observé une restauration partielle ou totale de la sensibilité aux insecticides après une préexposition des moustiques aux synergistes piperonyl butoxide (PBO) à 4% et diéthyl maléate (DEM) à 8%. Le gène *CYP6P12* s'est avéré

significativement surexprimé dans les échantillons d'*A. albopictus* de Bafang et Bertoua comparé à la souche sensible VCRU. Le génotypage et le séquençage d'une portion du canal sodium ont permis de détecter la mutation F1534C chez *A. aegypti* provenant de deux localités, avec une fréquence allélique de 3,3 % (Edéa) et 33,3 % (Douala). Cependant, la faible diversité génétique au niveau du gène canal sodium suggère une introduction récente de cette mutation au Cameroun.

Les données générées par cette étude montrent que les actions de lutte anti-vectorielle devraient tenir compte de la spécificité de chaque localité. De plus, une surveillance régulière et continue de la résistance serait nécessaire pour sélectionner les insecticides les plus efficaces pour la lutte contre les *Aedes*.

Mots clés : *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, arbovirus, résistance aux insecticides, mutation kdr, résistance métabolique, Cameroun.

ABSTRACT

Arboviruses such as dengue, chikungunya and Zika viruses are increasingly reported in Cameroon. These viruses are transmitted to humans by the bite of infected mosquitoes of *Aedes* genus mainly *Aedes aegypti* Linné, 1762 and *Aedes albopictus* Skuse, 1894. As there is no specific treatment or effective vaccine against these arboviruses, vector control remains the cornerstone to prevent the transmission of these viruses and for dealing with epidemics. In Cameroon, data on the insecticide resistances of *Aedes* vectors and underlying mechanisms needed for outbreak preparedness remain scarce. This study therefore aims to analyse the nationwide resistance profile of *A. aegypti* and *A. albopictus* to insecticides and to explore the potential resistance mechanisms involved.

For this purpose, immature stages of *Aedes* were collected between March and July 2017 in 24 locations across Cameroon, transported to the insectary and reared until G1/G2 and G3 generation. Larval and adult bioassays were carried out according to WHO recommendations. F1534C mutation was genotyped using allele specific PCR in field collected adults (Go) and the polymorphism of the sodium channel gene was also assessed. In the aim to assess the involvement of metabolic resistance, [piperonylbutoxide (PBO) and diethyl maleate (DEM)] assays were carried out in one hand and in other hand real time PCR were used to evaluate the expression of some gens known as involved in the insecticide resistance.

Larval bioassays with temephos and / or *Bti* showed the susceptibility for both *Aedes* species tested. Adult bioassays showed a variable level of resistance according to the species, the insecticide used and the sampling location. Thus, while a high level of susceptibility to pyrethroids was observed in most *A. aegypti* samples, those of *A. albopictus* rather presented very high levels of resistance, especially to permethrin (34.16% - 85.23% of mortality rate). Both species were resistant to DDT (12.42% - 87.1%), propoxur (60.8% - 88.9%) but totally susceptible to fenitrothion. A full or partial recovery of susceptibility was observed when mosquitoes were pre-exposed to PBO or DEM and then to DDT and permethrin. The *CYP6P12* gene was found to be significantly overexpressed in samples of *A. albopictus* from Bafang and Bertoua compared to the susceptible strain VCRU. Genotyping and sequencing of a portion of the sodium channel detected the F1534C mutation in two samples of *A. aegypti* resistant to pyrethroids, with an allelic frequency of 3.3% (Edéa) and 33.3% (Douala). However, the low genetic diversity in the voltage gate sodium channel gene suggests a recent introduction of this mutation in Cameroon.

The data generated by this study show that vector control actions should take into account the specificity of each locality and a regular and continuous resistance monitoring would be necessary to select the most effective insecticides for *Aedes* control.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, arboviruses, insecticides resistance, kdr mutation, metabolic resistance, Cameroon.

Introduction

Depuis le début du 20^{ème} siècle, les maladies à transmission vectorielle sont au premier plan, car elles constituent la principale cause de mortalité parmi les maladies infectieuses (Kalluri *et al.*, 2007). De tous les arthropodes vecteurs, les moustiques sont de loin les plus concernés et les plus redoutables car ils sont vecteurs de nombreux agents pathogènes à l'instar des arbovirus tels que les virus de la fièvre jaune, de la dengue, du chikungunya, du Zika, etc (Aubry et Gaüzère, 2013). De toutes ces arboviroses, la dengue est la plus importante en termes de morbidité et mortalité. Selon une estimation issue d'une modélisation, on compterait environ 390 millions de cas de dengue par an (intervalle crédible à 95% 284-528 millions), dont 96 millions (67-136 millions) présentent des manifestations cliniques (Bhatt *et al.*, 2013). La dengue est causée par un virus du genre *Flavivirus* (famille des Flaviviridae) transmis à l'Homme par des moustiques du genre *Aedes*, principalement *Aedes aegypti* Linné, 1772 et *A. albopictus* Skuse, 1894 (Gubler, 2002a; Paupy *et al.*, 2009). Outre le virus de la dengue, ces deux espèces de moustiques constituent les principaux vecteurs du virus causant le Zika et la fièvre jaune appartenant au même genre et du virus causant le chikungunya appartenant quant à lui au genre *Alphavirus* (famille des Togaviridae).

Aedes aegypti et *A. albopictus* sont d'origines différentes. *A. aegypti* est originaire d'Afrique (Christophers, 1960) et se trouve partout dans les tropiques, alors qu'*A. albopictus* est originaire d'Asie (Smith, 1956), mais s'est répandu sur tous les continents notamment en Afrique (Gratz, 2004). *A. aegypti* et *A. albopictus* sont présents au Cameroun. *A. aegypti* est distribué à travers le pays alors que *A. albopictus* a une répartition limitée dans la partie sud du pays où il tend à supplanter l'espèce indigène *A. aegypti* (Simard *et al.*, 2005; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2010; Tedjou *et al.*, 2019). Des travaux menés récemment au Cameroun ont démontré que les échantillons d'*A. albopictus* comme ceux d'*A. aegypti* collectés dans différents milieux écologiques sont capables de transmettre les virus de la dengue 2 (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2019) et du Zika (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2020a).

Compte tenu de l'absence actuelle de vaccins et de médicaments spécifiques contre la plupart de ces infections à arbovirus, le seul moyen d'enrayer, voire de prévenir les épidémies reste la lutte anti-vectorielle (Gubler, 1998). Cette lutte est basée essentiellement sur la destruction des gîtes larvaires et l'utilisation des insecticides, notamment les larvicides contre les stades immatures et adulticides en situation d'urgence (WHO, 1997; 2006). Cependant, les travaux réalisés dans différents pays à travers le monde ont montré que les populations de vecteurs étaient résistantes à toutes les familles d'insecticides connues avec des niveaux variables d'un pays à l'autre. Face à l'émergence de la résistance d'*Aedes* à toutes les classes d'insecticides utilisées en santé publique, les efforts de lutte pourraient être compromis. Pour

faire face à une telle situation, il est nécessaire d'évaluer régulièrement la distribution de la résistance ainsi que les mécanismes de résistance impliqués.

Au Cameroun, des études préliminaires sur le profil de résistance d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* aux insecticides ont révélé la résistance à la deltaméthrine et au DDT (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017), mais la distribution à l'échelle du pays reste à déterminer ainsi que les mécanismes de résistance impliqués. Il est donc impératif de combler ce gap en menant une étude à l'échelle du pays dans l'optique de développer des stratégies de gestion de la résistance qui tiendront compte des spécificités de chaque localité.

QUESTIONS DE RECHERCHE

- ❖ Les populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun sont-elles résistantes aux insecticides utilisés en santé publique ?
- ❖ La résistance métabolique contribue-t-elle à la résistance des populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun ?
- ❖ La résistance par modification de cible est-elle impliquée dans la résistance des populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun ?

HYPOTHESES DE RECHERCHE

- ❖ Les populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun seraient résistantes aux insecticides utilisés en santé publique.
- ❖ La résistance métabolique contribuerait à la résistance des populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun.
- ❖ La résistance par modification de cible serait impliquée dans la résistance des populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun.

OBJECTIF GENERAL

Cette étude a pour but d'analyser le profil de résistance et les mécanismes de résistance aux insecticides dans les populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus*, vecteurs d'arboviroses au Cameroun.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

Plus spécifiquement il s'agit :

- d'analyser la sensibilité des populations sauvages d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun aux insecticides ;
- déterminer le rôle de la résistance métabolique dans la résistance aux insecticides d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* au Cameroun ;

- d'investiguer sur la contribution de la résistance aux insecticides par modification de cible chez *A. aegypti* et *A. albopictus* au Cameroun.

Ce travail est organisé en trois chapitres encadrés par une introduction et une conclusion. Le premier chapitre présente un état des connaissances sur les arbovirus, les vecteurs d'arbovirus et la résistance aux insecticides. Le deuxième porte sur la méthodologie utilisée ; il décrit les sites d'étude, les protocoles utilisés, ainsi que les méthodes d'analyses et d'interprétations des résultats. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus et leur discussion.

Chapitre I : Revue de littérature

I.1. Définition des arbovirus

Le terme arbovirus (de l'expression anglaise "arthropod borne virus") regroupe un ensemble de virus transmis habituellement, dans les conditions naturelles, de vertébré à vertébré par un arthropode hématophage (moustiques, tiques, puces...) qui joue le rôle de vecteur. Ils causent des affections appelées arboviroses qui sont des anthroponoses, l'Homme n'étant pas le seul hôte vertébré susceptible d'être infecté. Il y a par ailleurs toujours répllication virale chez le vecteur. Hormis quelques rares exceptions, tous les arbovirus appartiennent à cinq familles de virus : *Togaviridae* (genre *Alphavirus* : virus du chikungunya, virus O'nyong nyong, virus du Ross River...), *Flaviviridae* (genre *Flavivirus* : virus de la dengue, virus du Zika ...), *Peribunyaviridae* (genre *Phlebovirus* : virus de la fièvre de la vallée du Rift...), *Reoviridae* (genre *Coltivirus* : virus de la fièvre à tique du Colorado...) et *Rhabdoviridae* (genre *Vesiculovirus* : le virus de la stomatite vésiculaire) (ICTV, 2020), mais tous les virus de ces familles ne sont pas des arbovirus (Aubry et Gaüzère, 2016). Une centaine de ces virus sont connus comme pathogènes pour l'homme et une quarantaine sont responsables de pathologies animales pouvant entraîner des conséquences économiques importantes. Beaucoup d'autres sont pour le moment considérés comme « orphelins » de maladie. Parmi les arboviroses d'importance médicale, certaines sont dites émergentes ou ré-émergentes, surtout en raison de l'extension de l'aire de répartition des vecteurs ou des virus. C'est le cas des infections dues aux DENV, ZIKV et CHIKV qui ont été responsables d'importantes épidémies dans des régions jusqu'alors indemnes.

I.2. Description des arboviroses

I.2.1. Cas de la dengue

Il s'agit de l'arbovirose la plus importante en termes de mortalité et de morbidité. Elle est présente dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier (Figure 1). Ces dernières années l'incidence mondiale de la dengue a fortement augmenté et l'extension géographique a progressé, particulièrement dans les zones urbaines et périurbaines de l'Amérique latine, de l'Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental, faisant de cette maladie un sujet majeur de préoccupation pour la santé publique. Selon l'OMS, en 2018, 3,9 milliards de personnes dans 138 pays ont été exposées au risque d'infection de dengue. Chaque année il y aurait environ 390 millions d'infections dans le monde, dont 96 millions de malades, un demi-million d'hospitalisés (dengue sévère), et 20 000 décès dont une très forte proportion d'enfants.

Le virus de la dengue est un virus à ARN monocaténaire d'environ 11kb et de polarité positive. Il appartient à la famille des *Flaviviridae* et compte quatre sérotypes qui circulent

entre les humains : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4 (Simmons *et al.*, 2012; Messina *et al.*, 2014) lesquels peuvent parfois co-circuler dans une même région géographique (Bhatt *et al.*, 2013). En dépit de leur forte proximité génétique et antigénique, les quatre sérotypes DENV constituent réellement des entités infectieuses indépendantes. L'immunité acquise par l'un des sérotypes ne protège pas contre l'infection par les autres. L'infection par un sérotype donné confère une immunité prolongée mais n'offre pas d'immunité croisée contre les autres sérotypes. Un individu vivant en zone endémo-épidémique peut donc en théorie contracter quatre fois la dengue.

Le virus de la dengue ne se transmet pas directement de personne à personne. Le virus est présent dans le sang d'une personne infectée 2 à 3 jours avant le début de la période fébrile et jusqu'à la fin de celle-ci (d'habitude 3-5 jours, maximum 7 jours). Lors d'une piqûre, le moustique s'infecte en prélevant le virus dans le sang d'une personne infectée. Le virus se multiplie ensuite dans le moustique. Celui-ci devient infectieux 8 à 12 jours (phase extrinsèque) après avoir piqué une personne contaminée et le demeure pour tout le reste de sa vie. A l'issue de la phase extrinsèque, ce moustique pourra, à l'occasion d'une autre piqûre, transmettre le virus à une nouvelle personne. Une personne infectée est « contaminante pour les moustiques » lors de la phase virémique de l'infection. Celle-ci commence environ 1 à 2 jours avant le début des signes cliniques et dure jusqu'à 7 jours après. Pendant cette période, il faut éviter qu'une personne malade ne se fasse piquer et qu'elle ne transmette ainsi le virus à d'autres moustiques, afin d'empêcher que le cycle de transmission virale ne soit entretenu dans l'entourage des malades.

Comme d'autres arbovirus, le virus de la dengue peut provoquer un large éventail de formes cliniques. Ces dernières allant de la forme totalement asymptomatique à la forme hémorragique, souvent mortelle, en passant par le syndrome fébrile aigu sans gravité, heureusement le plus fréquent, dit « dengue classique ».

La dengue classique touche préférentiellement les enfants âgés de plus de 15 ans et les adultes. Elle se manifeste brutalement après 2 à 7 jours d'incubation par l'apparition d'une forte fièvre souvent accompagnée de céphalées, des nausées, de vomissements, d'asthénie, de photophobie, d'une éruption cutanée ressemblant à celle de la rougeole, de douleurs articulaires et musculaires (Clark et Shamaan, 1984; Rigau-Pérez *et al.*, 1998). Une brève rémission est généralement observée au bout de trois jours, laissant alors place à une longue phase de convalescence (environ une quinzaine de jours) avec persistance d'une asthénie pendant plusieurs semaines (3 à 6 semaines).

La dengue hémorragique (DH) est plus fréquemment observée chez les enfants de moins de 15 ans, bien qu'elle puisse également concerner des adultes. Elle représente environ 1% des cas de dengue dans le monde, et est extrêmement sévère. Elle débute également par une fièvre qui peut durer de 5 à 7 jours pouvant parfois se compliquer par un syndrome de choc (DSC). Dans la phase aiguë de la maladie (4 premiers jours de fièvre), la DH et la DSC se distinguent peu de la dengue classique. Cependant, des manifestations hémorragiques plus sévères peuvent apparaître au moment de la défervescence de la fièvre. Il s'agit des pétéchies (petites taches rouges sur la peau ne s'effaçant pas sous la pression), ecchymoses (infiltration de sang sous la peau ou dans les tissus, à la suite d'un saignement localisé), purpuras (éruption cutanée) et des hémorragies multiples, notamment gastro-intestinales, cutanées et cérébrales. L'évolution de la maladie peut suivre deux orientations :

- dans les cas modérés, l'ensemble des signes va régresser en quelques jours et la guérison sera acquise en une dizaine de jours ;
- dans les cas sévères en revanche, l'état du patient se détériore rapidement après la phase fébrile non spécifique. En l'absence de prise en charge médicale adaptée, le patient peut décéder dans les 8 à 24 heures après l'entrée en état de choc.

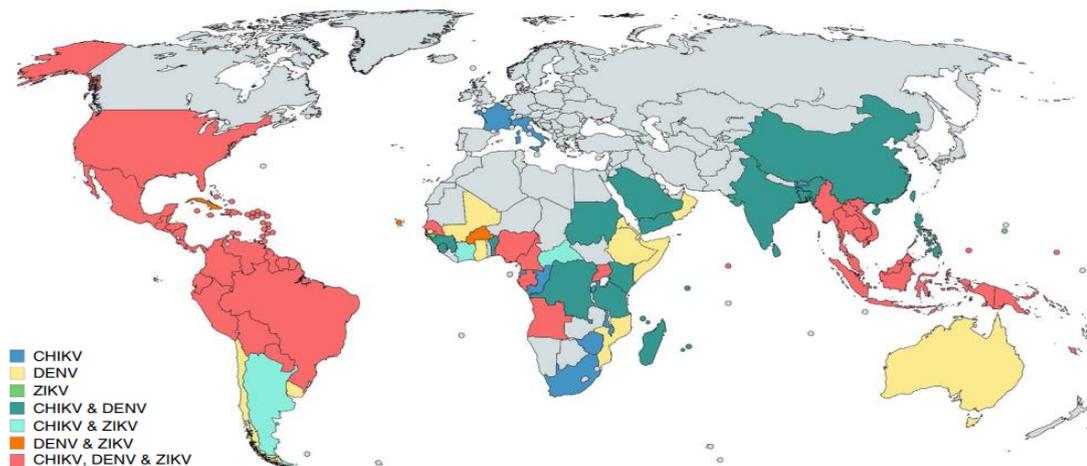


Figure 1 : Répartition mondiale des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika (Rückert *et al.*, 2017).

I.2.2. Cas du chikungunya

Le virus du chikungunya appartient à la famille des *Togaviridae*, du genre *Alphavirus*. Ce virus fait partie du complexe antigénique Semliki Forest (Powers *et al.*, 2000). Il a été isolé pour la première fois en Ouganda en 1953, lors d'une épidémie survenue en Afrique de l'Est. L'appellation « chikungunya » vient du makondé et signifie « l'homme qui marche courbé »

ou « qui se recroqueville », faisant référence à l'arthralgie invalidante dont sont atteints les patients qui ont contracté le virus du chikungunya. C'est un virus à ARN⁺ sphérique d'un diamètre de 60-70 nm recouvert d'une enveloppe lipoprotéique. Le chikungunya sévit en Amérique centrale, Amérique du Sud, Inde, dans les îles de l'océan Indien, dans les îles du pacifique, dans les caraïbes et en Afrique (Figure 1). Plus récemment, les responsables de la santé de l'ONU ont signalé une épidémie d'infections à virus chikungunya au Tchad. Entre le 14 août et le 16 septembre 2020, 24858 cas ont été enregistrés au niveau des formations sanitaires des districts d'Abéché, de Biltine et d'Abdi (WHO, 2020).

Les signes cliniques du chikungunya apparaissent généralement dans les 2 à 7 jours qui suivent la piqûre du moustique vecteur. La phase virémique de l'infection par le chikungunya dure en moyenne de 3 à 10 jours. Les signes cliniques majeurs sont : l'apparition brutale d'une forte fièvre (> 40 °C), qui dure de 24 à 48 heures, accompagnée des manifestations cutanées à type de rash maculo-papuleux, érythémateux ou d'œdèmes, des polyarthralgies, de myalgie et d'arthralgies touchant principalement les extrémités des membres (poignets, chevilles et phalanges) et pouvant atteindre toutes les articulations (Borgherini *et al.*, 2008; Sissoko *et al.*, 2009). Ces douleurs articulaires persistantes caractérisent l'infection par le CHIKV et la distinguent notamment, de la dengue, avec laquelle elle est souvent confondue (Pialoux *et al.*, 2007; Chen et Wilson, 2010) principalement dans les régions où les deux virus co-circulent.

I.2.3. Cas du Zika

Le virus du Zika est un arbovirus membre de la famille des Flaviviridae du genre *Flavivirus* comme ceux de la dengue et de la fièvre jaune. Il s'agit d'un virus à ARN⁺ d'un diamètre de 40 nm, enveloppé d'une bicouche lipidique. Les analyses phylogénétiques montrent qu'il existe deux lignages : un lignage Afrique qui se subdivise en deux sous-lignages et un lignage Asie (Faye *et al.*, 2014; Haddow *et al.*, 2016). Ce virus a été isolé pour la première fois d'un singe Rhésus en 1947 en Ouganda dans la forêt Zika. Quelques années après, il a été également isolé chez l'homme en Ouganda et en Tanzanie. Le virus Zika, bien que découvert depuis longtemps et circulant en Asie et en Afrique a émergé récemment provoquant quatre grandes épidémies : en Micronésie sur l'île de Yap en 2007, en Polynésie française en octobre 2013, en Nouvelle Calédonie en janvier 2014 et au Brésil en mai 2015. Ces quatre épidémies ont été dues à des souches du lignage Asie et ont eu lieu dans des zones géographiques où le virus n'avait jamais circulé, donc au sein de populations immunologiquement naïves. Depuis, de nombreuses épidémies ont été rapportées dans les Amériques, le Pacifique et en Afrique (WHO, 2016a).

La maladie apparaît être asymptomatique dans 74 à 81 % des cas (Duffy *et al.*, 2009; Musso *et al.*, 2014). La durée d'incubation varie de 3 à 12 jours (Ioos *et al.*, 2014). Les symptômes ressemblent à ceux d'autres arboviroses et se manifestent par la fièvre, les éruptions cutanées, la conjonctivite, les douleurs musculaires et articulaires, un état de malaise et des céphalées. Ils restent en général bénins et disparaissent en 2 à 7 jours. Bien que les cas de décès soient très rares, des complications sérieuses ont été constatées. Il s'agit de complications neurologiques et de malformations chez les fœtus de femmes enceintes malades. Après un examen complet des données disponibles, un consensus scientifique s'est établi pour dire que le virus Zika est à l'origine de cas de microcéphalie et du syndrome de Guillain-Barré (Cauchemez *et al.*, 2016).

I.2.4. Cycle de transmission des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika

La transmission de ces virus est assurée essentiellement par la piqûre des femelles des moustiques du genre *Aedes*. La transmission transovarienne chez les moustiques (œuf-larve-adulte) a été souvent évoquée dans plusieurs régions du monde. Cependant, hormis la transmission vectorielle, il existe d'autres voies possibles qui restent des événements très rares. Pour les virus de la dengue et du Zika des cas de transmission par voies sexuelle et sanguine ont été reportées (Foy *et al.*, 2011; Musso *et al.*, 2015; Musso *et al.*, 2016; Brooks, 2016; Wilder-Smith, 2019).

Les espèces impliquées dans la transmission varient en fonction des continents, des pays et des environnements concernés. Ainsi, en fonction des environnements, trois types de cycle peuvent être définis : le cycle sauvage, le cycle rural et le cycle urbain.

- Les cycles sauvages ou selvatiques sont observés en Afrique et en Asie. Ils se déroulent en milieux sauvages non anthropisés (souvent forestiers) impliquant la faune sauvage particulièrement les primates (l'homme peut intervenir de manière accidentelle) et des espèces d'*Aedes* vivant dans la canopée des forêts humides ou des savanes humides. En Afrique les espèces du sous-genre *Stegomyia* notamment *Aedes luteocephalus* Newstead, 1907, *Aedes africanus* Theobald, 1901 et du sous-genre *Diceromyia* essentiellement *Aedes furcifer* Edwards, 1913 et *Aedes taylori* Edwards, 1936 ont été décrites comme étant des vecteurs selvatiques des virus DENV et du CHIKV (Diallo *et al.*, 1999; Diallo *et al.*, 2003).

- Les cycles ruraux sont ceux qui se déroulent en zone rurale dans des villages ou des îles peu peuplées. La proximité de certains villages avec les lisières de forêts humides rend possible le transfert de virus à l'homme par les vecteurs selvatiques (Figure 2). Les virus peuvent

également être transférés dans la sphère anthropique par des singes virémiques ou des hommes qui se seraient infectés en forêt (cas de « brousse »). Selon la région, plusieurs moustiques du sous-genre *Stegomyia* pourraient intervenir comme vecteurs notamment *A. aegypti* et *A. albopictus* (pour les DENV, ZIKV et CHIKV), et *Aedes polynesiensis* Marks, 1951 (DENV) (Smith, 1956; Gubler, 1998).

- Les cycles urbains endémiques/épidémiques sont les plus importants en termes d'impact sur la santé publique. Ici, l'homme constitue l'unique hôte vertébré (réservoir et amplificateur) intervenant dans les cycles de transmission des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika. Jusqu'à un passé récent, il était admis que la transmission en milieu urbain était majoritairement assurée par *A. aegypti* mais depuis quelques années on note une recrudescence d'épisodes épidémiques impliquant *A. albopictus*, parfois seule. De nos jours ces deux espèces de moustiques sont reconnues comme les vecteurs majeurs des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika (Kow *et al.*, 2001; Gubler, 2002b; Paupy *et al.*, 2010).

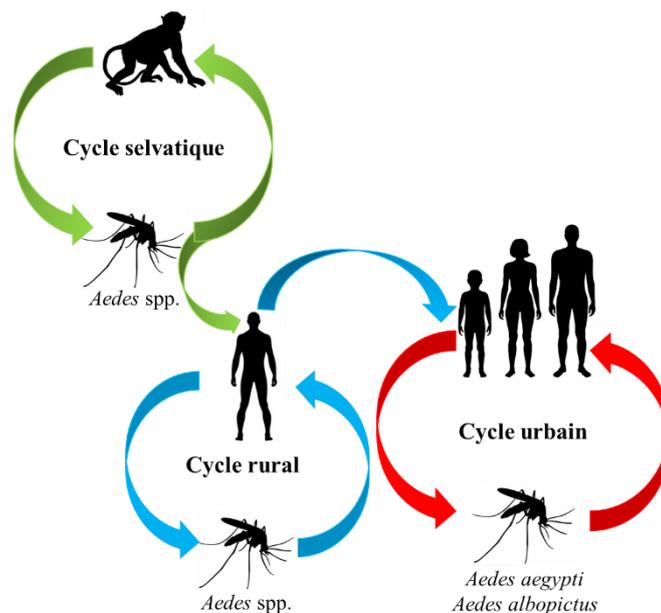


Figure 2 : Cycles de transmission des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika, adapté de Whitehead (2007) et Tsetsarkin (2011).

I.2.5. Facteurs responsables de l'émergence de la dengue, du chikungunya, et du Zika

La cause de l'émergence de ces virus est multifactorielle et combine des facteurs propres aux vecteurs, aux hôtes, aux virus, mais aussi propres aux composantes environnementales, économiques, démographiques et socioculturelles. Une combinaison de changements de ces facteurs a permis de rompre les équilibres multi-dynamiques des cycles originels selvatiques et a permis la diffusion et l'épidémisation à une échelle globale.

L'explosion démographique rencontrée dans la majorité des pays tropicaux, associée à un développement anarchique de l'habitat urbain et aux défaillances des systèmes d'adduction d'eau et de voiries favorisent l'accumulation volontaire ou involontaire d'eau qui créent des gîtes larvaires propices au développement des principaux vecteurs de la dengue, *A. aegypti* et *A. albopictus*. Les vecteurs se trouvent ainsi concentrés à proximité d'une population humaine à forte densité souvent composée de sujets jeunes et réceptifs. Par ailleurs, du fait du développement des moyens de transport modernes, notamment aériens, les vecteurs et le virus peuvent circuler d'un point à l'autre du globe en moins de 24 heures. La commercialisation des pneus usagés a également favorisé l'extension de l'aire de répartition des vecteurs (Gubler, 2002b) notamment celle d'*A. albopictus*. Son introduction en Afrique Centrale coïncide avec l'émergence de la dengue, du chikungunya et du Zika en milieu urbain dans cette partie du monde (Ngoagouni *et al.*, 2015). Bien que la liste des facteurs responsables soit longue, complexe et parfois mal connue, il est important de souligner d'autres aspects comme l'inefficacité de la lutte anti-vectorielle ou encore l'évolution des virus qui constituent également des sujets de recherche fréquemment débattus au cours de ces dernières années.

I.2.6. Situation de la dengue, du chikungunya, et du Zika au Cameroun

Les virus de la dengue, du chikungunya et du Zika circuleraient au Cameroun et pourraient être largement sous diagnostiqués en raison de l'absence de symptômes spécifiques. Par ailleurs, leurs signes cliniques sont similaires à ceux d'autres maladies telles que le paludisme et la typhoïde. Elles sont caractérisées par la présence de fièvre. L'hypothèse de la circulation de ces virus au Cameroun, est soutenue par plusieurs études menées sur les arbovirus au cours de ces deux dernières décennies. (1) le DENV et CHIKV ont été détectés chez les soldats français résidents à Douala et à Yaoundé (Peyrefitte *et al.*, 2007), (2) en 2002, des immunoglobulines M (IgM) dirigées contre le DENV (DEN-1) ont été retrouvées chez deux expatriés allemands de retour du Cameroun (Krippner et Laer, 2002). Plusieurs autres études ont été réalisées et ont montré des proportions variables d'arbovirus entre 5 % et 34,2 % avec des tests sérologiques (Gake *et al.*, 2017). Plus récemment, les analyses chez les patients fébriles consultant les formations sanitaires dans la ville de Douala ont reporté une co-infection dengue/paludisme (Yousseu *et al.*, 2018). Une épidémie dengue a été également signalée dans le village Londji, aux environs de Kribi avec détection du DENV-1 chez l'homme (Simo *et al.*, 2018).

I.3. Vecteurs des virus de la dengue, du chikungunya, et du Zika

I.3.1. Position systématique des *Aedes*

D'après Fontenille (2010), la place des *Aedes* dans le règne animal est la suivante :

- Embranchement des Arthropodes : corps à symétrie bilatérale, métamérisé et recouvert d'une cuticule ;
- Sous-embranchement des Mandibulates ou Antennates : antennes +paire de mandibules;
- Classe des Insectes : tête + thorax +abdomen ;
- Sous-classe des Ptérygotes : présence de deux paires d'ailes ;
- Section des Oligonéoptères : champ jugal évolué, ailes repliées en arrière au repos ;
- Super-ordre des Mécoptéroïdes : pièces buccales de type suceur ou piqueur ;
- Ordre des Diptères : une seule paire d'ailes et une paire d'haltères, tarsi pentamères ;
- Sous-ordre des Nématocères : antennes longues, filiformes et à nombreux articles ;
- Superfamille des Culicoidea : spiracle ouvert ;
- Famille des Culicidae : appareil buccal constitué d'une trompe allongée, présence d'écailles sur les nervures alaires, corps fusiforme ;
- Sous-famille des Culicinae : palpes plus courts chez les femelles que chez les mâles, siphon respiratoire chez les larves ;
- Genre *Aedes* Meigen 1818 : surface des ailes avec des écailles larges plutôt symétriques, Larve à siphon court.

I.3.2. Biologie et cycle de vie des *Aedes*

Le cycle de développement est fondamentalement similaire pour tous les moustiques, mais avec des variations éthologiques selon les espèces et les conditions écologiques. Comme tous les diptères, il s'agit d'insectes holométaboles chez lesquels le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal. Les larves et les adultes ont une morphologie et un mode de vie très différents. Chez les moustiques, les stades immatures (œuf, larve, nymphe) sont aquatiques et le stade imaginal aérien (adulte) (Goma, 1966). Ce cycle dure habituellement 8-12 jours pour passer de l'œuf à l'adulte (Figure 3). La phase aquatique est caractérisée par une période de croissance avec une augmentation notable de taille qui peut être de l'ordre de 10 fois (du stade I au stade IV). Ce phénomène d'accroissement ne se retrouvera plus dans la phase ultérieure tandis que la phase aérienne correspond à la période de reproduction et de dispersion.

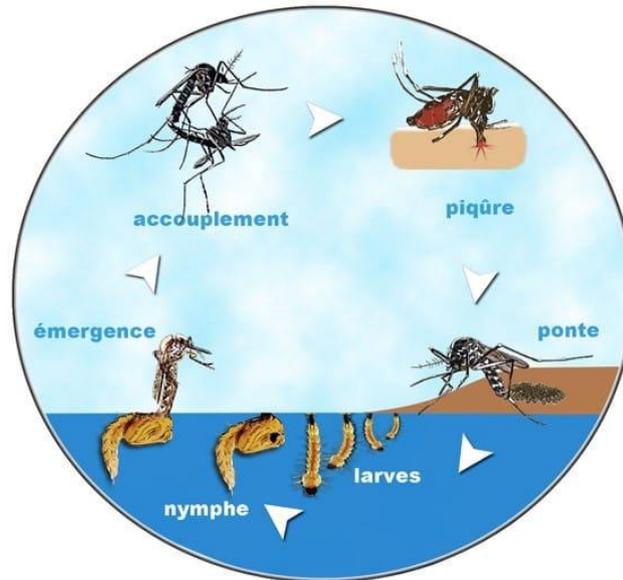


Figure 3 : Cycle de développement des *Aedes*. (Source : <https://www.eid-med.org/les-moustiques/cycle-de-vie-biologie/>)

➤ **Stade œuf**

La femelle d'*Aedes* adulte s'accouple une fois et continue à pondre des œufs durant toute sa vie. Pour permettre la maturation de ses œufs, la femelle se nourrit de sang tous les deux à trois jours. Les œufs de couleur noire, ovales sont pondus individuellement sur des substrats humides à l'interface air/eau (entre 100 et 200 par femelle) tels que sur le bord des boîtes contenant de l'eau, des pots de fleurs et des trous d'arbres (Service, 2012). Ces œufs ont une paroi constituée de protéine élastique qui réduit les pertes d'eau et permet les échanges de gaz (Nasci et Miller, 1996). Les œufs d'*Aedes* peuvent résister à la sécheresse pendant plusieurs mois et vont éclore une fois exposés à l'eau, en présence des stimuli tels que le manque d'oxygène dans l'eau, et une température moyenne.

➤ **Stade larvaire**

Les larves d'*Aedes* peuvent être trouvées dans des gîtes naturels (creux d'arbres, creux des rochers, coquille d'escargot, aisselle de plantes...), des gîtes péri-domestiques (pneus usagés, récipients abandonnés, boîtes de conserve...) et des gîtes domestiques (récipients de stockage d'eau, pot de fleurs naturelles...) (Abu Hassan et Yap, 2003). Les larves sont apodes et se nourrissent habituellement de particules en suspension dans l'eau telle que des microorganismes (bactéries, diatomées, algues) mais également de particules provenant de tissus de plantes ou

d'animaux en décomposition (Nasci et Miller, 1996; Clements, 2000; Service, 2012). Elles ont des siphons respiratoires qui leur permettent de se suspendre à la surface de l'eau (Figure 4).



Figure 4: Photo des larves *Aedes* (source :

https://lh3.googleusercontent.com/proxy/JcUuk6dFTiTVu5WLR4wP6JzHIClylNwAj9jn-P-UmEcVvITrN79arXFTweegcmifsPP8ngs376qLvgKquoSCR5AI_K5Lu8C6YXEuDOrn-0U)

➤ **Stade nymphal**

Les nymphes ou pupes sont également des organismes aquatiques. Contrairement aux autres pupes d'insectes, les pupes des moustiques sont actives et mobiles. Elles ont une forme de point-virgule et possèdent deux trompettes utilisées pour aspirer l'air lorsqu'elles sont dans l'eau. Elles ne s'alimentent pas (Nasci et Miller, 1996) mais sont mobiles et réagissent aux stimuli. Les pupes ont tous les organes des adultes mais qui ne sont pas complètement développés (Goma, 1966). Quand la métamorphose est complète et que les moustiques adultes sont complètement développés dans la cuticule des pupes, les chrysalides aspirent l'air de l'atmosphère pour augmenter la pression interne et la cuticule se rompt permettant aux moustiques adultes de s'extraire de l'exuvie (Nasci et Miller, 1996). Le stade nymphal dure environ 2 à 3 jours en fonction des conditions abiotiques.

➤ **Stade adulte**

Sorti de la nymphe, le moustique adulte marque un léger temps de repos (environ 10-15 minutes) pour laisser durcir sa cuticule. Les mâles et les femelles se nourrissent de nectar qui constitue une source d'énergie. Toutefois, les femelles ont en outre besoin pour la maturation de leurs œufs d'un apport protéique qui est fourni par le sang des vertébrés. Un seul

repas sanguin peut suffire à produire une ponte. Une femelle est capable de pondre une quantité variable d'œufs, en fonction de la quantité et de la qualité du repas. Les femelles piquent préférentiellement à certaines heures de la journée avec en général un pic d'activité entre 15h et 19 h (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2012). Le moustique adulte possède trois parties : la tête (une paire d'yeux composés, une paire d'antennes, une paire de palpes longs et un proboscis) (Nasci et Miller, 1996; Service, 2012) ; le thorax qui possède trois paires de pattes, une paire d'ailes et une paire d'haltères et l'abdomen qui comporte 10 segments, les deux derniers étant modifiés pour former les organes génitaux. Les deux espèces sur lesquelles notre attention sera focalisée se distinguent par la présence d'écailles blanches en forme de lyre sur le thorax pour *A. aegypti* (Figure 5A) et par la présence d'une ligne longitudinale blanche en position centrale sur le thorax d'*A. albopictus* (Figure 5B).

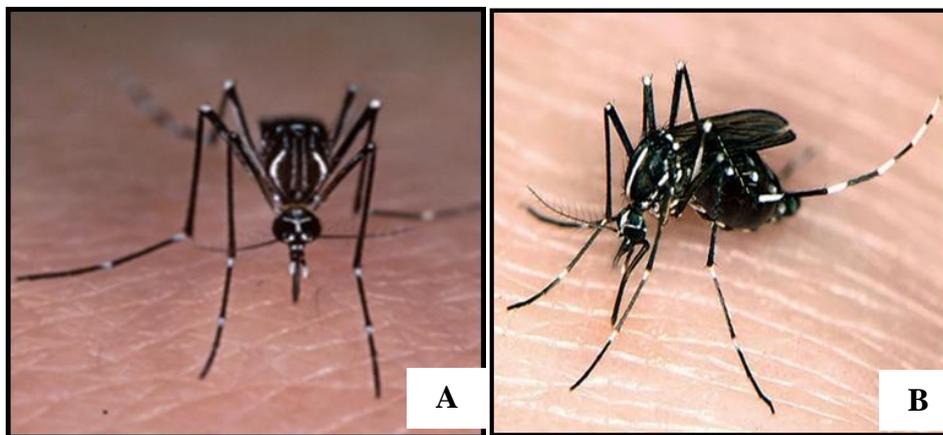


Figure 5 : Photographie des moustiques *Aedes aegypti* (A) et *Aedes albopictus* (B) (Source : <http://moustique-tigre.info/wp-content/uploads/2013/12/aedes-aegypti-vs-aedes-albopictus.jpg>)

I.3.3. Interaction entre *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*

La coexistence écologique des moustiques *A. aegypti* et *A. albopictus* a été rapportée dans plusieurs régions du monde, avec parfois des larves partageant les mêmes gîtes de développement (Braks *et al.*, 2003; Simard *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2010; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2013). Du fait que ces deux espèces ont des niches écologiques similaires et partagent souvent les mêmes ressources (hôte nourricier, habitat larvaire), ces deux moustiques peuvent entretenir des interactions compétitives. Ces interactions sont toujours en faveur de l'espèce qui envahit. Ainsi, *A. aegypti* a été remplacé aux USA et au Brésil par *A. albopictus* (Lounibos, 2002; Juliano et Lounibos, 2005). En Afrique centrale, on note également qu'*A. albopictus* tend à supplanter *A. aegypti* dans les

viles où les deux espèces sont sympatriques (Simard *et al.*, 2005; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2010; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2013; Tedjou *et al.*, 2019). Inversement, en Asie, *A. aegypti* a eu l'avantage compétitif sur *A. albopictus*, particulièrement en milieu urbain (Rudnick, 1965; Gilotra *et al.*, 1967). Il faut noter qu'en dehors de la compétition pour l'espace et les ressources, on parle maintenant de plus en plus de la " satyrization " ou interférence dans la reproduction (Bargielowski *et al.*, 2013; Bargielowski et Lounibos, 2016). Dans cette forme de compétition, les mâles d'*A. albopictus* s'accouplent avec les femelles d'*A. aegypti*, ce qui les rend stériles.

I.3.4. Distribution d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* au Cameroun

I.3.4.1. *Aedes aegypti*

Aedes aegypti est d'origine africaine (Christophers, 1960), connue comme le vecteur majeur des virus de la dengue, du Zika et de la fièvre jaune. C'est l'une des espèces d'insectes qui présente la plus large distribution mondiale, et elle est, à quelques exceptions près, présente partout où sévit la dengue. La large distribution de cette espèce est due à l'augmentation des échanges inter humains. On distingue deux morphotypes d'*A. aegypti* qui se différencient également sur les plans : biologique et comportementale. La forme sombre selvatique, *A. aegypti formosus*, dépourvue d'écailles blanches sur le premier tergite abdominal. Elle se développe préférentiellement dans des gîtes naturels tels que les creux d'arbres, creux de rochers et axiles de plantes (Mattingly, 1957; Paupy *et al.*, 2008). Elle est plus zoophile qu'anthropophile se nourrissant sur les hôtes rencontrés dans les forêts. La forme claire, *A. aegypti aegypti*, dispose d'écailles blanches sur le premier tergite abdominal. Cette forme est caractérisée par son adaptation sans faille à l'environnement humain qui lui fournit « le gîte et le couvert »: i) des conditions favorables à la réalisation de son développement pré-imaginal (stades larvaires et nymphal), dans des collections d'eau multiples telles que les récipients de stockage d'eau, d'autres récipients à usage domestique (abreuvoirs pour animaux, vases...) et des récipients abandonnés (boîtes de conserves, vieux pneus, épaves de véhicules) pour recevoir ses pontes (Christophers, 1960), et ii) une source de sang indispensable à la production de ses œufs (cycle gonotrophique). Une autre différence entre les deux formes est leur capacité à transmettre la dengue, les femelles de la forme claire étant meilleures vectrices que celles de la forme sombre (Failloux *et al.*, 2002).

Aedes aegypti est connue au Cameroun depuis les années 1950 (Rageau et Adam, 1952), elle est largement distribuée et rencontrée dans tous les faciès bioclimatiques (Simard *et al.*, 2005; Tedjou *et al.*, 2019). Les travaux récents menés au Cameroun ont montré qu'*A. aegypti* se développe dans les environnements selvatiques, ruraux et urbains (Fontenille et

Toto, 2001; Simard *et al.*, 2005; Paupy *et al.*, 2008; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2010; Paupy *et al.*, 2010; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017; Tedjou *et al.*, 2019).

I.3.4.2. *Aedes albopictus*

Aedes albopictus, encore appelé moustique tigre d'Asie, a été décrit pour la première fois par Skuse à Calcutta en Inde en 1894. Il est originaire des forêts d'Asie du Sud Est (Smith, 1956). Il avait jusqu'à récemment (environs quatre décennies), une aire de répartition limitée qui s'étendait depuis le nord de la Chine et du Japon jusqu'à l'Asie Tropicale. Puis, il s'est étendu aux îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien et de l'Ouest du Pacifique. Sa biologie particulière et sa très forte plasticité écologique lui permettent de conquérir de nouvelles aires géographiques et à s'y installer durablement (Paupy *et al.*, 2009). Aujourd'hui l'espèce est présente sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (Bonizzoni *et al.*, 2013), son expansion dans le monde étant largement due à l'intensification des échanges internationaux. Dans les années 80, le commerce des pneus usagés entre le nord de l'Asie (notamment le Japon) et le reste du monde a favorisé le transport de cette espèce au stade œuf et ainsi son introduction dans des régions jusqu'alors exemptes (Reiter et Sprenger, 1987; Reiter, 1998). On sait que les pneus constituent un site d'oviposition attractif pour les femelles de cette espèce (Hawley, 1988) car leur couleur sombre simule bien les creux d'arbres rencontrés dans les forêts (habitats primitifs des *Aedes*). Les œufs pondus sur les parois des pneus peuvent rester à l'état quiescent pendant des périodes de sécheresse plus ou moins longues et supportent ainsi sans problème le voyage d'un pays à un autre. Lors de la remise en eau notamment après un épisode pluvieux, les larves se développent et l'espèce peut ainsi coloniser une nouvelle région. Dans les années 2000, un autre mode d'introduction a été décrit pour cette espèce via l'importation de plantes ornementales comme *Dracaena sanderiana* (Liliales : Dracaenaceae) (Linthicum *et al.*, 2003; Scholte et Schaffner, 2007; Scholte *et al.*, 2008). *Aedes albopictus* est capable de coloniser une large gamme de types de gîtes, qui va des gîtes naturels (creux de bambous, creux d'arbre, creux de rocher...) à des gîtes artificiels tels que des pneus, des petits récipients (soucoupes...) autant dans sa zone d'origine que dans des régions envahies (Paupy *et al.*, 2009). Cette capacité invasive particulièrement marquée lui vaut d'être classée parmi les cent espèces les plus invasives au monde (Lowe *et al.*, 2000).

D'origine forestière, *A. albopictus* se trouve de plus en plus dans les zones rurales et péri-urbaines dans plusieurs régions du monde. Dans toutes ces régions, sa présence est surtout liée à la présence de végétation (Rudnick et Hammon, 1960; Chan *et al.*, 1971) ce qui expliquerait que l'espèce soit moins fréquente en zone fortement urbanisée (Tewari *et al.*, 2004).

Cependant, au cours de ces dernières années on a noté qu'*A. albopictus* pouvait coloniser les environnements urbains exceptionnellement quand *A. aegypti* est absent (Delatte *et al.*, 2008). Les habitats plus ruraux sont privilégiés par *A. albopictus* du fait de son comportement exophile; la ponte a lieu préférentiellement dans des gîtes situés à l'extérieur, et le repos comme les repas sanguin se font eux aussi principalement à l'extérieur des habitations (Hawley, 1988; Thavara *et al.*, 2001; Delatte *et al.*, 2010).

Aedes albopictus est détecté pour la première fois en Afrique en 1989. Il s'agissait de larves qui furent transportées du Japon vers l'Afrique du Sud dans des pneus usagés (Sprenger, 1987; Reiter, 1998). En 1991, *Aedes albopictus* est détecté au Nigeria, où il s'est rapidement installé (Savage *et al.*, 1992) puis il va s'étendre en Afrique Centrale. Cette espèce a été décrite en Afrique Centrale pour la première fois au Cameroun en 2000 (Fontenille et Toto, 2001), et quelques années plus tard dans la plupart des pays de la sous-région (Ngoagouni *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2017; Bobanga *et al.*, 2018). Après son introduction au Cameroun, elle a rapidement envahi la plupart des localités du sud Cameroun jusqu'à une limite située aux alentours de 6° de latitude Nord (Simard *et al.*, 2005; Bagny *et al.*, 2009; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2010) où elle tend à supplanter l'espèce indigène *A. aegypti*. Une étude plus récente menée dans diverses localités du Cameroun a montré que *A. albopictus* est l'espèce d'*Aedes* majoritaire dans la partie sud du pays (Tedjou *et al.*, 2019).

I.4. Lutte contre la dengue, le chikungunya, et le Zika

I.4.1. Traitement médicamenteux et prise en charge

Comme pour toutes les arboviroses, il n'existe pas jusqu'à présent de traitement spécifique contre la dengue, le chikungunya et le Zika. Les traitements sont uniquement symptomatiques et basés sur l'emploi d'antipyrétiques, d'antalgiques. Cependant les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont formellement déconseillés en première intention pour les trois pathologies. De même l'aspirine est contre indiquée dans les traitements symptomatiques en raison du risque hémorragique. Parmi les traitements symptomatiques, l'usage des corticoïdes peut être conseillé dans le cas des formes chroniques ou sévères. Pour les cas les plus sévères de dengue, notamment la dengue hémorragique et la dengue avec syndromes de choc, leur traitement symptomatique nécessite l'hospitalisation en urgence en unité de soins intensifs pour la prise en charge des signes de gravité (réhydratation intraveineuse, correction du choc hémodynamique, transfusion de plaquettes, etc.) (Cabié et Strobel, 2003).

I.4.2. Vaccins

Aucun vaccin efficace n'a déjà été trouvé contre la dengue, le chikungunya ou encore le Zika. Cependant la propagation de ces arboviroses dans plusieurs régions du globe, la morbidité et la mortalité qu'elles peuvent induire, couplées à l'absence de médicaments antiviraux performants ont motivé la mise en place de programmes de recherche pour le développement de vaccins contre ces maladies. C'est ainsi qu'entre 2015 et 2016, les chercheurs de Sanofi-Pasteur ont réussi à mettre au point, le premier vaccin contre la dengue, Dengvaxia® (Pasteur, 2016). Ce vaccin est utilisable uniquement chez des personnes âgées de 9 à 45 ans vivant dans des zones d'endémies notamment en Amérique Latine et en Asie du Sud Est. Dengvaxia® est un vaccin constitué de quatre chimères construites à partir de la souche 17D du vaccin contre la fièvre jaune, dans laquelle ont été insérés les gènes codant l'enveloppe des 4 sérotypes du virus de la dengue (Thomas et Yoon, 2019). Il montre une efficacité modérée contre la maladie et présente un risque de survenue de formes graves de dengue chez les personnes vaccinées n'ayant jamais été en contact avec l'un des 4 sérotypes (personnes séronégatives). En 2019 une autre étude a mis en évidence l'efficacité d'un autre vaccin développé par la société japonaise Takeda nommé TAK-003 (Biswal *et al.*, 2019). Ce nouveau vaccin est constitué d'une souche atténuée du virus de la dengue de sérotype 2 (DENV-2) et de trois chimères construites à partir de cette souche DENV-2, dans laquelle ont été insérés les gènes codant l'enveloppe des trois autres sérotypes (DENV-1, DENV-3 et DENV-4). Contrairement au Dengvaxia® de Sanofi, ce nouveau vaccin apparaît indépendant du statut sérologique au moment de la vaccination et de l'âge et il a une efficacité élevée pour prévenir les hospitalisations (80,2%). Cependant, la protection contre la maladie n'est pas équivalente entre les sérotypes, et pose un problème pour le sérotype 3 chez les personnes séronégatives. Malgré les progrès observés, une protection équilibrée contre les 4 sérotypes du virus reste difficile (Biswal *et al.*, 2019).

I.4.3. Lutte anti-vectorielle

La seule façon de prévenir ou de réduire la transmission des virus consiste à lutter contre les moustiques vecteurs ou à empêcher le contact entre l'homme et le vecteur. L'OMS préconise l'approche stratégique appelée gestion vectorielle intégrée pour lutter contre les moustiques vecteurs, y compris ceux de la dengue, du chikungunya et du Zika. La gestion vectorielle intégrée est définie comme un processus rationnel de prise de décisions pour l'utilisation optimale des moyens de lutte anti-vectorielle. Elle a pour but d'améliorer l'efficacité, la rentabilité, la pertinence écologique et la durabilité de la lutte.

Les activités de lutte contre *A. aegypti* ou *A. albopictus* devraient cibler leurs stades immatures (œufs, larves et nymphes) et leur forme adulte, dans les habitations ou à proximité immédiate de celles-ci. Cela inclut d'autres environnements propices au contact de l'homme avec le vecteur, comme les écoles, les hôpitaux ou les lieux de travail.

Aedes aegypti et *A. albopictus* utilisent une grande variété de gîtes larvaires de taille réduite, aussi bien naturels que fabriqués par l'homme. Certains habitats constitués par des récipients ou des réservoirs artificiels produisent un grand nombre de moustiques adultes, tandis que d'autres sont moins productifs. Il s'ensuit que les efforts de lutte devraient porter en priorité sur ces habitats les plus productifs et donc les plus importants sur le plan épidémiologique, plutôt que de viser tous les types de récipients, en particulier lorsque les ressources sont très limitées.

L'OMS préconise l'utilisation de l'une ou d'une combinaison de ces trois méthodes pour réduire la transmission vectorielle : gestion de l'environnement, lutte chimique, lutte biologique.

I.4.3.1. Gestion de l'environnement

La gestion environnementale vise à modifier l'environnement afin de prévenir ou de limiter la propagation des vecteurs et les contacts entre l'homme et les vecteurs. Elle consiste à détruire, modifier, ou recycler les récipients non indispensables qui constituent un habitat pour les œufs, les larves et les nymphes. Ces mesures devraient être la pierre angulaire de la lutte anti vectorielle. À tous ces bonnes pratiques d'hygiène et d'assainissement s'ajoute le volet d'information et de sensibilisation de la population par des personnes compétentes sur la connaissance des moustiques, leur mode de vie et leur rôle dans la transmission des agents pathogènes. Il s'avère alors nécessaire de mettre en place, des structures dédiées, chargées du contrôle vectoriel tout en (i) tenant compte des pratiques culturelles spécifiques et (ii) relevant les obstacles possibles.

I.4.3.2. Lutte biologique

La lutte biologique est définie comme l'utilisation d'ennemis naturels pour réduire les dommages causés par l'organisme nuisible au niveau tolérable (Debach, 1974). La lutte biologique contre les vecteurs de maladies est basée sur l'utilisation d'agents pathogènes antagonistes tels que : prédateurs (arthropodes, nématodes, vertébrés, mollusques), parasitoïdes (arthropodes), et pathogènes (virus, bactéries, champignons). Ainsi l'utilisation des copépodes *Mesocyclops* qui est un prédateur de larves de premier stade est devenue une

méthode efficace d'éradication d'*A. Aegypti* au Vietnam, (Vu *et al.*, 1998; Kay et Nam, 2005). De même l'utilisation de *Macrocylops* a permis d'éradiquer *A. albopictus* à la Nouvelle-Orléans (Marten, 1990).

Une forme particulière de lutte biologique est dite « autocide ». Elle se base sur l'élevage et la dispersion de mâles stériles (éventuellement génétiquement modifiés) ou porteur d'une bactérie pathogène pour le moustique. Une fois lâchés en grand nombre, ces derniers concurrencent les mâles sauvages en limitant très fortement la descendance des femelles.

I.4.3.3. Lutte chimique

La lutte chimique consiste en l'utilisation d'insecticides. C'est la méthode la plus utilisée pour lutter contre les parasites des ménages et en santé publique (Yap *et al.*, 1984; Hemingway et Ranson, 2000). L'utilisation de matériaux traités à l'insecticide tels que des rideaux, des filets et des couvercles de récipients de stockage d'eau a été démontrée pour contrôler efficacement *A. aegypti* (Kroeger *et al.*, 2006). L'application d'insecticides en ULV "Ultra Low Volume" est efficace contre les moustiques adultes et le degré d'efficacité dépend de la dose de l'ingrédient actif dans l'insecticide utilisé (Mount, 1998). Lors des épisodes épidémiques, les adulticides sont diffusés sous forme de nuages thermiques ou plus généralement en ULV. Ces traitements spatiaux peuvent être effectués à l'intérieur des habitations à l'aide de pulvérisateurs portatifs ou, à l'extérieur, par voie terrestre ou aérienne. Les insecticides les plus couramment utilisés sont des organophosphorés (malathion, fénitrothion) (WHO 1997) ou des pyréthrinoïdes (deltaméthrine) (Chuaycharoensuk *et al.*, 2011; Nkya *et al.*, 2013). L'efficacité de ces pulvérisations est sujette à controverse, en particulier quand elles sont pratiquées à l'extérieur des maisons. Leur impact direct sur les moustiques ou indirect sur la transmission de la maladie n'est pas bien défini (Reiter et Gubler, 1997). Aujourd'hui l'OMS préconise, dans le but de préserver l'efficacité des insecticides, de réserver les traitements spatiaux aux seules périodes épidémiques.

I.5. Classification des insecticides

De nos jours, l'utilisation des insecticides pour réduire les populations de vecteurs, demeure le principal outil de lutte anti-vectorielle. Développés à l'origine, à des fins agricoles, la plupart des insecticides notamment les pyréthrinoïdes ont été testés avec succès puis introduits en santé publique (Dong, 1997). Ces insecticides sont principalement regroupés en quatre grandes familles chimiques que sont : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes.

I.5.1. Organochlorés

Les organochlorés sont des toxiques neurotropes qui altèrent le fonctionnement des canaux sodium indispensables à la transmission de l'influx nerveux. Leur spectre d'action est large. Ces insecticides comptent parmi les plus anciens qui ont été largement utilisés en santé publique mais leur toxicité pour la faune non-cible, leur rémanence dans l'environnement et l'apparition des résistances ont conduit à leur abandon. Les organochlorés comprennent le Dichloro-Diphényl-Trichloroétane (DDT) et ses analogues, le lindane (hexachloro-cyclohexane ou HCH) et les cyclodiènes (dieldrine, endosulfan).

Le DDT, découvert en 1939 par Paul Hermann Müller a été le premier insecticide largement utilisé pour la lutte contre les parasites agricoles (Smith, 1999; Lee et Yap, 2003). Il agit sur le système nerveux central et périphérique de l'insecte (Hassal, 1990) entraînant une perturbation des courants calcium/magnésium (Ca^{++}/Mg^{++}) et sodium/potassium (Na^{+}/K^{+}) le long de l'axone. Les séquences de polarisation et de dépolarisation ainsi que l'inhibition des pompes ATPasiques se traduisent par un effet de choc dit "knockdown" suivi d'une paralysie qui entraîne la mort de l'insecte.

I.5.2. Organophosphorés

Les organophosphorés sont les dérivés de l'acide phosphorique, ils sont chimiquement instables, non persistants dans l'environnement et moins toxiques que les organochlorés qu'ils ont progressivement remplacé. Ils ont été largement utilisés en santé publique pour le traitement des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus* et *A. aegypti*, et parfois pour les gîtes à anophèles (Carnevale et Mouchet, 1990).

Les organophosphorés sont de bons neurotoxiques inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Eldefrawi, 1976) ; cette enzyme dégrade l'acétylcholine qui joue le rôle de neuromédiateur des synapses cholinergiques du système nerveux central des insectes. La phosphorylation de l'acétylcholinestérase entraîne donc une accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique. Lorsque sa concentration devient trop élevée, les récepteurs de l'acétylcholine se bloquent en position ouverte induisant la paralysie, puis la mort de l'insecte.

I.5.3. Carbamates

Les carbamates sont les dérivés de l'acide carbamique. Ils sont moins rémanents et, pour la plupart moins toxiques pour les mammifères que les organochlorés et les organophosphorés. En raison de ces caractéristiques, ils ont été largement utilisés en santé publique : notamment le propoxur et le bendiocarbe qui ont été utilisés en aspersion

intradomiciliaire pour lutter contre le paludisme (Carnevale et Mouchet, 1990). Cependant, le bendiocarbe demeure le carbamate le plus utilisé en santé publique notamment pour les PIDs (Sharp *et al.*, 2007; Akogbéto *et al.*, 2010; Djèntonin *et al.*, 2010).

I.5.4. Pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des dérivés des pyréthrines, qui sont des substances naturelles présentes dans les fleurs de chrysanthème. Les pyréthriinoïdes ont une structure et une action similaires aux pyréthrines naturelles mais, contrairement à elles, ils présentent l'avantage d'être photostables tout en gardant un pouvoir insecticide, d'avoir une toxicité sélective et une faible toxicité pour les mammifères. Leur apparition remonte aux années 1970, c'est-à-dire après l'interdiction des pesticides organochlorés comme le DDT. Ils sont très solubles dans les graisses et instables chimiquement, sensibles en particulier à l'oxydation, même si cette dernière caractéristique est moins vraie avec les nouveaux pyréthriinoïdes.

Comme le DDT, les pyréthriinoïdes agissent sur le système nerveux central et périphérique (Elliott et Janes, 1978) en modifiant la cinétique d'activation-inactivation du canal sodium le long de l'axone (Lund et Narahashi, 1983). On distingue les pyréthriinoïdes de type I ne présentant pas de radical cyané en position *a* (perméthrine, bienthrine...) et les pyréthriinoïdes de type II présentant un radical cyané en position *a* (deltaméthrine, lambdacyalothrine...).

I.5.5. Autres familles d'insecticides

Après les principales familles d'insecticides citées plus haut, il convient de citer d'autres familles d'insecticides utilisées plus récemment dans la lutte contre les moustiques tels que : les pyrrols, les néonicotinoïdes, les régulateurs de croissance (IGR) et les insecticides d'origine biologique. Ces deux dernières familles regroupent les insecticides qui sont généralement destinés à lutter contre les larves de moustiques. Parmi eux, on peut citer les juvénoïdes et les ecdysoïdes qui inhibent respectivement la nymphose (Dhadialla *et al.*, 1998; Paul *et al.*, 2006) et la synthèse de la chitine au cours de la mue (Thavara *et al.*, 2007; Matsumura, 2010) chez l'insecte.

Parmi les insecticides d'origine biologique, on distingue principalement les toxines bactériennes entomopathogènes provenant de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) et de *Bacillus sphaericus* (Lacey, 2007). Ces toxines, une fois ingérées, entraînent la lyse complète des cellules intestinales et la mort de la larve (Charles et de Barjac, 1981). L'utilisation de ces insecticides a été longtemps efficace dans la lutte contre les insectes vecteurs. Testé en laboratoire et sur le terrain, le *Bti* possède une très bonne efficacité contre les larves de

moustiques (Majambere *et al.*, 2007; Majambere *et al.*, 2010; Kinde-Gazard et Baglo, 2012). Malheureusement, la faible activité résiduelle de ces composés dans les gîtes naturels nécessite des traitements fréquents et peuvent donc occasionner un coût important.

A l'origine utilisés en agriculture et en industrie bovine, les pyrroles et les néonicotinoïdes sont deux nouvelles classes d'insecticides approuvées par l'OMS en tant que nouveaux composés chimiques alternatifs pour la lutte anti-vectorielle. Les pyrroles sont des pro-insecticides qui nécessitent une activation initiale par des oxydases à fonctions mixtes pour produire le composé actif. Ils agissent au niveau cellulaire et perturbent les voies respiratoires et les gradients de protons par le découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (Black *et al.*, 1994). Le chlorfénapyr est le premier pyrrole qui a démontré son potentiel pour améliorer la lutte contre les moustiques résistants aux insecticides actuellement approuvés par l'OMS.

Les néonicotinoïdes agissent sur le système nerveux central des insectes. Ils ont été découverts à la fin des années 1980 et sont depuis largement utilisés en médecine vétérinaire et en production végétale (Simon-Delso *et al.*, 2015). Ils comprennent actuellement une petite dizaine de molécules, souvent des dérivés soufrés ou chlorés : l'imidaclopride, l'acétamipride, et le clothianidine. Leur succès tient notamment à l'impact plus modéré de leur toxicité sur les neurones des mammifères, par rapport aux précédents insecticides utilisés, les organophosphorés et les carbamates. Ils sont cependant pointés du doigt car accusés d'être à l'origine du déclin des populations d'abeilles.

I.6. Résistance aux insecticides chez les moustiques

I.6.1. Généralités sur la résistance

La résistance aux insecticides est définie comme «l'apparition dans une population, d'individus possédant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet léthal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce» (Hamon et Mouchet, 1961).

L'utilisation d'insecticides en tant que telle, ne crée pas de résistance. Cependant, celle-ci peut se développer du fait d'une utilisation abusive ou mauvaise d'un insecticide contre une espèce nuisible. La résistance progresse lorsque la variation génétique qui survient naturellement permet à une faible proportion de la population, de résister et de survivre aux effets de l'insecticide. Si cet avantage est entretenu par utilisation constante du même insecticide, les insectes résistants se reproduisent et les changements génétiques qui confèrent

la résistance sont transmis des parents aux descendants. La proportion de génotypes résistants augmente dans la population.

La résistance à un insecticide peut s'étendre aux produits de la même famille, voire de familles voisines ayant le même mode d'action ou les mêmes cibles ; c'est la résistance croisée. Cela a été rapporté au Nord de la Thaïlande où les populations d'*A. aegypti* ont développé une résistance croisée à la deltaméthrine, perméthrine, etofanprox (Sathantriphop *et al.*, 2006). De plus chez certaines populations d'insectes, on observe une accumulation de résistances à plusieurs familles d'insecticides : ce sont des multirésistances (Hemingway et Karunaratne, 1998; Hemingway et Ranson, 2000).

L'utilisation fréquente des insecticides ayant le même mode d'action peut augmenter la probabilité d'apparition ou le niveau de résistance. Par exemple les insecticides les plus utilisés dans le programme de lutte contre les *Aedes* sont les pyréthriinoïdes. Cependant la résistance à ces insecticides a été rapportée dans le monde entier. En Afrique centrale des cas de résistance à la deltaméthrine ont été rapportés dans quelques populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011; Ngoagouni *et al.*, 2016). Dans les îles Caïmans des cas de résistance au DDT et pyréthriinoïdes ont été rapportés dans les populations d'*A. aegypti* (Harris *et al.*, 2010). Le développement de la résistance aux pyréthriinoïdes chez *A. aegypti* et *A. albopictus* est très préoccupant car très souvent en cas d'épidémie, le programme de contrôle de ces deux espèces est largement basé sur l'utilisation des pyréthriinoïdes (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2008).

Les chercheurs de Makkah (Arabie saoudite) ont conclu que les principales causes de la résistance à quelques pyréthriinoïdes sont l'application fréquente, l'isolement de la population, le mode d'action des insecticides ainsi que la vente des insecticides mal étiquetés par des entrepreneurs (Al Thbiani Aziz *et al.*, 2011).

I.6.2. Mécanismes de résistance aux insecticides

Plusieurs types de mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides ont été identifiés chez les insectes (Figure 6). La résistance peut impliquer un comportement d'évitement de l'insecte qui ne rentre pas en contact avec l'insecticide (résistance comportementale), une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide (résistance cuticulaire), une détoxification ou enfin une modification de sa cible. La résistance comportementale et les modifications de l'absorption ou de l'excrétion des insecticides sont des mécanismes de résistance relativement rares mais surtout mal élucidés. En revanche,

l'augmentation de la détoxification des insecticides et les modifications des cibles sont des mécanismes à l'origine de niveaux de résistance très élevés chez les insectes.

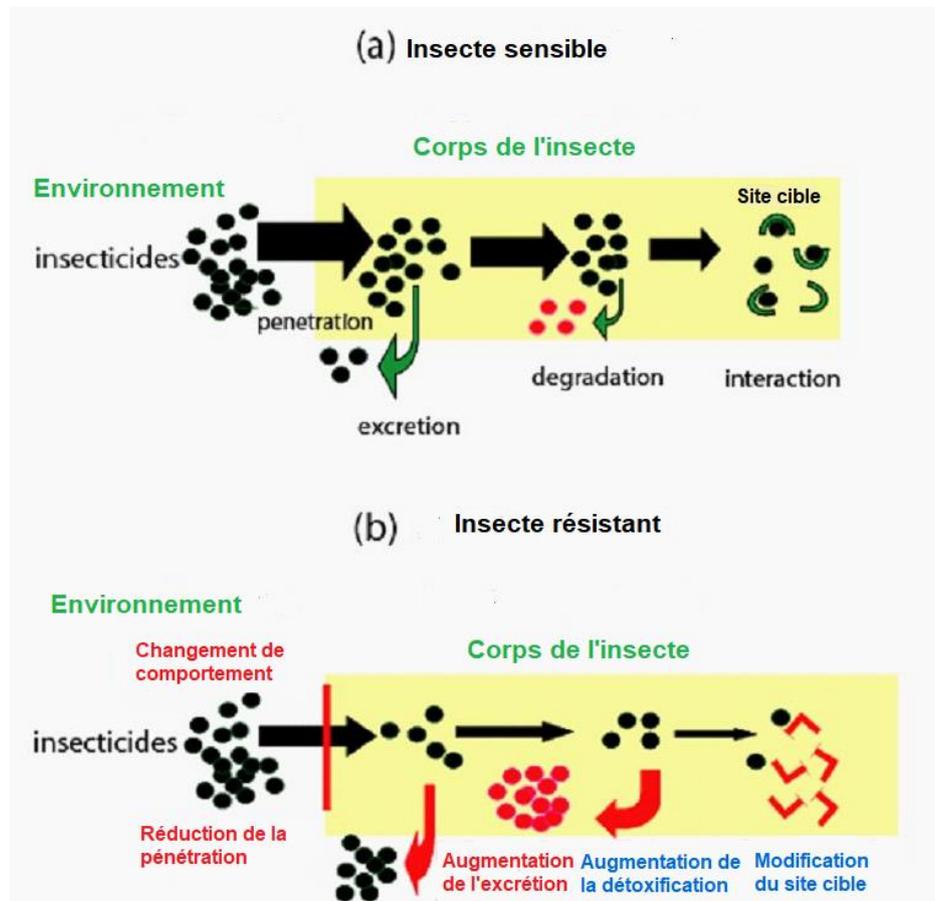


Figure 6 : Mécanismes de résistance aux insecticides (Corbel et N'Guessan, 2013).

I.6.3. Résistance par modification de cible

La plupart des classes d'insecticide cible un site d'action spécifique dans le système nerveux. Une modification de la conformation de la protéine cible de l'insecticide peut diminuer la capacité de fixation de ce dernier et donc son effet. On observe trois types de résistance par modification de cible : la modification du canal sodium (résistance "knock-down : kdr") responsable de la résistance aux organochlorés et aux pyréthrinoides, la modification de l'acétylcholine-estérase responsable de la résistance aux organophosphorés et aux carbamates et de l'acide gamma amino butyrique responsable de la résistance à la dieldrine (RDL) (Hemingway et Ranson, 2000).

I.6.3.1. Modification de l'acétylcholinestérase :

L'acétylcholinestérase, codée par le gène Ace-1, est la cible des insecticides de type organophosphorés (OP) et carbamates. Ces insecticides se fixent sur l'enzyme qui n'est alors

plus capable de dégrader l'acétylcholine inter-synaptique. Le signal transmis par le neurotransmetteur sur son récepteur n'est plus interrompu, ce qui conduit à une hyperexcitation post-synaptique et à la mort de l'insecte. Plusieurs mutations (mutations Ace-1) sur ce gène telles que G119S ont été retrouvées chez de nombreux moustiques comme *Culex pipiens* (Raymond *et al.*, 1985; Raymond *et al.*, 1986; Bonning et Hemingway, 1991), *Anopheles gambiae* (Weill *et al.*, 2003) leur conférant une résistance accrue aux OP et aux carbamates. Chez *A. aegypti*, aucune mutation n'est connue comme associée à l'insensibilité du site cible Ace-1 (Vontas *et al.*, 2012).

I.6.3.2. Modification du récepteur GABA :

Le récepteur à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) codé par le gène *rdl* est la cible des cyclodiènes, de certains organochlorés (lindane) et des phénylpyrazoles (Fipronil). La fixation du GABA sur son récepteur régule le passage des ions chlorures à travers la membrane synaptique. Les cyclodiènes en se fixant sur le récepteur au GABA, bloquent le passage des ions chlorures, entraînant une hyperexcitation suivie de la mort de l'insecte. Une mutation sur le gène *rdl* entraînant la substitution de l'alanine en serine en position $\gamma 0 \beta$ (Ffrench-Constant *et al.*, 1993) ou glycine (Hosie *et al.*, 1997) conduit à une meilleure résistance aux cyclodiènes (Bass *et al.*, 2004). Cette mutation (mutation *rdl*) a été retrouvée entre autre chez les moustiques *A. aegypti* (Thompson *et al.*, 1993) et *An. gambiae* (Brooke *et al.*, 2006).

I.6.3.3. Modification du canal à sodium voltage dépendant :

Le canal à sodium voltage dépendant est la cible des pyréthrinoïdes et de l'organochloré DDT. La fixation de l'insecticide sur le canal entraîne son ouverture et une hyperexcitation neuronale se traduisant par un phénomène de paralysie de l'insecte (effet « knock down ») qui peut conduire à sa mort. Les mutations *kdr* (mutations *kdr* pour « knock down resistance ») représentent l'un des principaux mécanismes de résistance par modification de cible. Elles confèrent une résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT. Chez *A. aegypti*, 11 mutations *kdr* ont déjà été décrites dans le monde. Ces mutations sont situées entre les domaines I et IV du canal sodium. Il s'agit entre autres : F1534C, V1016G/I, I1011M, V410L...Cependant en Afrique seulement trois de ces mutations ont déjà été reportées : F1534C au Ghana (Kawada *et al.*, 2016), V1016I au Burkina-Faso (Sombié *et al.*, 2019) et V410L en Angola (Ayres *et al.*, 2020). Chez *A. albopictus*, les mutations *kdr* sont moins nombreuses. On dénombre jusqu'ici quatre mutations décrites au niveau de canal sodium et affectant les codons 1532 et

1534. Parmi ces mutations, seul le variant F1534S s'est révélé associé de façon modérée à la résistance au DDT et aux pyréthroïdes (Xu *et al.*, 2016; Moyes *et al.*, 2017).

I.6.4. Résistance métabolique

La résistance métabolique se traduit par une augmentation du métabolisme des insecticides, généralement par des familles d'enzymes à large spectre de substrats. Ces enzymes dites de détoxification sont présentes dans l'ensemble du règne animal et végétal. L'augmentation du métabolisme des insecticides peut être due soit à une augmentation de la production d'une ou de plusieurs enzymes de détoxification existante soit à un meilleur métabolisme de l'insecticide à la suite d'une mutation d'une ou de plusieurs enzymes. Ce phénomène se traduit par une diminution de la quantité d'insecticide atteignant la cible et donc à une augmentation de la tolérance de l'insecte. Chez les moustiques, trois grandes familles d'enzymes de détoxification ont été fréquemment impliquées dans la résistance aux insecticides : Les monooxygénases à cytochrome P450 (CYPs), les glutathion S-transférases (GSTs) et les carboxylestérases (COEs) (Hemingway *et al.*, 2004).

- Les monooxygénases à cytochrome P450 interviennent surtout dans la résistance aux pyréthriinoïdes ; elles participent à l'oxydation d'un grand nombre de xénobiotiques, les rendant généralement moins toxiques en augmentant leur solubilité dans l'eau, facilitant ainsi leur élimination par l'organisme. Les niveaux de résistance qu'elles confèrent sont parfois très élevés et peuvent aboutir à des échecs opérationnels comme cela a été le cas en Afrique du Sud avec *An. funestus* (Hargreaves *et al.*, 2000). Plusieurs gènes de cette famille ont été séquencés chez différentes espèces d'insectes dont certains sont directement impliqués dans la résistance aux insecticides. Chez les *Aedes*, l'expression élevée de plusieurs gènes de cette famille a été précédemment démontrée comme étant principalement responsable de la résistance aux pyréthroïdes, à l'instar des CYP6, CYP9 (Ishak *et al.*, 2017; Moyes *et al.*, 2017; Rault *et al.*, 2019).

- Les estérases lysent les liaisons esters et, de ce fait jouent un rôle important dans les métabolismes des organophosphorés, des carbamates et des pyréthriinoïdes dont ils dégradent rapidement les isomères trans. La résistance conférée par les estérases est généralement due à une augmentation de leur activité suite à une surproduction d'enzymes pouvant atteindre jusqu'à 12% des protéines solubles de l'insecte (Fournier *et al.*, 1987), ce qui correspond à environ 500 fois la quantité d'estérases produites chez les insectes sensibles. Le gène *CCEAE3A* a été décrit comme impliqué dans la résistance au téméphos chez *A. aegypti* et *A. albopictus* (Grigoraki *et al.*, 2016; Moyes *et al.*, 2017).

- Les glutathion-S-transférases (GSTs), représentent une large famille d'enzymes multifonctionnelles impliquées dans la détoxification d'un grand nombre de xénobiotiques ainsi que dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Elles sont généralement impliquées dans le métabolisme des organophosphorés, du DDT et accessoirement des pyréthriinoïdes ; ce sont des systèmes enzymatiques qui catalysent la conjugaison des insecticides avec le glutathion sous forme réduite, formant ainsi des métabolites moins toxiques. Les GSTs impliqués dans la résistance au DDT agissent par élimination d'une molécule de chlore pour former un composé moins toxique. Ces enzymes n'ont pas de rôle direct sur le métabolisme des pyréthriinoïdes ; ils confèrent la résistance à ces composés par détoxification des produits issus de la peroxydation lipidique induite par les pyréthriinoïdes (Kostaropoulos *et al.*, 2001; Vontas *et al.*, 2001) réduisant ainsi le stress oxydatif. Le gène *GSTe* a été reporté comme impliqué à la résistance aux pyréthriinoïdes tandis que le *GSTe2* est impliqué dans la résistance du DDT et des pyréthriinoïdes (Lumjuan *et al.*, 2011).

I.7. Etat de la résistance aux insecticides chez les *Aedes* au Cameroun

La résistance des *Aedes* aux insecticides a été décrite pour la première fois au Cameroun en 1972 (Mouchet *et al.*, 1972). Il s'agissait des populations d'*A. aegypti* de Douala, Kumba et Ndop résistantes à la dieldrine et des populations d'*A. aegypti* de Yaoundé, Lomié et Abong Mbang, résistantes au DDT. Depuis lors très peu d'études ont été faites sur la résistance aux insecticides des *Aedes* au Cameroun. En 2011, une étude menée par Kamgang Mbouhom *et al.* (2011) a donné un aperçu du profil de résistance aux insecticides d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* dans 4 villes du Cameroun (Yaoundé, Garoua, Buéa et Bafia). Cette étude montrait que ces populations étaient sensibles à la plupart des insecticides utilisés (deltaméthrine 0,05%, DDT 4%, fenitrothion 1% et propoxur 0,1%) à l'exception des populations d'*A. albopictus* de Buéa et Yaoundé qui ont montré une résistance au DDT, à la deltaméthrine respectivement (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011). Plus récemment une autre étude dans la ville de Yaoundé a montré que ces deux espèces *A. aegypti* et *A. albopictus*, étaient résistantes à la deltaméthrine 0,05%, au bendiocarbe 0,1% et au DDT 4%. Une légère baisse de la sensibilité avait été observée pour la perméthrine 0,75% et une sensibilité totale au malathion 5%. Cette étude montrait également qu'avec une préexposition au synergiste piperonyl butoxide (PBO) à 4%, on observait une augmentation du taux de mortalité aux insecticides. Bien que largement distribuée dans le monde, la mutation F1534C connue comme associée à la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT n'a pas été détectée chez les moustiques d'*A. aegypti* testés lors de cette étude (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017).

I.8. Quelques techniques de biologie moléculaire utilisées dans cette étude

La biologie moléculaire désigne l'étude des acides nucléiques, ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN). Ces techniques reposent essentiellement sur l'hybridation moléculaire, sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et sur le séquençage des acides nucléiques. Depuis leur mise au point dans les années 1970, elles ont connu un développement exponentiel, et permettent aujourd'hui de recueillir en quelques heures les données à l'échelle du génome entier.

I.8.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules ou des tissus d'organismes vivants ou morts. Différentes variantes sont employées, suivant que l'on cherche à extraire de l'ADN génomique (issu du ou des chromosomes des cellules analysées) ou de l'ADN plasmidique (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes comme *Escherichia coli*). Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi. Toutefois tous ces protocoles suivent le même schéma de principe qui est le suivant :

- la lyse des cellules par broyage dans un tampon fait des détergents ayant pour rôle d'émulsifier les bicouches lipidiques des membranes et dénaturer les protéines, particulièrement celles liées à l'ADN dans la chromatine ;
- l'élimination des protéines du broyat au moyen de solvants organiques (en général du phénol/chloroforme) et l'ADN en solution dans la phase aqueuse supérieure est récupérée par décantation ou par centrifugation ;
- l'élimination des autres acides nucléiques (ARN...) par addition des ribonucléases qui vont hydrolyser sélectivement l'ARN en laissant l'ADN intact ;
- la concentration de l'ADN par précipitation suite à un ajout d'éthanol ou d'isopropanol dans la phase aqueuse.

I.8.2. Réaction de polymérisation en chaîne ("polymerase chain reaction" : PCR)

L'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou réaction de polymérisation en chaîne, est une méthode d'amplification génique *in vitro* permettant de multiplier en grand nombre une séquence ciblée d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire (ADNc, généré par transcription inverse à partir d'une molécule d'ARN). Cette technique a connu plusieurs améliorations depuis sa mise au point par kary Mullis en 1985. De nos jours, l'on distingue la PCR classique et la PCR en temps réel avec plusieurs variantes.

I.8.2.1. PCR classique

La PCR permet l'amplification d'une séquence d'ADN particulière (l'amplicon). La limitation de cette séquence se fait grâce à des couples d'amorces spécifiques : une amorce "sens" qui se fixe sur l'un des brins d'ADN et une amorce "antisens" qui se fixe sur l'autre brin. Cette amplification se fait par réplifications successives grâce à l'enzyme spécifique appelé "Taq polymérase" et en présence de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) et d'ions magnésium qui sert de cofacteur. Elle se déroule en 03 étapes essentielles à savoir :

- dénaturation : phase au cours de laquelle l'ADN double brin est dénaturé en simple brin par augmentation de la température entre 90°C et 97°C (De Bruijn, 1988) ;
- hybridation sur l'ADN monocaténaire , phase de refroidissement au cours de laquelle les amorces s'apparient (ou s'hybrident) à leur séquence complémentaire sur l'ADN cible. La température d'hybridation varie entre 50°C et 72°C ;
- élongation ou extension d'un brin complémentaire : phase au cours de laquelle chaque amorce fixée sur l'un des brins va s'étendre à partir de son côté 3' par juxtaposition des nucléotides (dNTPs) par l'ADN polymérase. Ces 2 dernières étapes sont en général répétées 20 à 35 fois (Saiki *et al.*, 1985; Acuto et Tosi, 1992) selon les quantités d'ADN de départ. L'ensemble de ces 3 étapes constituant un cycle d'amplification.

Cette technique est utilisée en lutte anti-vectorielle pour le génotypage des marqueurs de la résistance aux insecticides.

I.8.2.2. La PCR allèle spécifique (AS-PCR)

Cette technique est l'une des variantes de la PCR classique. Elle permet la détection directe de toute mutation ponctuelle dans l'ADN humain ou animal après visualisation des produits de PCR sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide. C'est une PCR multiplexe où plusieurs amorces spécifiques sont introduites en même temps. L'AS-PCR a déjà été utilisé dans le diagnostic des maladies génétiques et infectieuses mais aussi dans le génotypage à l'aide de marqueurs génétiques.

I.8.2.3. PCR en temps réel

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique. Cependant elle mesure la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent (par exemple SYBR Green ou sonde Taqman®, Beakon, HybProbes...) dont le signal augmente proportionnellement à la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction. Pour cette étude, le marqueur utilisé est le SYBR Green.

I.8.3. Séquençage de l'ADN génomique

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Depuis la première description, les techniques de séquençage ont fait l'objet d'innovations permettant d'en améliorer le rendement, la fiabilité et la rentabilité et elles sont regroupées sous le nom générique de séquençage haut débit ou "next generation sequencing" (NGS). Actuellement, la plupart des séquençages d'ADN sont réalisés par la méthode développée par Sanger et *al.* (1997). Les systèmes de NGS permettent de séquencer simultanément plusieurs centaines de fragments d'ADN. Les fragments de séquences sont ensuite réalignés sur un génome de référence à l'aide d'outils bio-informatiques.

I.8.4. Electrophorèse et révélation des produits amplifiés par PCR

L'électrophorèse est une technique utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leurs tailles et de leurs charges électriques. Elle consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique créé par une tension continue, ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge électrique totale, masse moléculaire, nature du support, conditions physico-chimiques), la vitesse de migration varie, ce qui permet la séparation des différentes molécules. Le gel est préparé à une concentration précise à l'aide d'un micro-onde. Un intercalant (Midori Green) est ajouté à la solution après refroidissement et l'ensemble est par la suite coulé dans un moule d'électrophorèse muni d'un peigne qui formera des puits après refroidissement. La migration se déroule le plus souvent sous une tension d'environ 150 volts à 300 mA pendant environ une trentaine de minutes. A la fin de l'électrophorèse, les bandes sont révélées par un Trans-illuminateur à lumière ultraviolette pour la détection des différentes bandes témoins d'amplification.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Cadre d'étude

Situé sur la façade ouest de l'Afrique centrale, le Cameroun est localisé au fond du Golfe de Guinée, entre les 2^{ème} et 13^{ème} degrés de latitude nord et les 9^{ème} et 16^{ème} degrés de longitude. Le pays s'étend sur une superficie de 475 442 km². Il présente une forme triangulaire qui s'étire du sud jusqu'au lac Tchad sur près de 1250 km (axe Nord-Sud) tandis que la base s'étale de l'ouest à l'est sur 860 km. Le Cameroun est limité à l'ouest par le Nigeria, au sud par la République du Congo, le Gabon et la Guinée équatoriale, à l'est par la République Centrafricaine et au nord-est par le Tchad. Le climat varie du type soudano-sahélien de steppes ou de prairie au Nord au type équatorial forestier humide au Sud. Le taux de précipitations annuel varie de 400 mm dans les zones arides à 10 000 mm au pied du Mont Cameroun. Les températures annuelles varient entre 18°C et 28°C. En fonction des précipitations, et de la succession des saisons, quatre principaux domaines climatiques (Figure 7) ont été définis au Cameroun (Tsalefac, 2006) :

- Le domaine soudano-sahélien présente une succession de microclimats allant du climat typiquement sahélien de l'extrême-nord au climat soudanien de nuance humide du bassin de la Bénoué. Les précipitations annuelles varient de 400 à 900 mm et la saison pluvieuse va de juin à octobre. La température moyenne annuelle atteint 28°C et l'amplitude de 7,7°C.
- Le domaine soudanien ou tropical humide couvre l'ensemble d'une aire englobant le plateau de l'Adamaoua et les Monts Mandara. Les précipitations annuelles varient de 900 à 1 500 mm. La saison des pluies dure 8 à 9 mois, avec 6 à 7 mois de pluies intenses. La température moyenne annuelle est de 28°C et l'amplitude de 6,4°C.
- Le domaine équatorial camerounien avec une pluviométrie qui varie de 2 000 mm à 10 000 mm au niveau du Mont Cameroun. Dans les régions côtières, la température moyenne annuelle est de 26°C, l'amplitude annuelle de 2,8°C. Dans les régions d'altitude, la température moyenne annuelle tombe à 21°C et l'amplitude à 2,2°C.
- Le domaine équatorial guinéen avec en moyenne 1 500 à 2 000 mm de pluie par an, réparties en quatre saisons : une grande saison sèche de mi-novembre à mi-mars ; une petite saison des pluies de mi-mars à fin juin ; une petite saison sèche de juillet à août et une grande saison des pluies de septembre à mi-novembre. La température moyenne annuelle est d'environ 25°C et l'amplitude moyenne annuelle de 2,4°C.

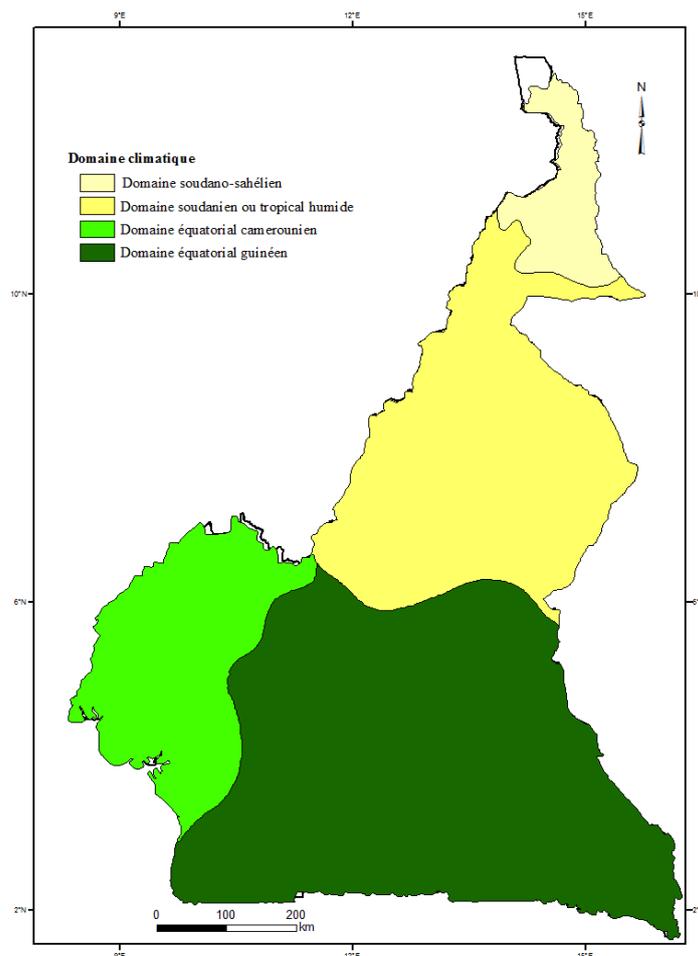


Figure 7 : Principaux domaines climatiques du Cameroun (Olivry, 1986)

II.1.2. Quelques éléments caractéristiques des différentes localités prospectées

(Olivry, 1986)

Les prospections entomologiques se sont déroulées dans 24 localités du Cameroun (Tableau I)

Maroua (10°35'N ; 14°19'E) est le chef-lieu de la région de l'Extrême-Nord du Cameroun et du département du Diamaré. Le climat est de type tropical, sec et chaud, presque semi-désertique. La température moyenne annuelle est de 28,3 °C. La moyenne annuelle des précipitations atteint 794 mm³. La ville est quadrillée par de grandes avenues bordées d'arbres qui apportent un peu de fraîcheur.

Parc de la Bénoué (08°20'N ; 13°49'E) situé dans la région du Nord, il est l'une des plus anciennes zones protégées du Cameroun. Avec ses 180 000 ha il est actuellement la réserve d'animaux par excellence du Cameroun.

Garoua (09°16'N ; 13°25'E) est la capitale régionale du Nord. Elle est située au cœur des zones cotonnières. Ville sans grand relief, elle est confrontée à un problème d'étalement urbain peu ou mal maîtrisé. Le climat est de type tropical soudanien de bassin avec une pluviométrie moyenne annuelle de 950 mm et une température moyenne annuelle de 28°C.

Ngaoundéré (07°20'N ; 13°39'E), chef-lieu de la région de l'Adamaoua ; **Mbé (07°50'N ; 13°36'E)**, située sur l'axe Ngaoundéré-Garoua ; **Meiganga (06°32'N ; 14°19'E)** située sur l'axe Garoua-Boulaï-Ngaoundéré. Ces trois villes ont comme caractère commun le climat tropical humide d'altitude, avec une pluviométrie moyenne annuelle de 1 600 mm et une température moyenne annuelle de 22°C.

Tibati (06°28'N ; 12°38'E) est situé dans la région de l'Adamaoua et est le chef-lieu du département du Djérem. Il possède un climat de savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger. Sur l'année, la température moyenne à Tibati est de 21,8°C et les précipitations sont en moyenne de 951,9 mm.

Banyo (06°45'N ; 11°49'E), ville de la région de l'Adamaoua, au Cameroun. C'est également le chef-lieu du département du Mayo-Banyo. Il possède un climat de savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger. La température varie généralement de 14°C à 30°C.

Limbé (04°00'N ; 09°13'E) est une ville côtière, chef-lieu du département du Fako dans la région du Sud-Ouest du Cameroun. Fondée en 1857 sur le flanc sud du mont Cameroun, c'est une station balnéaire très prisée. Elle possède un climat de savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger. La température moyenne à Limbé est de 26,2°C et les précipitations sont en moyenne de 1691,7 mm par an.

Kumba (04°38'N ; 09°27'E), ville située dans la région du Sud-Ouest. Elle est traversée par la rivière Kumba affluent du Moungo et se trouve à proximité de trois principaux lacs, le fameux lac Barombi Mbo, le lac Kumba et le lac Mbanga. Cette ville est dotée d'un climat de savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger, avec une température annuelle moyenne de 25,5 °C et des précipitations d'environ 2 751 mm par an. La saison sèche est courte et peu marquée.

Buea (04°09'N ; 09°13'E) est le chef-lieu de la région du Sud-Ouest qui est l'une des deux régions anglophones du Cameroun. Cette ville se trouve à 72 km environ de Douala et à une trentaine de km de Limbé. La ville est située sur le versant oriental du Mont Cameroun, où se trouve un volcan dont la dernière éruption remonte à 2000. Le climat est de type savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger, avec une pluviométrie moyenne de 2 900 mm et une température annuelle de 21°C.

Bertoua (04°33'N ; 13°46'E), capitale régionale de l'Est. Cette ville possède un climat désertique (BWh) selon la classification de Köppen-Geiger. Sur l'année, la température moyenne est de 23,7°C et les précipitations sont en moyenne de 513,3 mm.

Yaoundé (03°54'N ; 11°37'E) la capitale politique, est la deuxième ville la plus peuplée du Cameroun. La ville, caractérisée par son relief accidenté, est concentrique avec un centre principalement constitué de bâtiments administratifs et commerciaux. Le relief divise la ville en quartiers selon les collines. Le climat est du type subéquatorial guinéen, avec la pluviométrie moyenne annuelle de 1 600 mm et la température moyenne annuelle de 24°C. On distingue deux saisons pluvieuses : la première allant de mars à juin et la seconde de septembre à novembre. La saison sèche s'étend de novembre à mars.

Mbal Mayo (03°31'N ; 11°30'E), ville située sur les bords du fleuve Nyong. Elle est le chef-lieu du département du Nyong-et-So'o. Elle est fortement influencée par les paramètres climatiques propres aux régions équatoriales. En effet les températures sont élevées et constantes tout le long de l'année. La moyenne annuelle se situe autour de 24,8°C.

Edéa (03°47'N ; 10°06'E) a un climat de type équatorial de mousson avec une pluviométrie moyenne annuelle de 2 600 mm et une température moyenne annuelle de 26°C.

Douala (04°02'N ; 09°41'E) est la capitale économique du Cameroun située sur les berges du fleuve Wouri. Cette ville littorale et sans pente marquée, appartient au domaine équatorial. Elle est confrontée à de gros problèmes d'engorgement des eaux aggravé par l'étalement urbain et l'urbanisation anarchique qui ne lui permettent pas d'asseoir correctement son extension. Elle est également l'une des principales portes d'entrée au Cameroun car dispose d'un des plus grands ports fonctionnels du pays. Le climat est de type équatorial de mousson avec une très forte pluviométrie. La précipitation moyenne annuelle est de 4 000 mm et la température moyenne annuelle de 26,5°C. La saison pluvieuse s'étend de mars à novembre.

Melong (05°07'N ; 09°57'E), ville située dans le département de Moundou et la région du Littoral. Elle s'étend sur une superficie d'environ 497 km².

Sangmélina (02°56'N ; 11°58'E), chef-lieu du département du Dja-et-Lobo dans la région du Sud. Il possède un climat de savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger. Sur l'année, la température moyenne à Sangmélina est de 24,4°C et les précipitations sont en moyenne de 865,8 mm par an.

Ebolowa (02°54'N ; 11°09'E), située au cœur de la forêt équatoriale, cette ville est chef-lieu de la région du Sud et du département de la Mvila. Elle possède un climat de savane avec hiver sec (Aw) selon la classification de Köppen-Geiger. La température moyenne à Ebolowa est de 24,4°C et les précipitations sont en moyenne de 865,8 mm par an.

Kribi (02°57'N ; 09°55'E) est une communauté urbaine du Cameroun située dans le département de l'Océan et la région du Sud. C'est une importante station balnéaire connue pour ses plages de sable blanc et son port. Elle est un point stratégique du trafic maritime dans le Golfe de Guinée et le terminus de l'oléoduc transportant le pétrole brut depuis les champs pétrolifères de la région de Doba au sud-ouest du Tchad. Du fait de sa position équatoriale, elle possède une courte saison assez sèche et une longue saison très humide.

Bafoussam (05°29'N ; 10°26'E) est le chef-lieu de la région de l'Ouest. Le climat est également de type équatorial de mousson avec un faciès montagneux et une pluviométrie moyenne annuelle de 1 800 mm et la température moyenne annuelle de 25°C.

Bafang (05°09'N ; 10°14'E) est le chef-lieu du département du Haut-Nkam (region de l'Ouest). Il est doté d'un climat tropical avec une température annuelle moyenne de 19°C et des précipitations d'environ 2 085 mm par an.

Foumban (05°43'N ; 10°55'E) est le chef-lieu du département du Noun. Il est situé dans le bassin versant de la rivière Nchi. On y retrouve un climat de savane. La température moyenne annuelle est de 30° C et la pluviométrie est de 854 mm de pluies par an.

Bamenda (05°58'N ; 10°13'E), chef-lieu de la région du Nord-Ouest. Le climat est de type équatorial de mousson avec un faciès montagneux. La pluviométrie moyenne annuelle est de 2 600 mm et la température moyenne annuelle de 19,4°C.

Tableau I : Localités et périodes de collecte des échantillons d'*Aedes*

Localités	Périodes de collecte
Maroua	Juin 2017
Parc de la Bénoué	Juillet 2017
Garoua	Juillet 2017
Ngaoundéré	Juillet 2017
Mbé	Juillet 2017
Meiganga	Juillet 2017
Tibati	Juillet 2017
Banyo	Juillet 2017
Limbé	Mars 2017
Kumba	Mars 2017
Buea	Mars 2017
Bertoua	Avril 2017

Yaoundé	Avril 2017
Mbalmayo	Avril 2017
Edéa	Mars 2017
Douala	Mars 2017
Melong	Juillet 2017
Sangmélina	Avril 2017
Ebolowa	Avril 2017
Kribi	Mai 2017
Bafoussam	Avril 2017
Bafang	Avril 2017
Foumban	Avril 2017
Bamenda	Avril 2017

II.1.3. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé a été les moustiques des espèces *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* provenant de diverses localités du Cameroun et les souches de laboratoire.

II.1.4. Matériel non biologique

Le matériel non biologique sera progressivement présenté lors de la description des méthodes.

- **Matériel d'échantillonnage et d'élevage des moustiques** : aspirateur à bouche, louches, bassines, tamis, bouteilles, bacs d'élevage, "Global positioning system" (GPS), thermo-hygromètre, stylos, étiquettes, marqueurs, fiches de données, glacière, cages, tulle moustiquaire, tétramine, solution sucrée à 10%, coton, silicagel, tubes Eppendorf 1,5 mL, tubes Falcon 15 mL, RNA*later* ;
- **Matériels pour les tests de sensibilité aux insecticides** : tubes, gobelets, papiers imprégnés d'insecticides, minuteur, les larvicides téméphos (Sigma Aldrich) et *Bacillus thuriengensis israelensis* (*Bti*, Vectobac® 12AS) ;
- **Matériel d'extraction d'ADN et d'ARN** : micropipettes (0-10 µL, 0-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL), embouts de micropipettes, tubes Eppendorf 1,5 mL, pilons de broyage, solution LIVAK, glace, K-acétate 8 M, solutions d'alcool à 70% et 100%, eau pure, bain-marie, kit Picopure, Superscript III, nanodrop-LITE ;

- **Matériel d'amplification et de révélation des produits amplifiés :** thermocycleur GENETOUCH, kit Kapa, machine TaqMan, tube PCR 0,2 mL, plaque PCR, gel d'agarose, système d'électrophorèse, trans-illuminateur ultraviolet, amorces des différents gènes à amplifier.

II.2. Méthodes

II.2.1. Récolte et élevage du matériel biologique

Les stades pré imaginaires des *Aedes* ont été collectés dans plusieurs localités du Cameroun entre mars et juillet 2017. Sur la base des travaux antérieurs menés au Cameroun, 24 localités ont été choisies à travers le pays (Figure 8). Pour avoir un échantillon représentatif du pays, nous avons prospecté au moins une localité par région. Dans chaque localité sélectionnée, différents types de gîtes larvaires : domestiques (récipients de stockage d'eau, abreuvoir pour animaux...) et péri domestiques (boîtes de conserve abandonnées, récipients abandonnés, épaves de véhicules, pneus...) et naturels (creux de rochers, creux d'arbres) ont été prospectés. Les collectes se sont faites en milieux urbain et péri-urbain (20 gîtes larvaires positifs par milieu). Les stades immatures ont été collectés à l'aide d'une pipette ou d'une louche, transférés dans une bouteille, transportés à l'insectarium et élevés jusqu'au stade adulte. Les moustiques obtenus après émergence ont été examinés sous loupe binoculaire et identifiés à l'aide des clés d'identification morphologique définies par Edwards (Edwards, 1941) et Jupp (Jupp, 1996). Tous les moustiques adultes identifiés morphologiquement comme *A. aegypti* ou *A. albopictus* provenant de la même localité ont été regroupés dans une cage de reproduction et maintenus jusqu'à l'obtention de la génération 1, 2 et 3 devant servir pour les différentes analyses. Au-dessus de chaque cage était placé un coton imbibé de jus sucre 10% qui servait d'aliment énergétique pour les adultes et un repas de sang sur lapin a été donné aux femelles pour permettre qu'elles puissent compléter leur cycle gonotrophique. Tout au long de l'étude, les moustiques ont été maintenus à l'insectarium sous les conditions suivantes température de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $75 \pm 10 \%$.

Les souches de Benin (SBE), New Orleans (NO) et "Vector Control Research Unit" (VCRU) ont été utilisées comme souches de laboratoire sensibles. Les 02 premières sont des souches d'*A. aegypti* et la dernière, souche d'*A. albopictus*.

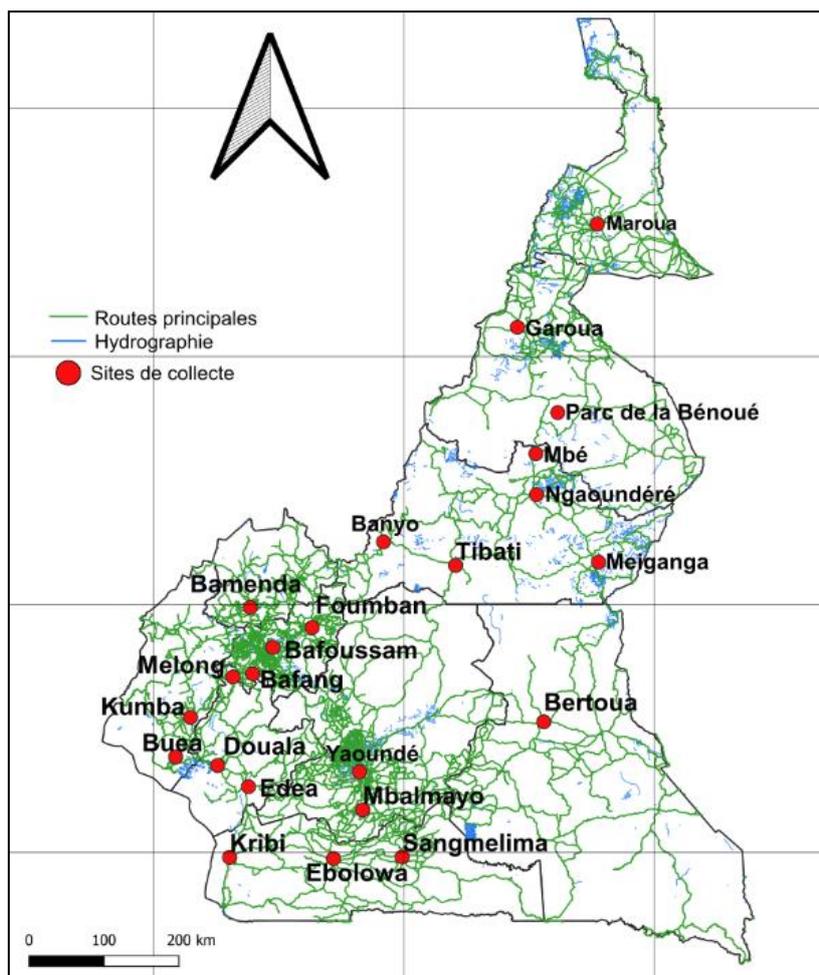


Figure 8 : Carte du Cameroun montrant les différents sites de collecte des échantillons de moustiques (Institut National de Cartographie, modifié)

II.2.2. Tests de sensibilité aux insecticides

Six aduicticides appartenant à quatre familles d'insecticide ont été utilisés : deux pyréthriinoïdes (deltaméthrine 0,05%, perméthrine 0,25%), un organochloré (DDT 4%), deux carbamates (propraxur 0,1%, bendiocarbe 0,1%) et un organophosphoré (fénitrothion 1%). Pour les tests larvaires, deux larvicides ont été utilisés : le téméphos (Sigma Aldrich) qui est un organophosphoré et le *Bacillus thuriengensis israelensis* (*Bti*, Vectobac® 12AS) qui est un larvicide d'origine biologique.

II.2.2.1. Tests larvaires

Les tests larvaires ont été conduits selon le protocole de l'OMS (WHO, 2016b) utilisant les larves de stades III et IV. Pour ce faire, des dilutions ont été effectuées pour définir une gamme de concentrations pour chaque larvicide. C'est ainsi que pour le téméphos, sept concentrations ont été définies entre 0,0005 et 0,006 mg/L et six concentrations pour le *Bti*

définies entre 0,005 et 0,03 mg/L. Des lots de 25 larves ont été placés dans des gobelets contenant 99 ml d'eau et 1 ml de l'insecticide à tester (Figure 9). Pour chacune des concentrations, 4 répétitions (4 gobelets) ont été effectuées quand les effectifs l'ont permis. Pour chaque échantillon testé, deux lots de larves témoins ont été préparés : 99 ml d'eau et 1 ml du diluant (alcool 95% pour téméphos et eau pour *Bti*). La lecture des tests a été effectuée après 24 heures d'exposition. Il s'est agi de dénombrer les larves mortes et vivantes. Les larves incapables de remonter à la surface ou de montrer une réaction de plongée caractéristique lorsque l'eau était perturbée, ont été comptées comme mortes et les larves qui ont nymphosées ont été retirées et omises du total final. Lorsque le témoin (larves évoluant dans des gobelets contenant 99 ml d'eau et 1 ml d'éthanol) a présenté plus de 10% de nymphes ou 20% de larves mortes, le test a été annulé. Les larves n'ont pas été nourries tout au long de l'expérience et elles ont été maintenues sous les conditions suivantes : température de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $75 \pm 10 \%$.

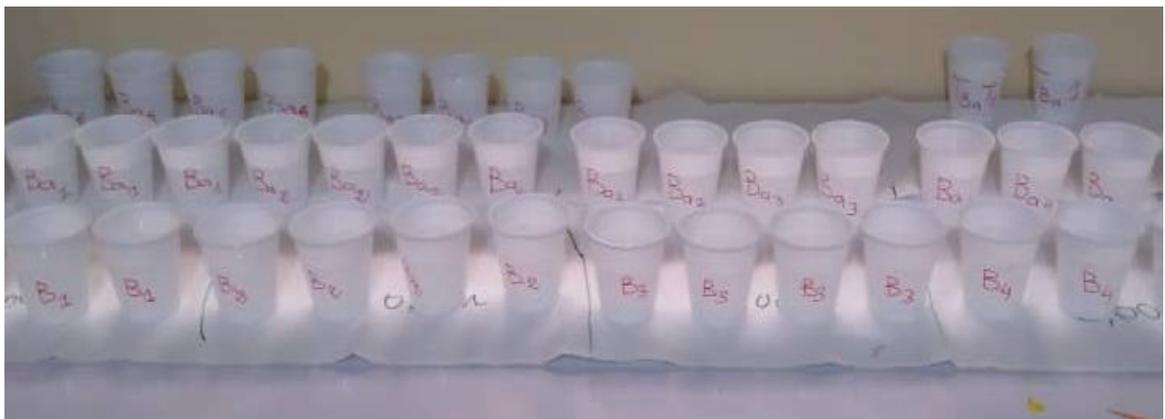


Figure 9 : Photo montrant la mise en œuvre des bio-essais larvaires (WHO, 2016b)

II.2.2.2. Tests de sensibilité avec les adultes

Les tests ont été effectués selon le protocole défini par l'OMS (WHO, 2016b). Ils ont consisté à prélever à l'aide d'un aspirateur à bouche, 20 à 25 moustiques femelles non gorgés âgés de trois à cinq jours (Figures 10a et 10b), puis à les introduire dans un cylindre d'observation tapissé de papier non imprégné (Figure 10c). Après une heure d'observation, les moustiques ont été transférés dans un cylindre d'exposition tapissé de papier imprégné d'insecticide (Figure 10d). Après une exposition d'une heure à l'insecticide (Figure 10e), les moustiques ont été de nouveau transférés dans le cylindre d'observation où ils ont séjourné pendant 24 heures et ont été nourris d'une solution de saccharose à 10% (Figure 10f). A l'issue de 24 heures, les moustiques morts ou vivants ont été dénombrés. Un moustique qui avait perdu

ses pattes, ses ailes ou était incapable de s'envoler a été également considéré comme mort (WHO, 2016b). Pour chaque échantillon et chaque insecticide, 4 réplicats (4 tubes de moustiques) ont été effectués en parallèle. Par ailleurs, deux tubes témoins (non exposés) ont été constitués. Le test a été réalisé à une température de 27°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) et une humidité relative de $75\pm 10\%$. Au bout des 24 heures, le test n'a été validé que si la mortalité des moustiques du lot témoin était inférieure à 5% (Abbott, 1925).

Certains échantillons ont révélé un niveau élevé de résistance à la dose de perméthrine recommandée par l'OMS qui est de 0,25%. De ce fait, ils ont été aussi testés avec des doses de perméthrine deux fois (0,5%) ou trois fois (0,75%) supérieures à la dose diagnostique des *Aedes*. Les moustiques issus des tests ont été repartis pour chaque insecticide en trois lots (morts, survivants et témoins). Les survivants et les témoins ont été conservés à - 80°C tandis que les morts ont été conservés dans les tubes contenant un desséchant appelé silicagel pour les analyses ultérieures.

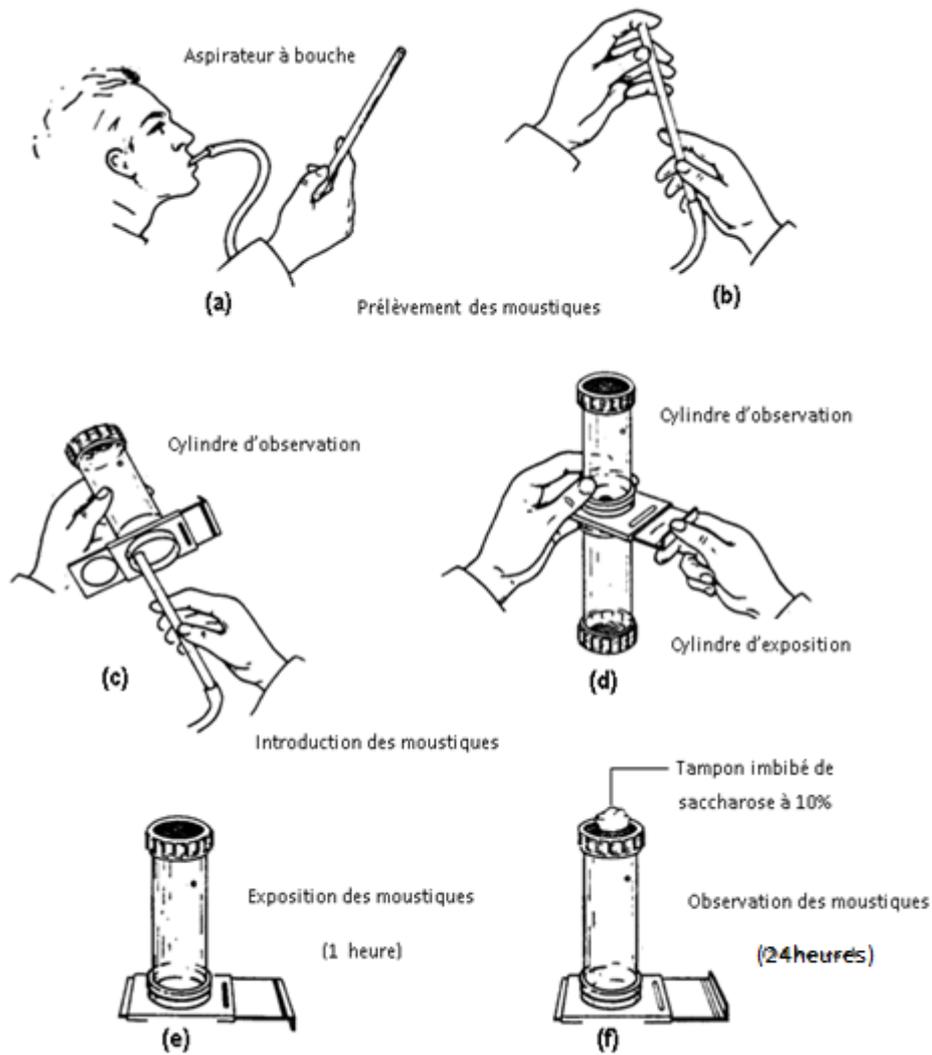


Figure 10 : Procédure du test de sensibilité aux insecticides (WHO, 2016b)

II.2.3. Recherche des mécanismes impliqués dans la résistance métabolique aux insecticides chez *A. aegypti* et *A. albopictus*

II.2.3.1. Tests de sensibilité avec les synergistes

Afin d'étudier le rôle potentiel des oxydases et des glutathion-S-transférases (GST) dans le mécanisme de résistance métabolique de ces échantillons, les tests de sensibilité associés aux synergistes : piperonyl butoxide (PBO) et diethyl maléate (DEM) ont été réalisés lorsque le nombre de moustiques le permettait selon le protocole de l'OMS (WHO, 2016b). La particularité ici est que les moustiques ont subi une double exposition : (1) une première au synergiste et (2) une seconde à l'insecticide pendant 1 heure chacune. Les moustiques issus des tests ont été repartis pour chaque insecticide en trois lots (morts, survivants et témoins). Les

survivants et les témoins ont été conservés à - 80°C tandis que les morts ont été conservés dans les tubes contenant du silicagel (dessiccant) pour les analyses ultérieures.

II.2.3.2. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADN complémentaire

Pour cette expérience trois groupes de moustiques ont été utilisés : les non-exposés (control), les exposés (résistants) et les sensibles (souches de laboratoire sensibles). Pour chaque groupe trois réplicats de 10 moustiques par espèce ont été constitués. L'ARN a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction, Picopure (Arcturus® Picopure RNA Extraction Kit Life Technologies, California, USA), suivant les recommandations du fabricant. La qualité et la quantité de l'ARN obtenu ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre "NanoDrop Lite" (Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA) et du « TapeStation system » (Agilent). Cet ARN extrait a servi pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) utilisant le kit Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les directives du fabricant, et l'ADNc ainsi obtenu a été purifié en utilisant une colonne de rotation QIAquick (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen).

II.2.3.3. Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans la résistance métabolique

Sur la base des travaux de Ishak *et al.* (2017) et Moyes *et al.* (2017), nous avons recherché la présence de certains gènes connus, comme impliqués dans la résistance aux insecticides chez *A. aegypti* et *A. albopictus* par la technique de "Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR" (qRT-PCR). Des courbes standard pour chaque gène ont été générées en utilisant une dilution en série d'ADNc pour évaluer l'efficacité de la PCR et les différences quantitatives entre les échantillons. Les réactions de qRT-PCR ont été réalisées dans un volume de 20 µL avec 10 µL sybrGreen (Applied Biosystems, Texas, USA), 0,6 µL de chaque amorce (10 µM), 7,8 µL de ddH₂O et 1 µL d'ADNc, dans les conditions suivantes : 95 ° C pendant 3 min, suivi de 40 cycles de 95°C pendant 10 s et 60°C pendant 10 s. Le niveau d'expression relatif et le facteur de variation (FC) de chaque gène cible chez les échantillons de terrain par rapport aux souches sensibles ont été calculés en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ intégrant l'efficacité de la PCR (Schmittgen et Livak, 2008) après normalisation avec les gènes de ménage : Aaeg60sL8, RPF7, RSP7 et tubuline. Toutes les séquences d'amorces et leurs origines sont affichées dans les tableaux II et III respectivement pour *A. albopictus* et *A. aegypti*. Le logiciel Mx Pro intégré à la machine TaqMan de marque Agilent a été utilisé.

Tableau II : Séquences d'amorces pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR chez *Aedes albopictus*

Nom du gène	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce antisens	Références
<i>Cyp6P12</i>	CGTGCGCTTTTGGGATTGAG	ATCGTCCGTGCCAAATCCTT	(Ishak <i>et al.</i> , 2016)
<i>RSP7</i>	AAGGTCGACACCTTCACGTC	CGCGCGCTCACTTATTAGAT	(Ishak <i>et al.</i> , 2016)
<i>qTubulin</i>	CCGCACTCGAGAAGGATTAC	GTGGTTCGGTTTGACTIONTCGT	(Ishak <i>et al.</i> , 2016)

Tableau III : Séquences d'amorces pour l'évaluation du niveau d'expression des gènes de résistance métabolique par RT-qPCR chez *Aedes aegypti*

Nom du gène	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce antisens	Références
<i>Cyp9J10</i>	ATCGGTGTTGGTGAAAGTTCTGT	CATGTCGTTGCGCATTATCCC	(Bariami <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cyp9J28</i>	CCACTGACGTACGATGCGA	GCCGATCAGTGGACGGAGC	Bariami <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cyp9M6</i>	TCGGTGCACAATCCAAACAAC	GTCGGGTACGACCAACGAAA	(Kasai <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cyp9J32</i>	CGGTCCGCTTATGACGAAGAG	TTTGTTGCTCCGAAGAGTGG	(Seixas <i>et al.</i> , 2017)
<i>GSTe2</i>	AAGATCTACGGC TGG CTG GA	TCT GCG ACA GGA CAA ACT GC	(Helvecio <i>et al.</i> , 2020)
<i>RPS3</i>	AGCGTGCCAAGTCGATGAA	GTGGCCGTGTCGACGTACT	(Kasai <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ae60sL8</i>	CTGAAGGGAACCGTCAAGCAA	TCGGCGGCAATGAACAAC	Bariami <i>et al.</i> , 2012)

II.2.4. Recherche des mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides par modification de cible d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* au Cameroun

II.2.4.1. Génotypage d'un fragment du gène canal sodium portant la mutation F1534C chez *Aedes aegypti*

L'ADN génomique a été extrait à partir de 30 spécimens de la génération G0 pour chaque échantillon selon le protocole de Livak (1984). Le tampon de broyage Livak a été au préalable chauffé dans un bain-marie d'eau à 65°C. Les moustiques ont été placés chacun dans un tube Eppendorf de 1,5 mL puis broyés dans 100 µL de tampon de broyage. Après une incubation à 65°C pendant 30 minutes dans le but de dénaturer les nucléases, a suivi une brève centrifugation afin de condenser le broyat au fond du tube. Ensuite, 14µL d'acétate de potassium 8M ont été ajoutés à chaque échantillon et mélangés à l'aide d'un vortex mixeur

avant une seconde incubation sur de la glace pendant 30 minutes. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 13000 tours/min pendant 20 min à 4°C pour précipiter les débris cellulaires et les protéines dénaturées. Le surnageant de chaque tube a été transféré dans un nouveau tube et précipité par addition de 200 µL d'éthanol 100%. Les échantillons ont été centrifugés à nouveau à 13000 tours/min pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot a été rincé avec 100 µL d'éthanol glacial 70%. Le culot d'ADN a été laissé sur la paillasse pour sécher pendant environ 1 heure. L'ADN ainsi extrait a été reconstitué dans 100 µL d'eau stérile (Sigma®, Saint Louis, Missouri USA), puis incubé à 65°C pendant 10 minutes pour suspendre le culot ; la solution a été mélangée au vortex et la concentration d'ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre "NanoDrop Lite" (Thermo Scientific Inc., Wilmington, USA). Les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Cet ADN a été utilisé pour rechercher la mutation F1534C qui a été décrite comme étant associée à la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT. Une PCR tétraplexe a été réalisée selon le protocole de Harris et *al.* (2010). La réaction s'est faite dans un volume final de 15µL contenant de l'ADN polymérase et ses cofacteurs, les dinucléotides triphosphates et les amorces spécifiques de la mutation F1534C (AaEx31P et AaEx31Q qui amplifient le gène entier; AaEx31wt et AaEx31mut qui identifient respectivement la souche sauvage et la souche mutante). Le milieu réactionnel a été composé comme indiqué dans le tableau IV. Après une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 45 secondes à 72°C) suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C dans un thermocycleur de marque "BIOER Gene touch" (Applied Biosystems). Les produits de la PCR ont été séparés sur gel d'agarose 3% coloré au Midori green (préparé comme indiqué au paragraphe I.8.4.) à 150 V pendant 30 minutes et visualisés en utilisant un système d'imagerie de gel pour confirmer la taille du produit. Au total 13 échantillons d'*A. aegypti* ont été analysés pour cette mutation : Maroua, Garoua, Parc Bénoué, Mbé, Ngaoundéré, Banyo, Tibati, Meiganga, Douala, Edéa, Melong, Yaoundé et Limbé.

Tableau IV : Composition du milieu réactionnel de la PCR permettant de révéler la mutation F1534C chez *Aedes aegypti*

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 réaction à 15µL
Tampon de Taq 10X	1 X	1,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,25mM	0,75 µL
dNTPs (25 mM)	0,2mM	0,12 µL
Aa Ex31P (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Aa Ex31Q (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Aa Ex31wt (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Aa Ex31mut (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Taq polymérase (5UI/µL)	0,4UI/µL	0,12 µL
ADN	-	1 µL
ddH ₂ O	-	9,47 µL
Total		15µL

dNTPs : dinucléotides triphosphates ; ddH₂O : eau bi-distillée ; UI : unité internationale ; X : concentration de la solution tampon ; MgCl₂ : chlorure de magnésium; ADN : acide désoxyribonucléique ; mM : micromolaire ; µL : microlitre.

II.2.4.2. Génotypage d'un fragment du gène canal sodium portant la mutation F1534C chez *Aedes albopictus*

La séquence génomique du canal sodium codant pour le segment III (sous unité 6) est fortement conservée (similarité dans l'enchaînement des nucléotides) entre *A. aegypti* et *A. albopictus*. De ce fait le protocole utilisé pour la recherche de la mutation F 1534C chez *A. albopictus* a été le même que celui décrit ci-dessus chez *A. aegypti* avec quelques modifications apportées par Aguirre-Obando et al (2017). Ainsi la réaction s'est déroulée dans un volume total de 15 µL contenant l'ADN polymérase et ses cofacteurs, les dinucléotides triphosphates et cette fois ci seulement trois amorces. Une première commune aux deux allèle com R : 5'-TCT GCT CGT TGA AGT CGA T-3 ', et deux autres spécifiques à l'allèle précédent : l'allèle 1534Phe + : 5'-GCG GGC TCT ACT TTG TGT TCT TCA TAT T-3 ' qui identifie la souche sauvage (sensible) et l'allèle 1534Cyskdr : 5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCT CTA CTT TGT GTT CTT CAT CAT GTG-3 ' qui identifie la souche mutante (résistante). Les détails sur la préparation du milieu réactionnel sont donnés dans le tableau V. Les paramètres de la PCR étaient de 95°C pendant 2 minutes et 35 cycles à 95°C pendant 30

secondes, 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes, suivis d'une étape d'extension finale de 72°C pendant 10 minutes. Les amplicons ont été séparés sur gel d'agarose coloré au Midori green (Nippon genetics Europe GmbH, Dueren, Allemagne). Quatorze échantillons d'*A. albopictus* ont été analysés pour la recherche de cette mutation : Edéa, Buea, Bafang, Bafoussam, Bamenda, Sangmélina, Ebolowa, Mbalmayo, Bertoua, Kumba, Tibati, Foumban, Melong et Douala.

Tableau V : Composition du milieu réactionnel de la PCR permettant de révéler la mutation F1534C chez *Aedes albopictus*

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 réaction à 15µL
Tampon de Taq 10X	1 X	1,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,25mM	0,75 µL
dNTPs (25 mM)	0,2mM	0,12 µL
F1534 (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
1534C (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Com R (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Taq polymérase (5UI/µL)	0,4UI/µL	0,12 µL
ADN	-	1 µL
ddH ₂ O	-	9,98 µL
Total		15µL

dNTPs : dinucléotides triphosphates ; ddH₂O : eau bi-distillée ; UI : unité internationale ; X : concentration de la solution tampon ; MgCl₂ : chlorure de magnésium; ADN : acide désoxyribonucléique ; mM : micromolaire ; µL : microlitre.

II.2.4.3. Polymorphisme du gène canal sodium voltage dépendant chez *Aedes aegypti*

Pour évaluer le polymorphisme du gène VGSC et détecter d'éventuelles signatures de sélection, un fragment de ce gène recouvrant la mutation F1534C (une partie du segment 6 du domaine III) a été amplifié et séquencé sur 130 moustiques G0 collectés dans 13 localités du Cameroun. Pour ce faire, l'ADN extrait des spécimens d'*A. aegypti* a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques puis envoyé au séquençage. Pour l'amplification, les amorces utilisées, étaient : aegSCF7 et aegSCR7 ; et pour le séquençage, aegSCR8 (Kasai *et al.*, 2011). L'amplification s'est faite dans un volume total de 15µL composé comme indiqué dans le tableau VI. Les conditions de la réaction étaient les suivantes : une dénaturation initiale de 3

minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 66°C, 30 secondes à 72°C) suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Après migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5% contenant 1 µL de Midori Green, 10 µL de chaque produit d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit ExoSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, New England Biolabs, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les amplicons ainsi purifiés ont été dilués à une concentration finale d'environ 150 ng/µL, et la séquence d'ADN de chaque échantillon a été déterminée par le séquenceur automatique en Angleterre (ABI 3130 XL Genetic Analyseur, Applied Biosystems).

Tableau VI : Composition du milieu réactionnel de la PCR permettant d'amplifier le domaine III du VGSC chez *Aedes aegypti*

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 réaction à 15µL
Tampon de Taq 10X	1 X	1,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,25mM	0,75 µL
dNTPs (25 mM)	0,2mM	0,12 µL
aegSCF7 (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
aegSCR7 (10 mM)	0,34mM	0,51 µL
Taq polymérase (5UI/µL)	0,4UI/µL	0,12 µL
ADN	-	1 µL
ddH ₂ O	-	10,49 µL
Total		15µL

dNTPs : dinucléotides triphosphates ; ddH₂O : eau bi-distillée ; UI : unité internationale ; X : concentration de la solution tampon ; MgCl₂ : chlorure de magnésium ; ADN : acide désoxyribonucléique ; mM : micromolaire ; µL : microlitre.

II.2.5. Exploitation et analyses des données

II.2.5.1. Analyse des données des tests de sensibilité

Toutes les données ont été saisies dans le logiciel Excel version 2013, analysées avec ce logiciel pour les tests avec les adultes et Win DL v.2.0. pour les tests larvaires. Les graphes ont été construits à l'aide du logiciel GrapPad V7.0. Le seuil de signification pour toutes les analyses était de $\alpha = 0,05$.

II.2.5.2. Données des tests larvaires

Les résultats des tests larvaires ont été analysés à l'aide du logiciel Win DL v.2.0.(Giner *et al.*, 1999). Ce logiciel permet l'analyse statistique de l'effet de concentrations croissantes d'une molécule insecticide sur le taux de mortalité de lots d'insectes. Win DL trouve un ajustement des résultats à une droite, après transformation logarithmique des concentrations, et probit des fréquences cumulées de mortalité. Pour chaque échantillon les CL₅₀ et CL₉₅ (concentration létale pour 50 % et 95 % des larves) ainsi que les intervalles de confiance sont estimés. La RR (Résistance Ratio) est évaluée (RR= CL de l'échantillon étudié / CL de l'échantillon de référence). La résistance ratio (RR) est calculée en comparant la CL de chaque échantillon testé à ceux de la souche sensible. Ainsi, la RR_{50(95)} = CL_{50 (95)}} de l'échantillon étudié / CL_{50(95)}} de la souche sensible et RR_{95} = CL_{95 (95)}} de l'échantillon étudié / CL_{95(95)}} de la souche sensible. Une souche de moustique est considérée comme sensible lorsque la RR est inférieure à 5, et moyennement résistante lorsque la RR est comprise entre 5 et 10, et très résistante lorsque la RR est supérieure à 10 (WHO, 2016b).}}

II.2.5.3. Données des tests de sensibilité aux insecticides avec les adultes

La variable mesurée est la mortalité qui correspond au nombre de moustiques morts au bout de 24 heures après l'exposition à l'insecticide seul ou à une préexposition au synergiste. Cette mortalité ainsi que l'erreur ont été calculées à l'aide du tableur Excel 2013.

$$\text{Taux de mortalité observée} = \frac{\text{nombre de moustiques morts}}{\text{nombre total de moustiques exposés}} \times 100$$

Les taux de mortalité ont été interprétés suivant les recommandations de l'OMS (WHO, 2016b) définies de la manière suivante :

- taux de mortalité supérieur ou égal à 98% : sensibilité ;
- taux de mortalité supérieur ou égal à 90% : résistance probable de l'échantillon ;
- taux de mortalité inférieur à 90% : résistance confirmée.

Le test χ^2 a été utilisé pour comparer les taux de mortalité entre moustiques soumis aux insecticides seuls et ceux soumis aux insecticides après préexposition aux synergistes PBO ou DEM.

II.2.5.4. Analyse des données des séquences d'ADN génomique

II.2.5.4.1. Correction et alignement des séquences

Les séquences obtenues ont été visualisées et corrigées manuellement lorsque nécessaire après vérification du chromatogramme, à l'aide du logiciel BioEdit software v7.1.8 (Figure 11). Par la suite ces séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Clustal W (Hall, 1999) en utilisant pour référence des séquences de la même portion du gène étudié précédemment publiées dans GenBank. Ces séquences de référence sont enregistrées sous les numéros d'accèsion : MF794989.1, MF794985.1, et MF794990.1 représentant respectivement les individus résistants, sensibles et hétérozygotes.

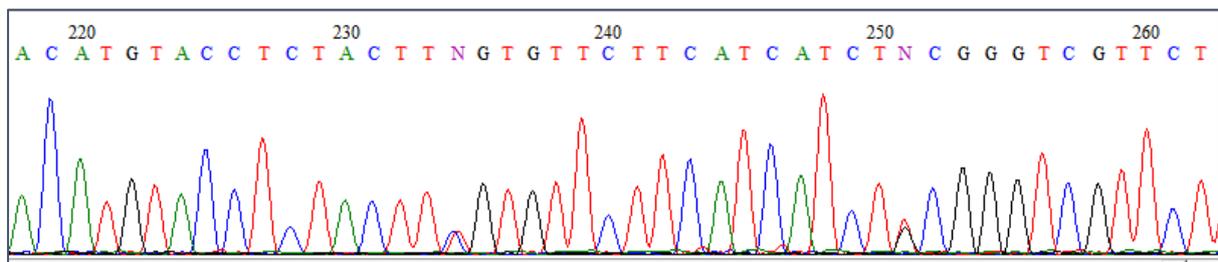


Figure 11. Exemple de chromatogramme d'une portion du gène canal sodium; Les pics verts représentent l'adénine (A), rouges la thymine (T), bleus la cytosine (C) et noirs la guanine (G) ; le N représente la présence de deux pics à la même position ; les chiffres désignent la position de la base nucléotidique sur la séquence

II.2.5.4.2. Polymorphisme et diversité génétique

Le nombre d'haplotypes (h) distincts par population, le nombre de sites polymorphes (S), la diversité haplotypique (DH), la diversité nucléotidique (π) et les nombres de mutations synonymes (Syn) et non synonymes (Nsyn) ont été évalués à l'aide du logiciel DNAsp v6.10.01 (Rozas *et al.*, 2017). Ces indices sont utilisés pour estimer l'histoire démographique d'une population. Ainsi :

- un faible DH et un faible π , signalent un goulot d'étranglement ("bottleneck") démographique sévère et prolongé ;
- une forte DH et un fort π , signalent une population stable avec grande taille effective ;
- une forte DH et un faible π , signalent une croissance de population rapide à partir d'une population ancestrale à faible effectif et où le temps n'a pas été suffisant pour retrouver une forte diversité entre haplotypes ("bottleneck" éphémère dans une large population ancestrale) ;

- une faible DH et un fort π , signalent un crash rapide ayant été à l'origine de l'élimination d'un grand nombre d'haplotypes sans nécessairement affecter la diversité nucléotidique.

Les tests D de Tajima (Tajima, 1989), et Fs de Fu (Fu, 1997) ont été également évalués à l'aide du logiciel DNAsp v6.10.01. Ces tests permettent d'estimer la stabilité démographique d'une population. Si Fs est fortement négatif et significatif, cela suggère que la population est en expansion.

II.2.5.4.3. Analyse Phylogénétiques

Les distances génétiques entre les haplotypes ont été estimées grâce au logiciel MEGA v7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016). Ce logiciel a également servi à la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Cho, 2012). Les intervalles de confiance des associations entre haplotypes ont été calculées en utilisant la méthode « bootstraps » avec 500 répliques (Felsenstein, 1985). Les logiciels d'estimation des cladogrammes TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000) et tcsBU (Clement *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2015) ont permis d'élaborer le réseau d'haplotypes.

II.2.5.4.4. Calcul et analyse des fréquences génotypiques et alléliques pour la mutation F1534C

La fréquence génotypique a été calculée en faisant le rapport du nombre d'individus présentant le génotype concerné (sensible : SS, résistant : RR et hétérozygote : RS) sur le nombre total d'échantillons testés, exprimée en pourcentage.

La fréquence allélique a été calculée en utilisant la formule : $\frac{2(X)+1(Y)}{2N}$ où X est le nombre d'individus de génotype homozygote pour l'allèle concerné, Y le nombre d'individus hétérozygotes et N le nombre total d'individus examinés.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Niveau de sensibilité aux insecticides des populations naturelles d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* du Cameroun

III.1.1.1. Bio-essais larvaires

III.1.1.1.1. *Aedes albopictus* vis-à-vis du téméphos

Au total, six échantillons d'*A. albopictus* ont été utilisés pour les tests larvaires au téméphos. Il s'agit des échantillons de Bertoua, Douala, Bafoussam, Tibati, Bafang et Edéa. Ces échantillons ont présenté des niveaux de sensibilité au téméphos similaires à celui de la souche de référence VCRU (Tableau VII). Les valeurs de CL₅₀ et CL₉₅ ont varié respectivement de 0,0028 mg/L (Edéa) à 0,0079 mg/L (Douala) et de 0,0055 mg/L (Tibati) à 0,012 mg/L (Douala). Les valeurs RR₅₀ et RR₉₅ (Résistance Ratio calculée par rapport à la souche sensible VCRU) ont varié respectivement de 0,91 (Edéa) à 2,52 (Douala) et de 0,80 (Tibati) à 1,75 (Douala). Les résultats ci-dessus indiquent que tous les échantillons d'*A. albopictus* testés, présentent une sensibilité au téméphos.

III.1.1.1.2. *Aedes aegypti* vis-à-vis du téméphos

Compte tenu de la faible taille des échantillons, seulement trois échantillons d'*A. aegypti* ont été testés au téméphos. Il s'agit des échantillons d'Edéa, Yaoundé et de Douala. Les résultats de ces tests larvaires sont présentés dans le tableau VII. Les valeurs de CL₅₀ des échantillons ont varié respectivement de 0,0015 mg/L (Yaoundé) à 0,0039 mg/L (Douala). Tandis que les valeurs de CL₉₅ ont varié de 0,0034 mg/L (Yaoundé) à 0,0078 mg/L (Douala). Les valeurs RR₅₀ et RR₉₅ se sont étalées respectivement de 0,59 (Yaoundé) à 1,47 (Douala) et de 0,74 (Yaoundé) à 1,68 (Douala). Ces résultats indiquent que tous les échantillons d'*A. aegypti* sont sensibles au téméphos.

Tableau VII : Sensibilité des larves d'*A. albopictus* et d'*A. aegypti* vis-à-vis du téméphos

Localité	N	CL ₉₅ (mg/L) (95% IC)	RR ₉₅	CL ₅₀ (mg/L) (95% IC)	RR ₅₀
<i>Aedes albopictus</i>					
VCRU	574	0,0068 (0,00512 – 0,0209)	-	0,0031 (0,00128 – 0,00413)	-
Bertoua	439	0,0073 (0,00695 – 0,00789)	1,07	0,0053 (0,00512 – 0,00547)	1,68
Douala	432	0,0120 (0,01007– 0,0173)	1,75	0,0079 (0,00738 - 0,00921)	2,52
Bafoussam	508	0,0077 (0,0071 – 0,00856)	1,12	0,0043 (0,00421 – 0,00461)	1,38
Tibati	547	0,0055 (0,00440 – 0,00915)	0,80	0,0030 (0,00238 – 0,00360)	0,95
Bafang	523	0,0056 (0,00520 – 0,00641)	0,83	0,0031 (0,00291 – 0,00330)	0,98
Edéa	549	0,0066 (0,00589 – 0,00775)	0,97	0,0028 (0,00254 – 0,00320)	0,91
<i>Aedes aegypti</i>					
NO	531	0,0046 (0,0042 – 0,0051)	-	0,0026 (0,0025 – 0,0028)	-
Edéa	531	0,0046 (0,0036 – 0,0094)	1,00	0,0021 (0,0007 – 0,0028)	0,80
Douala	483	0,0078 (0,0069 – 0,0092)	1,68	0,0039 (0,0037 – 0, 0042)	1,47
Yaoundé	537	0,0034 (0,00258– 0,0069)	0,74	0,0015 (0,0009 – 0,0020)	0,59

N : Nombre de moustiques testés ; LC₅₀ et LC₉₅ : Concentrations létales pour 50 et 95% de moustiques testés, exprimées en mg/litre ; 95% IC : Intervalle de Confiance à 95% ; RR : "Resistance Ratio" ; NO : "New Orleans" ; VCRU : "Vector Control of Research Unit".

III.1.1.1.3. *Aedes albopictus* vis-à-vis du *Bti*

Seuls les échantillons d'*A. albopictus* ont été utilisés pour les tests larvaires au *Bti*. Quatre localités, au total ont été testés : Bertoua, Bafoussam, Tibati et Edéa comme présentés dans le tableau VIII. Les valeurs CL₅₀ et CL₉₅ des échantillons d'*A. albopictus* ont varié respectivement de 0,0088 mg/L (Edéa) à 0,0298 mg/L (Tibati) et de 0,0322 mg/L (Edéa) à 0,150 mg/L (Bafoussam). Les valeurs de RR₅₀ et RR₉₅ ont varié respectivement de 0,81 (Edéa) à 2,75 (Tibati) et de 0,78 (Edéa) à 3,67 (Bafoussam). Ces résultats indiquent que tous les échantillons d'*A. albopictus* présentent une sensibilité au *Bti*.

Tableau VIII : Sensibilité des larves d'*A. albopictus* vis-à-vis du *Bti*

Localité	N	CL ₉₅ (mg/L) (95% IC)	RR ₉₅	CL ₅₀ (mg/L) (95% IC)	RR ₅₀
VCRU	574	0,0408 (0,0332 – 0,0546)	-	0,0108 (0,0096 – 0,0120)	-
Bertoua	548	0,0570 (0,0445 – 0,0893)	1,39	0,0169 (0,0139 – 0,0193)	1,56
Bafoussam	556	0,150 (0,0827– 0,953)	3,67	0,0272 (0,0208 – 0,0342)	2,51
Tibati	547	0,0907 (0,0648 – 0,163)	2,22	0,0298 (0,0263 – 0,0359)	2,75
Edéa	526	0,0322 (0,0261 – 0,0426)	0,78	0,0088 (0,00302– 0,0132)	0,81

N : Nombre de moustiques testés ; LC₅₀ et LC₉₅ : Concentrations létales pour 50 et 95% de moustiques testés, exprimées en mg/litre ; 95% IC : Intervalle de Confiance à 95% ; RR : "Resistance Ratio" ; VCRU : "Vector Control of Research Unit".

III.1.1.2. Tests de sensibilité sur les adultes

Les tests effectués avec les souches de laboratoire (NO, Bénin et VCRU) ont confirmé que ces souches étaient sensibles à tous les insecticides utilisés à l'exception : du DDT et du propoxur (avec 77,59 et 76,56% de mortalité respective) pour la souche NO ; de la perméthrine et du DDT (avec 86,18 et 80,68% de mortalité respective) pour la souche VCRU. Le taux de mortalité chez les contrôles était < 5%.

III.1.1.2.1. Niveaux de sensibilité aux insecticides chez *A. albopictus*

Au total, les échantillons d'*A. albopictus* provenant de 14 localités ont été testés. Les analyses ont montré que 13 de ces 14 échantillons ont un niveau de résistance élevé au DDT, avec des taux de mortalité allant de 12,42 % à Bafang à 74,05 % à Kumba. La résistance a également été observée aux pyréthrinoïdes, notamment à la perméthrine (type I), pour laquelle neuf échantillons sur les 13 tests se sont révélés résistants avec des taux de mortalité variant de 34,16% à Bafang à 85,23% à Kribi, une résistance probable ayant été constatée dans les échantillons de quatre localités (Bamenda, Mbalmayo, Kumba et Melong). Une analyse similaire avec la deltaméthrine (type II) a révélé que neuf échantillons sur les 14 testés se sont montrés sensibles, et une résistance a été suspectée dans les cinq autres échantillons avec des taux de mortalité allant de 90,99% à Tibati à 95% à Bafang. Une résistance aux carbamates a également été reportée, notamment au propoxur, dans les échantillons de deux localités (Edéa et de Bamenda), avec des taux de mortalité de 66,94 % et 88,99 %, respectivement. Cependant, une résistance probable a été observée aux carbamates propoxur dans les échantillons de cinq localités (Buea, Bafoussam, Mbalmayo, Bertoua et Tibati) avec des taux de mortalité variant entre 94% et 97% tandis que cinq autres échantillons se sont révélés sensibles (Tableau IX). Parmi les trois échantillons testés au bendiocarbe, ceux de Foumban et de Kumba se sont montrés totalement sensibles tandis qu'une perte de sensibilité a été signalée dans l'échantillon de Bertoua. Tous les échantillons testés au fénitrothion ont montré une sensibilité totale.

Les tests avec différentes doses de perméthrine (0,25, 0,5 et 0,75%) ont montré que le taux de mortalité augmentait avec la dose de perméthrine utilisée. L'échantillon de Bafang, a montré une augmentation drastique du taux de mortalité [de 59,93 à 95,26% ($P < 0,005$)], lorsque la dose de perméthrine utilisée est passée de 0,25 (1x) à 0,5% (2x). Ce taux de mortalité n'a atteint 100% qu'à la dose de 0,75% (3x). Une analyse similaire avec l'échantillon d'Edéa a montré une augmentation significative du taux de mortalité (de 73,26% avec 1x à 100% avec 2x) ($P < 0,010$).

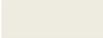
Tableau IX : Niveau de sensibilité des différents échantillons d'*Aedes albopictus* exposés aux insecticides

Pourcentage de mortalité ± erreur standard									
Localités	Deltaméthrine 0,05%	Perméthrine 0,25%	PBO 4%+ perméthrine	Propoxur 0,1%	Bendiocarbe 0,1%	Fénitrothion 1%	DDT 4%	PBO+DDT	DEM 8%+DDT
Edéa	95±2,04	–	–	66,94±8,53	–	100±0	17,05±8,93	–	–
Buea	98,75±1,25	76,68±5,96	79,76±8,91	97,36±2,63	–	95,22±2,21	47,34±3,71	16,08±2,3	–
Bafang	95,72±2,47	34,16±8,93	94,58±2,39	98,80±1,19	–	100±0	12,42±4,24	62,28±6,59	–
Bafoussam	94,27±1,43	42,67±4,19	–	96,06±2,51	–	–	36,29±3,22	–	–
Bamenda	100±0	94,77±1,16	–	88,99±1,56	–	100±0	44,19±7,53	–	–
Ebolowa	93,84±0,98	70,23±8,55	–	–	–	100±0	43,04±8,48	–	–
Sangmélina	100±0	72,45±6,76	–	–	–	–	35,70±2,49	–	–
Mbalmayo	98,71±1,08	90,45±3,75	–	93,23±5,41	–	100±0	64,49±5,11	–	–
Bertoua	98,75±1,25	47,62±2,71	–	93,59±2,81	94,06±1,19	100±0	32,61±5,47	–	–
Kribi	100±0	85,23±4,48	–	98,30±1,51	–	100±0	37,18±6,45	–	–
Kumba	100±0	90,10±3,36	100±0	100±0	100±0	100±0	74,05±2,29	55,52±10,20	85,14±1,93
Tibati	90,99±3,23	76,78±8,79	–	97,18±1,27	–	100±0	48,33±12,44	–	56,25±2,13
Foumban	100±0	74,70±8,27	–	100±0	100±0	100±0	59,36±7,93	–	85,85±7,63
Melong	100±0	93,03±1,37	–	100±0	–	100±0	90,03±0,95	–	–

 Résistance confirmée

 Résistance probable

 Sensibilité

 Tests avec synergiste (PBO ou DEM)

III.1.1.2.2. Niveaux de sensibilité aux insecticides chez *A. aegypti*

Les bio-essais des adultes ont été réalisés avec 10 échantillons d'*A. aegypti* collectés au Cameroun. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau X. Les analyses ont montré que quatre des 10 échantillons testés, étaient fortement résistants au DDT avec un taux de mortalité variant entre 16,80% à Douala et 77,27% à Ngaoundéré. Par contre les six autres échantillons se sont révélés sensibles (Meiganga, Banyo et Maroua) ou ont présenté une résistance probable (Tibati, Melong et Parc national de la Bénoué) au DDT avec les taux de mortalité allant de 92,32% à Tibati à 100% à Maroua. Tous les échantillons testés ont montré un bon niveau de sensibilité aux deux pyréthrinoïdes utilisés, perméthrine (type I) et deltaméthrine (type II). Cependant certains échantillons comme ceux de Douala et Edéa ont révélé une forte résistance à la perméthrine avec 2,56 et 76,32 % de mortalité respectivement. Les analyses avec la deltaméthrine ont révélé une sensibilité totale chez les échantillons de six localités (Limbé, Ngaoundéré, Maroua, Parc national de la Bénoué, Tibati, et Meiganga). La résistance a été également observée aux carbamates notamment au propoxur, avec des pourcentages de mortalité compris entre 60,82% à Edéa et 87,71% à Meiganga. Toutefois, les échantillons des localités de : Ngaoundéré, Parc national de la Bénoué, Tibati, et Melong ont présenté un niveau de résistance modéré avec des taux de mortalité compris entre 95,65% à Tibati et 97,33% à Melong. Un seul échantillon (Douala) s'est révélé totalement sensible au propoxur. Concernant le bendiocarbe, le seul échantillon testé provenant de la localité de Limbé s'est révélé résistant avec un taux de mortalité de 82,95%. Les quatre échantillons testés au fénitrothion se sont révélés totalement sensibles.

Tableau X : Niveau de sensibilité des différents échantillons d'*Aedes aegypti* exposés aux insecticides

Localités	Pourcentage de mortalité ± erreur standard						
	Deltaméthrine	Perméthrine	PBO 4%+ Perméthrine	Propoxur	Bendiocarbe	Fénitrothion	DDT
Douala	73,23±2,42	2,56±1,48	14,28 ± 5,8%	100±0	–	100±0	16,80±1,81
Edéa	92,53±2,77	76,32±6,40	–	60,82±11,12	–	–	41,59±3,57
Limbé	100±0	100±0	–	86,22±3,39	82,95±5,94	100±0	52,99±6,51
Banyo	93,21±2,28	100±0	–	–	–	–	98,75±1,25
Ngaoundéré	98,75±1,25	100±0	–	95,78±0,42	–	–	77,27±7,53
Maroua	100±0	100±0	–	–	–	–	100±0
Parc Bénoué	100±0	100±0	–	96,63±2,10	–	–	95,81±1,54
Tibati	100±0	100±0	–	95,65±1,77	–	–	92,32±4,55
Meiganga	100±0	97,24±1,82	–	87,71±2,32	–	100±0	99,26±0,73
Melong	96,48±1,17	83,32±2,27	–	97,33±2,30	–	100±0	92,5±1,59

- Résistance confirmée
- Résistance probable
- Sensibilité
- Test avec synergiste (PBO)

III.1.2. Mécanismes de résistance métabolique impliqués dans la résistance aux insecticides chez *A. aegypti* et *A. albopictus* au Cameroun

III.1.2.1. Niveaux de sensibilité avec les synergistes

III.1.2.1.1. Niveaux de sensibilité avec les synergistes chez *Aedes albopictus*

Pour évaluer si la résistance observée à certains insecticides dans les échantillons était d'origine métabolique à cytochrome P450 et/ou au GsT, une préexposition aux synergistes PBO ou DEM a été effectuée. Les résultats ont montré qu'avec une préexposition au PBO ou au DEM, on a une augmentation du taux de la mortalité qui peut se traduire par un rétablissement total ou partiel de la sensibilité à l'insecticide. Pour les moustiques de la localité de Kumba, on a observé une restauration totale de la sensibilité à la perméthrine après une préexposition au PBO, ainsi le taux de mortalité est passé de $90,10 \pm 3,36$ % pour une exposition à la perméthrine seule à $100,0 \pm 0,0$ % de mortalité avec une préexposition au PBO, ($P > 0,25$). Tandis que pour les moustiques de la localité de Buea, le regain de la sensibilité n'a été que partiel ($76,68 \pm 5,96$ % de mortalité pour la perméthrine seule et $79,76 \pm 8,91$ % de mortalité pour le PBO + perméthrine, $P < 0,75$). Il en est de même pour les moustiques de la localité de Bafang ($34,16 \pm 8,93$ % de mortalité pour perméthrine seule contre $94,58 \pm 2,39$ % de mortalité après préexposition au PBO, $P < 0,05$). Un rétablissement partiel de la sensibilité au DDT a également été reporté dans l'échantillon de Bafang après une préexposition au PBO ($12,4 \pm 4,24$ % de mortalité au DDT contre $62,28 \pm 6,59$ % de mortalité après préexposition au PBO, $P < 0,005$). Une analyse similaire avec le DEM a également induit une restauration partielle de la sensibilité au DDT dans l'échantillon de Foumban ($59,36 \pm 7,93$ % pour une exposition au DDT seul contre $85,85 \pm 7,63$ % de mortalité après préexposition au DEM, $P < 0,005$).

III.1.2.1.2. Niveau de sensibilité avec les synergistes chez *Aedes aegypti*

Concernant les tests avec les synergistes, nous avons noté une restauration partielle bien que faible de la mortalité pour uniquement les échantillons en provenance de Douala préexposés au PBO puis, exposés à la perméthrine. Ainsi le taux de mortalité est passé de $2,56 \pm 1,48$ % perméthrine sans PBO à $14,28 \pm 5,8$ % pour PBO + perméthrine ($P < 0,005$).

III.1.2.2. Expression des gènes impliqués dans la résistance métabolique chez les *Aedes* au Cameroun

III.1.2.2.1. Expression des gènes impliqués dans la résistance métabolique chez *A. aegypti*

Au total, l'expression de cinq gènes a été évaluée dans deux échantillons (Douala et Meiganga) d'*A. aegypti* du Cameroun. Parmi ces gènes, quatre appartiennent à la famille des cytochromes P450. Il s'agit des *CYP9M6F88/87*, *CYP9J28a*, *CYP9J10* et *CYP9J32*. De ces cinq gènes étudiés, aucun n'a montré un niveau d'expression différent de celui observé chez la souche sensible de laboratoire SBE (Figures 12 et 13).

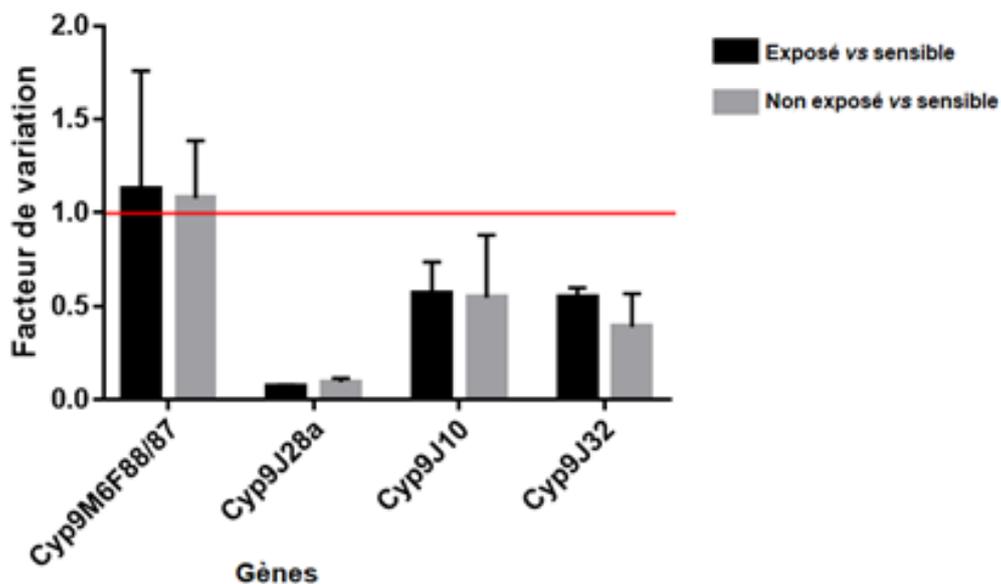


Figure 12 : Expression des gènes *CYP9M6F88/87*, *CYP9J28a*, *CYP9J10* et *CYP9J32* au sein des échantillons d'*A. aegypti* provenant de Meiganga

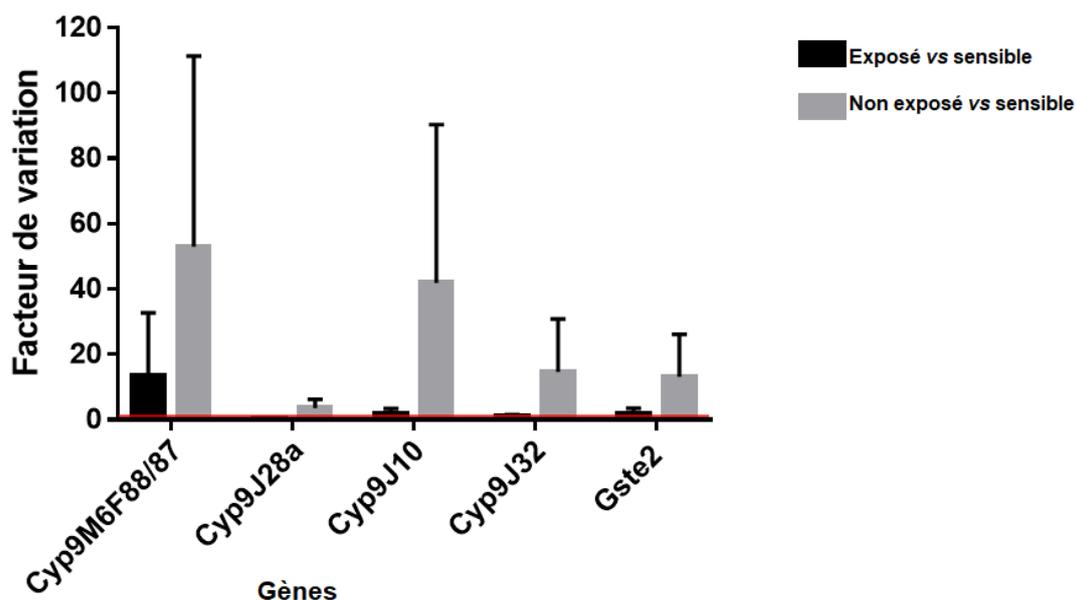


Figure 13 : Expression des gènes *CYP9M6F88/87*, *CYP9J28a*, *CYP9J10*, *CYP9J32* et *GSTe2* au sein des échantillons d'*A. aegypti* provenant de Douala

III.1.2.2.2. Expression des gènes impliqués dans la résistance métabolique chez *A. albopictus*

CYP6P12 est un gène connu comme impliqué dans la résistance aux pyréthrinoides chez *A. albopictus*. Son niveau d'expression, au sein de nos échantillons de moustiques de terrain résistants et non exposés à la perméthrine a été comparé avec celui de la souche sensible de laboratoire VCRU. Il s'est agi des spécimens provenant de Bertoua et Bafang. L'analyse des résultats de qPCR a montré que le gène *CYP6P12* était significativement surexprimé dans les deux échantillons étudiés aussi bien chez les résistants que les non exposés comparé à la souche sensible de laboratoire VCRU (Figure 14). Le niveau d'expression de ce gène chez les moustiques survivants à la perméthrine a été élevé dans les deux localités étudiées, Bafang (FC = $2,02 \pm 0,16$, P = 0,001) et Bertoua (FC = $3,52 \pm 1,96$, P = 0,03) respectivement. Un profil similaire a été observé chez les moustiques non exposés provenant de Bafang (FC = $5,70 \pm 3,51$, P = 0,02) et de Bertoua (FC = $3,63 \pm 0,89$, P = 0,0007) respectivement. Ces résultats confirment que ce gène joue un rôle dans la résistance observée. Cependant, le niveau d'expression n'a pas été significativement différent entre les moustiques exposés et les non exposés montrant que ce gène n'est pas induit par l'exposition à l'insecticide.

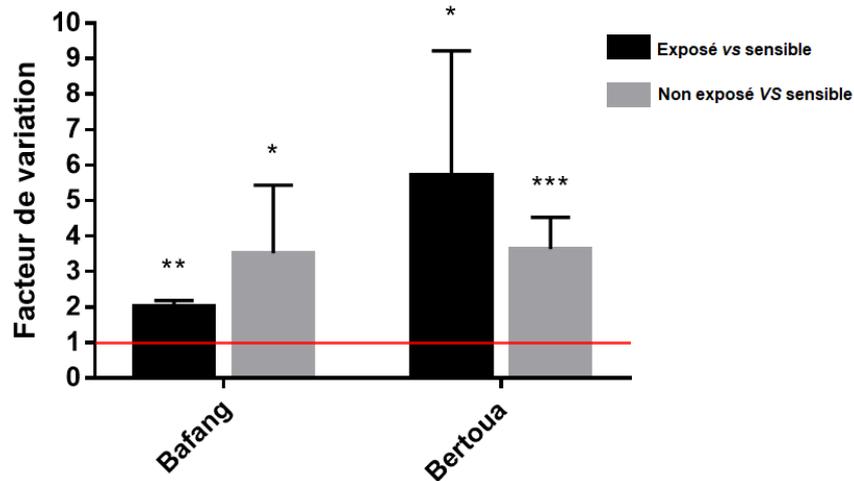


Figure 14 : Expression du gène *CYP6P12* au sein des échantillons d'*A. albopictus* provenant de Bafang et de Bertoua

III.1.3. Mécanismes de résistance impliqués dans la résistance aux insecticides par modification de cible chez *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* au Cameroun

III.1.3.1. Génotypage d'un fragment du gène canal sodium couvrant la mutation F1534C chez *Aedes aegypti* et chez *A. albopictus*

Après analyse de 420 spécimens d'*A. albopictus* provenant de 14 localités du Cameroun pour la recherche de la mutation F1534C. Aucun de ces spécimens n'a présenté cette mutation. Ainsi ces moustiques se sont révélés, être 100% homozygotes sensibles pour cette mutation (100% FF1534).

Au total 331 spécimens ont été analysés pour la recherche de la mutation F1534C au sein des échantillons d'*A. aegypti* provenant de 13 localités au Cameroun. Après génotypage, 320 (96,68%) spécimens se sont révélés être homozygotes sensibles (1534 F/F), 8 (2,41%) hétérozygotes (1534 F/C) et 3 (0,91%) homozygotes résistants. Il est à noter que cette mutation n'a été détectée que dans deux localités : Douala et Edéa avec une fréquence allélique de 33,33% et de 3,33% respectivement. De manière générale, la fréquence de l'allèle résistant (C) au sein de la population d'*A. aegypti* au Cameroun est égale à 2,11 % et celle de l'allèle sensible (F) est égale à 97,89% (Tableau XI). Une analyse des chromatogrammes de certaines de nos séquences a révélé qu'au niveau de la position 1534 du domaine III, du canal sodium, on avait la thymine T qui avait muté pour donner la guanine G (dans le cas des spécimens homozygotes résistants) tandis que pour d'autres séquences on avait plutôt un double pic de thymine et

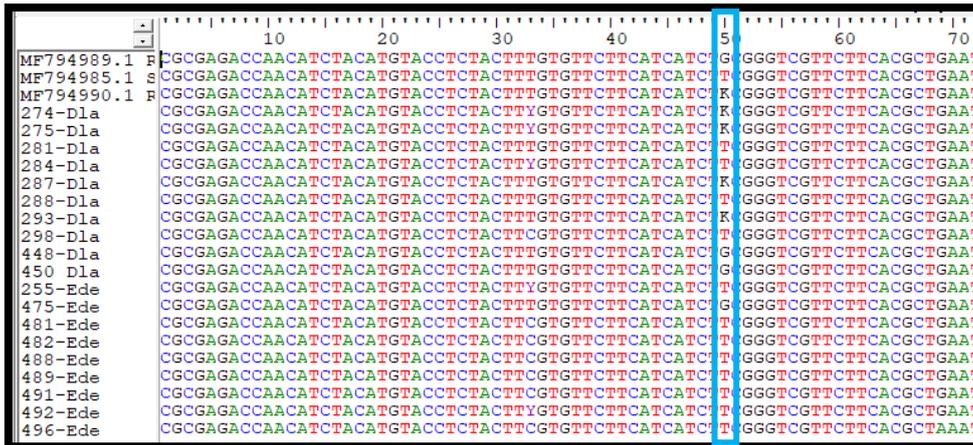
guanine (pour les hétérozygotes) (Figure 15a). La figure 15b présente des traces chromatographiques montrant les trois génotypes à la position codante 1534.

Tableau XI : Effectifs des génotypes et fréquence des allèles au locus F1534C chez *Aedes aegypti*.

Location	Différents génotypes F1534				Fréquences alléliques	
	FF	FC	CC	FF+FC+CC	% F	% C
Parc Bénoué	24	0	0	24	100	0
Maroua	27	0	0	27	100	0
Garoua	30	0	0	30	100	0
Mbé	17	0	0	17	100	0
Ngaoundéré	25	0	0	25	100	0
Banyo	29	0	0	29	100	0
Tibati	26	0	0	26	100	0
Meiganga	24	0	0	24	100	0
Edéa	29	0	1	30	96,67	3,33
Limbé	27	0	0	27	100	0
Douala	8	8	2	18	66,67	33,33
Melong	24	0	0	24	100	0
Yaoundé	30	0	0	30	100	0
Total	320	8	3	331	97,89	2,11

F : phénylalanine; C : cystéine

a



b

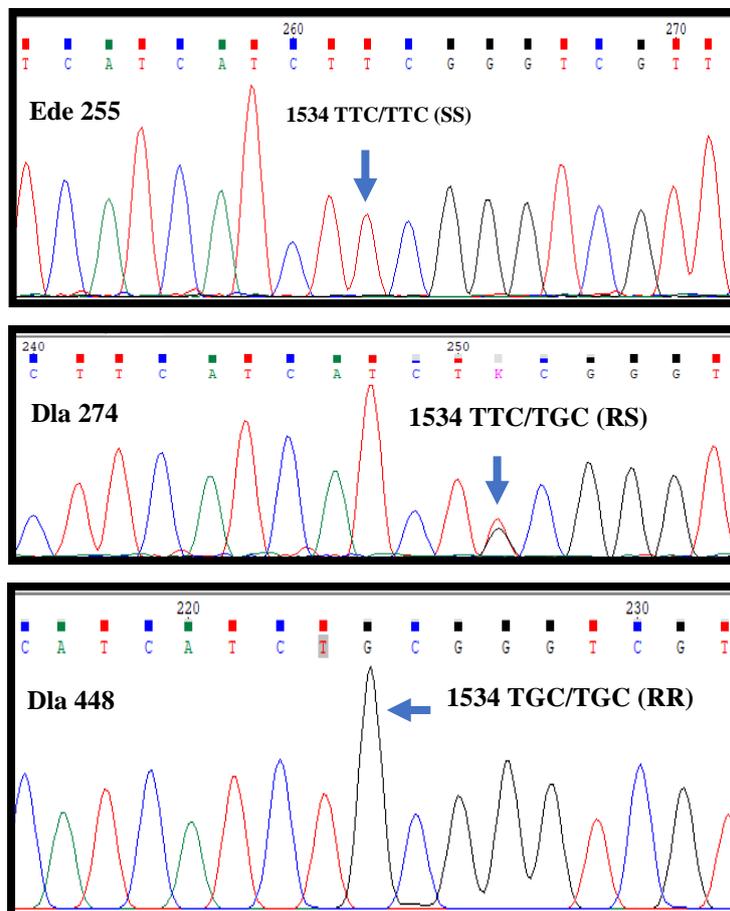


Figure 15 : Séquençage d'une portion du gène du canal sodium voltage dépendant couvrant la mutation F1534C. a) Alignement des séquences du gène du canal sodium voltage dépendant couvrant la mutation ponctuelle F1534C chez les moustiques adultes (F0), b) Traces chromatographiques montrant les trois génotypes à la position codante 1534.

III.1.3.2. Diversité génétique au niveau du domaine III du canal sodium voltage dépendant chez *A. aegypti*

Sur la totalité des 122 séquences obtenues, 25 sites se sont avérés variables et 38 (46 en tenant compte les insertions et les délétions) haplotypes ont été identifiés pour ce gène. Les indices de diversité haplotypique (HD) et nucléotidique (π) ont été estimés à 0,879 et 0,01 (Tableau XII). Quatre haplotypes H1 (15,98%), H9 (13,93%), H2 (9,83%) et H3 (9,42%) sont majoritaires et retrouvés dans la plupart des localités (Figure 16a). Sur les 46 haplotypes, 23 sont des singletons (présent chez un seul individu) et un seul s'est révélé être résistant (H36) pour la mutation F1534C (Figure 16b). Cette observation est confirmée par l'analyse de l'arbre phylogénétique par la méthode de vraisemblance à partir des différents haplotypes obtenus qui montre la présence de cet allèle résistant 1534C au sein de certains échantillons d'*A. aegypti* du Cameroun (Figures 16a et 16c). Cet haplotype résistant a été retrouvé seulement dans deux localités sur les 13 analysées. Il s'agit des localités de Douala et Edéa où les proportions respectives sont de 80% et 20%. Les analyses ont montré la présence de plusieurs mutations au sein de ce gène mais elles sont pour la plupart synonyme (18) c'est-à-dire n'entraînant pas de changement d'acide aminé.

De manière globale, les valeurs de D et de Fs ($D = -1,479$, $F_s = -33,498$) se sont révélées négatives avec F_s statistiquement significatif. Les valeurs négatives de ces indices indiquent un très rare polymorphisme au niveau de ce gène et une introduction récente de ce gène au sein des échantillons étudiés.

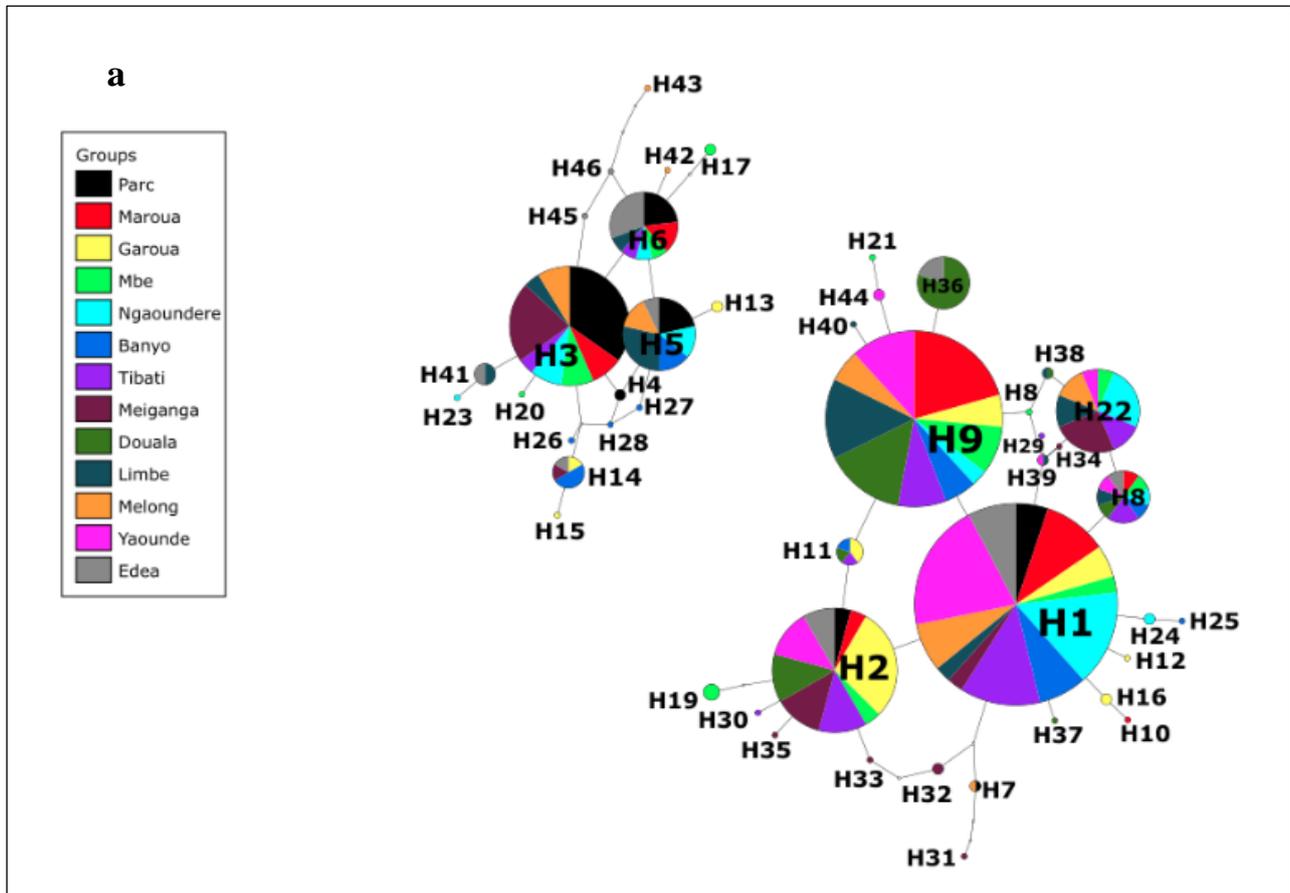
Tableau XII : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène VGSC chez *Aedes aegypti* du Cameroun

Localités	2N	S	Syn	Nsyn	π	H	Hd	D	Fu Fs
Parc Bénoué	20	5	4	1	0,006	6	0,726	-0,591	-1,874
Maroua	18	5	4	1	0,006	5	0,745	-0,703	-0,945
Garoua	20	9	7	2	0,011	9	0,863	-0,592	-3,113*
Mbé	18	9	8	1	0,014	9	0,922	0,023	-2,581*
Ngaoundéré	20	6	6	0	0,007	6	0,763	-0,479	-1,195
Banyo	16	7	5	2	0,012	9	0,908	0,318	-3,584*
Tibati	20	5	4	1	0,008	8	0,868	0,379	-3,062*
Meiganga	20	12	11	1	0,013	9	0,847	-1,020	-2,544*
Douala	20	6	4	2	0,008	7	0,784	-0,122	-1,850
Limbé	20	5	4	1	0,009	8	0,853	0,836	-2,590*
Melong	14	7	7	0	0,011	6	0,813	-0,097	-0,787
Yaoundé	20	5	4	1	0,006	7	0,800	-0,283	-2,653*
Edéa	18	8	6	2	0,009	9	0,895	-0,740	-4,088*
Total	244	25	18	8	0,010	38	0,879	-1,479	33,498***

2N, Nombre de séquences analysées ; D, indice de Tajima; Fu Fs, indice de Fu ; H, Nombre d'haplotypes ; Hd, diversité haplotypique ; π , diversité nucléotidique ; S, Nombre de sites polymorphes ; Syn, mutation synonyme ; Nsyn, mutation non synonyme.

Les figures 16a, 16b et 16c présentent les réseaux d'haplotypes qui illustrent les relations généalogiques entre les haplotypes du gène étudié retrouvés au sein des échantillons

d'*A. aegypti* dans les 13 localités. Elles indiquent que la plupart des haplotypes sont séparés les uns des autres pas un seul pas mutationnel, et dériveraient de deux ancêtres communs, venant de Parc de la Bénoué.



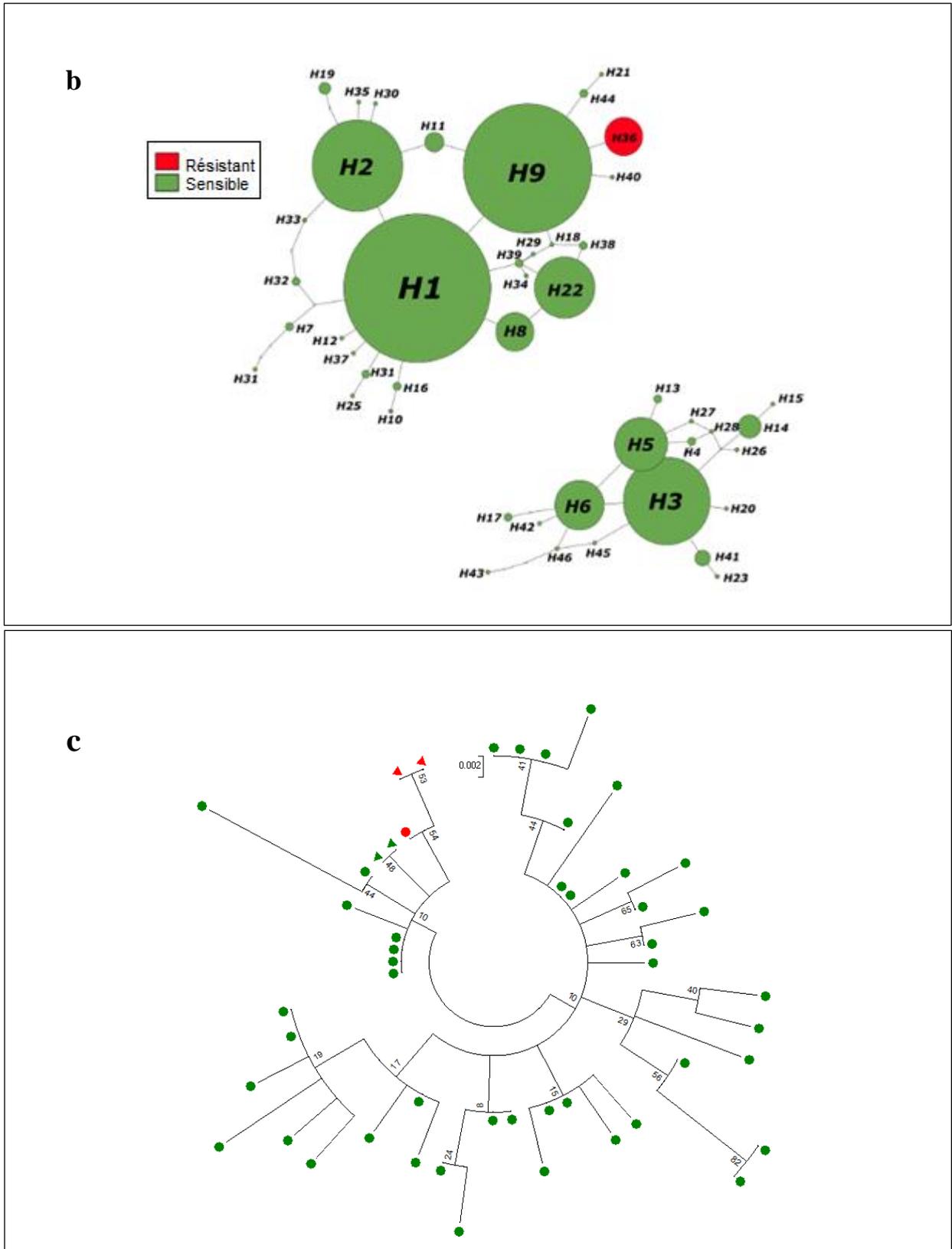


Figure 16 : Diversité et polymorphisme génétique au sein du canal sodium voltage dépendant couvrant la mutation F1534C chez *Aedes aegypti*. a) Réseau d'haplotypes des séquences en

tenant compte des différents échantillons ; b) Réseau d'haplotypes des séquences tenant compte du statut de résistance aux insecticides ; c) Arbre phylogénétique des séquences d'ADN des CSVG (fragment) par maximum de probabilité avec le modèle de Kimura

III.2. Discussion

Cette étude avait pour but d'évaluer le profil de résistance aux insecticides des populations naturelles d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun et d'explorer de potentiels mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance de ces populations. Les analyses larvaires ont révélé que tous les échantillons testés au téméphos et/ou au *Bti* étaient totalement sensibles pour ces deux larvicides. Ces observations sont similaires à celles reportées par le passé dans plusieurs pays d'Afrique centrale notamment le Cameroun (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011), la RCA (Ngoagouni *et al.*, 2016), la République du Congo (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2020b). Cependant, la résistance des *Aedes* au téméphos a été déjà reportée dans d'autres pays du monde à l'instar du Laos (Marcombe *et al.*, 2019), Sri Lanka (Abeyrathna *et al.*, 2019), Brésil (Valle *et al.*, 2019), Thaïlande (Chaiphongpachara et Moolrat, 2017), Malaisie (Ishak *et al.*, 2015). Quant au *Bti*, les données sur la résistance des populations de vecteurs à ce larvicide sont très rares, hormis celle observée chez une population de *Culex pipens* aux USA (Paul *et al.*, 2005). La sensibilité des échantillons observée aux deux larvicides testés, peut s'expliquer par le fait que le téméphos et le *Bti* n'ont jamais été utilisés dans les programmes de lutte antivectorielle au Cameroun. En effet la sélection de la résistance à un produit serait le résultat d'une utilisation extensive et à long terme de ce produit.

Les deux espèces, *A. aegypti* et *A. albopictus* se sont révélées résistantes au DDT avec un niveau de résistance très élevé chez les échantillons d'*A. albopictus*. En effet, des 14 échantillons d'*A. albopictus* testés, aucun ne s'est révélé sensible au DDT tandis que pour *A. aegypti*, certains échantillons se sont révélés totalement sensibles à l'instar des échantillons de Maroua et Meiganga. Cette sensibilité totale observée dans certains échantillons d'*A. aegypti* montre que ce composé peut être encore efficace pour contrôler *A. aegypti* dans certaines localités du Cameroun. Tout de même, il faut relever que la perte de sensibilité des populations d'*Aedes* au DDT avait été déjà reportée au Cameroun dans les années 1970 (Mouchet *et al.*, 1972), ce qui suggère que cette résistance pourrait résulter d'une pression de sélection continue sur les populations de vecteurs comme suggéré précédemment (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011). Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans d'autres pays d'Afrique centrale comme la RCA (Ngoagouni *et al.*, 2016), République du Congo (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2020b) et d'autres régions du monde notamment l'Inde (Das et Dutta, 2014), la Malaisie (Ishak *et al.*, 2015), et les USA (Marcombe *et al.*, 2014).

Le profil de résistance aux pyréthrinoïdes s'est montré variable d'une espèce à une autre d'une part et d'un insecticide à un autre d'autre part. Les échantillons d'*A. aegypti* ont montré une très grande sensibilité vis-à-vis de la perméthrine (pyréthrinoïde de type I), tandis que les

échantillons d'*A. albopictus* se sont révélés être fortement résistants. Une perte de sensibilité à la perméthrine a déjà été reportée au Cameroun pour les échantillons d'*A. albopictus* (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017). Aucune résistance n'a été observée à la deltaméthrine (pyréthrianoïde de type II), pour les échantillons d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* testés. Cependant une perte de sensibilité a été observée dans cinq échantillons d'*A. albopictus*. La différence observée entre les deux pyréthrianoïdes testés, pourrait être due au fait que la dose de deltaméthrine utilisée dans cette étude (0,05%) est supérieure à celle recommandée pour les *Aedes* (0,03%). En effet nous avons observé qu'en augmentant la dose de perméthrine utilisée vers 0,75% qui est la dose diagnostique pour les anophèles (trois fois celle des *Aedes*), on avait une sensibilité totale à la perméthrine. Cette observation montre que, lorsque la dose de perméthrine 0,75% est utilisée dans une étude concernant les *Aedes*, des données peuvent être biaisées car un échantillon peut être considéré sensible à la perméthrine alors qu'il ne l'est pas pour la dose 0,25% qui est en effet la dose recommandée par l'OMS pour les *Aedes*.

La perte de sensibilité observée aux pyréthrianoïdes a déjà été rapportée aussi bien chez *A. aegypti* que chez *A. albopictus* (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011; Ngoagouni *et al.*, 2016; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017; Marcombe *et al.*, 2019). La sensibilité observée dans certains échantillons d'*Aedes* à la deltaméthrine et/ou à la perméthrine montre que ces insecticides peuvent encore être utilisés dans la lutte contre les vecteurs d'arbovirus dans quelques localités du Cameroun à l'instar de Maroua, Parc de la Bénoué, Meiganga, Ngaoundéré, Tibati, Bamenda, Buea, Limbé, Kumba, Sangmélina, Kribi, Mbalmayo, Bertoua, Foumban, Melong. Cette perte de sensibilité des échantillons d'*Aedes* principalement d'*A. albopictus* aux pyréthrianoïdes pourrait poser un sérieux problème dans le programme de lutte contre les vecteurs d'arbovirus au Cameroun car, cette famille d'insecticides est la principale recommandée dans la lutte contre les *Aedes* (Jirakanjanakit *et al.*, 2007; Macoris Mde *et al.*, 2014).

La perte de sensibilité au propoxur et au bendiocarbe a été observée dans certaines localités. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans d'autres études : République du Congo (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2020b), Burkina Faso (Sombié *et al.*, 2019), Malaisie (Ishak *et al.*, 2015), Pakistan (Mohsin *et al.*, 2016), Arabie Saoudite (Al Nazawi *et al.*, 2017).

Les échantillons d'*A. aegypti* provenant de la partie nord du Cameroun se sont révélés plus sensibles que ceux provenant de la partie sud. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les localités du nord sont moins industrialisées que celles du sud et donc moins soumises à la pollution qui peut être une source de pression de sélection pour les moustiques.

La source de sélection de la résistance observée au DDT, à la deltaméthrine, à la perméthrine, au propoxur et au bendiocarbe dans certains échantillons d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* reste à élucider car les traitements spécifiques vis-à-vis des *Aedes* en Afrique centrale sont très limités (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017). Comme suggéré par d'autres auteurs (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011; Ngoagouni *et al.*, 2016; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017), l'utilisation agricole ou domestique des insecticides (pulvérisation intra domiciliaire et imprégnation des moustiquaires) pourrait être la principale source de sélection de la résistance chez les *Aedes* en Afrique centrale. En effet l'utilisation des pesticides en agriculture pour protéger les cultures maraîchères pourrait favoriser la sélection de la résistance chez les moustiques par contamination des sites de reproduction et des lieux de repos.

Pour le cas particulier d'*A. albopictus*, qui a récemment envahi le Cameroun (Fontenille et Toto, 2001), on ne peut pas exclure que les moustiques aient été introduits possédant déjà les gènes de résistance comme suggéré précédemment (Kamgang Mbouhom *et al.*, 2011; Ngoagouni *et al.*, 2016). La restauration totale ou partielle de la sensibilité au DDT et/ou à la perméthrine après préexposition au synergiste PBO ou DEM suggère que les monooxygénases à cytochrome P450 et les glutathion-s-transférases joueraient un rôle important dans la résistance de certaines de ces échantillons d'*Aedes* du Cameroun. Cependant d'autres familles d'enzymes ou de mécanismes peuvent être impliqués. Ces résultats corroborent ceux des études antérieures menées dans la sous-région Afrique centrale (Ngoagouni *et al.*, 2016; Kamgang Mbouhom *et al.*, 2017) et ailleurs notamment en Malaisie où il a été démontré que les monooxygénases à cytochrome P450 particulièrement les sous familles de CYP6 et CYP9 sont associés à la résistance aux pyréthriinoïdes (Ishak *et al.*, 2016; Ishak *et al.*, 2017).

Les résultats de qPCR ont révélé que le gène *CYP6P12* était significativement surexprimé au sein des échantillons d'*A. albopictus* résistants à la perméthrine comparé à la souche sensible de laboratoire VCRU. Des observations similaires avaient été faites en Malaisie (Ishak *et al.*, 2016), montrant que ce gène est fortement associé à la résistance aux pyréthriinoïdes chez *A. albopictus*. Pour les échantillons d'*A. aegypti*, les cinq gènes étudiés (*CYP9M6F88/87*, *CYP9J28a*, *CYP9J10*, *CYP9J32* et *Gste2*) n'ont montré aucune différence dans leur niveau d'expression par rapport à la souche sensible NO. Ce résultat suggère que d'autres gènes appartenant aux familles des Cyt P450 et glutathion-s-transférases pourraient être impliqués dans la résistance de ces échantillons. Des analyses supplémentaires pourraient mieux nous éclairer sur l'implication d'autres gènes notamment les *Gste7*, *CYP6BB2*,

CYP9J26, qui ont été décrits comme impliqués dans la résistance métabolique aux pyrèthrinoïdes chez *A. aegypti* (Moyes *et al.*, 2017).

Bien qu'elle soit largement distribuée dans le monde, la mutation F1534C n'avait pas encore été décrite au Cameroun. Cette étude a révélé que cette mutation était présente dans les échantillons d'*A. aegypti* provenant de deux localités au Cameroun (Edéa, Douala). Il est à noter que la mutation F1534C avait déjà été décrite en Afrique notamment au Ghana (Kawada *et al.*, 2016) et au Burkina Faso (Sombié *et al.*, 2019). Les indices de diversité (π faible) et les résultats des tests de neutralité (F_s négatif et significatif) suggèrent une introduction récente de cette mutation au sein de la population d'*A. aegypti* du Cameroun avec pour potentiel point d'origine : Douala et une expansion progressive dans le pays. Cette hypothèse est soutenue par la présence d'un haplotype résistant unique H36. De plus, Douala étant l'un des principaux ports du Cameroun, il n'est pas exclu que la mutation F1534C ait été récemment importée. Cette hypothèse est soutenue par le fait que nos échantillons étaient génétiquement proches de ceux provenant de Thaïlande (Saingamsook *et al.*, 2017).

Faisant de plus en plus face au développement de la résistance aux adulticides, les deux larvicides téméphos et *Bti* peuvent être utilisés comme mesure alternative de lutte contre les *Aedes* au Cameroun. Le téméphos est le larvicide principal utilisé dans le contrôle des larves d'*Aedes* par traitement des récipients de stockage d'eau (George *et al.*, 2015; Marcombe *et al.*, 2018; Valle *et al.*, 2019).

**CONCLUSION,
RECOMMANDATIONS
ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse avait pour objectif d'analyser la résistance aux insecticides des populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus*, vecteurs d'arbovirus au Cameroun. Pour atteindre cet objectif, nous avons d'abord évalué le profil de résistance aux différentes classes d'insecticides de diverses populations d'*A. aegypti* et d'*A. albopictus* du Cameroun ; par la suite, nous avons recherché les mécanismes impliqués dans la résistance métabolique aux insecticides et enfin, nous avons investigué sur les mécanismes de résistances impliqués dans la résistance aux insecticides par modification de cible.

Les résultats montrent que le profil de résistance varie considérablement en fonction des insecticides, de l'espèce et des échantillons testés. De manière globale, *A. aegypti* et *A. albopictus* se sont révélées résistantes à la perméthrine 0,25%, à la deltaméthrine 0,05%, au bendiocarbe 0,1%, au propoxur 0,1% et au DDT 4%. Cependant une sensibilité totale a été observée chez tous les échantillons testés au fénitrothion (tests avec les adultes). Les tests larvaires avec le téméphos et le *Bti* ont révélé que tous les échantillons testés étaient sensibles à ces deux larvicides. Cette sensibilité totale observée d'une part au téméphos et au *Bti* pour les larves et d'autre part au fénitrothion pour les adultes suggère que, ces deux larvicides peuvent être utilisés dans la lutte ciblant les stades larvaires, tandis que le fénitrothion pourrait être utilisé dans la lutte contre les adultes. Ces résultats pourraient aider à concevoir et à mettre en place des meilleures stratégies d'interventions de lutte contre *A. aegypti* et *A. albopictus* basées sur l'utilisation des insecticides.

Les tests avec les synergistes PBO ou DEM suggèrent l'implication des monooxygénases à cytochrome P450 et des glutathion-s-s transférases dans la résistance métabolique de ces échantillons. Le gène *CYP6P12* s'est révélé être significativement surexprimé dans les échantillons provenant de Bertoua et Bafang. Cependant d'autres familles d'enzymes ou mécanismes pourraient être également impliqués dans la résistance observée dans les échantillons testés. Ce résultat est davantage renforcé par la détection de la mutation F1534C dans deux des échantillons testés (Edéa et Douala), même si la fréquence est faible suggérant une introduction récente de cette mutation au sein de la population d'*A. aegypti* du Cameroun.

La résistance aux insecticides étant un phénomène dynamique susceptible de varier avec le temps ; Il serait important de poursuivre l'évaluation du statut de la sensibilité des vecteurs d'arboviroses aux insecticides dans le temps afin de déceler tout changement. De plus la variation du profil de résistance en fonction des localités donne l'occasion de concevoir un programme national de contrôle des vecteurs d'arbovirus qui prend en compte la spécificité de

chaque localité. La distribution localisée de la mutation kdr F1534C soutient cette stratégie de contrôle spécifique à la région.

À l'issue de ces travaux nous recommandons aux pouvoirs publics la mise en place des programmes de surveillance et de contrôle des vecteurs d'arbovirus. De tels programmes devant inclure des actions visant à l'amélioration des systèmes d'adduction d'eau, à l'assainissement du milieu et à l'éducation sanitaire et en cas d'urgence épidémique une utilisation d'insecticides. L'efficacité des insecticides pouvant être limitée par l'apparition de phénomènes de résistance, il est également important de mettre sur pied des outils de surveillance et de contrôle pérenne pour gérer la résistance

En perspective nous envisageons :

- surveiller l'évolution de cette nouvelle mutation kdr détectée (F1534C) au Cameroun ;
- utiliser d'autres synergistes comme le S,S,S Tributyl phosphotrithioate (DEF) pour évaluer l'implication d'autres familles d'enzymes à la résistance ;
- utiliser des analyses transcriptomiques pour déterminer d'autres gènes impliqués dans la résistance métabolique ;
- utiliser des techniques de génotypage pour investiguer la présence d'autres mutations telles que V410L, et V1016I récemment décrites en Afrique comme impliquées dans la résistance aux insecticides ;
- séquencer des portions du gène canal sodium pour détecter des nouvelles mutations impliquées à la résistance aux insecticides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, W.**, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265-267.
- Abeyrathna, W., Fernando, H., de Silva, B.**, 2019. Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* from Sri Lanka: First report of the F1534C mutation in the country. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 7, 525-530.
- Abu Hassan, A., Yap, H.**, 2003. Mosquitoes. *Urban Pest Control a Malaysia Perspective 2nd edition*. VCRU, School of Biological Sciences, USM: Universiti Sains Malaysia Publishers, 27-42.
- Acuto, O., Tosi, M.**, 1992. Amplification enzymatique de séquences nucléotidiques par PCR. *Techniques en immunologie*.
- Akogbéto, M.C., Padonou, G.G., Gbénou, D., Irish, S., Yadouleton, A.**, 2010. Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Benin, West Africa. *Malaria journal* 9, 1.
- Al Nazawi, A.M., Aqili, J., Alzahrani, M., McCall, P.J., Weetman, D.**, 2017. Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasites and Vectors* 10, 161.
- Al Thbiani Aziz, H.D., Hassan, A.A., Satho, T., Miake, F., Salmah, M.R.C., AbuBakar, S.**, 2011. Insecticide susceptibility of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) in Makkah City, Saudi Arabia. *Asian Pacific journal of tropical disease*, 1(2), 94-99.
- Aubry, P., Gaüzère, B.**, 2016. Arboviroses tropicales. Actualités 2016. Diplôme de Médecine Tropicale des pays de l'Océan Indien, 1-16.
- Auteri, M., La Russa, F., Blanda, V., Torina, A.**, 2018. Insecticide resistance associated with kdr mutations in *Aedes albopictus*: An update on worldwide evidences. *BioMed Research International* 1-10.
- Ayres, C.F., Seixas, G., Borrego, S., Marques, C., Monteiro, I., Marques, C.S., Gouveia, B., Leal, S., Troco, A.D., Fortes, F.**, 2020. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008216.
- Bagny, L., Delatte, H., Quilici, S., Fontenille, D.**, 2009. Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *Journal of Medical Entomology* 46, 1541-1545.

- Bargielowski, I.E., Lounibos, L.P.,** 2016. Satyrization and satyrization-resistance in competitive displacements of invasive mosquito species. *Insect Science* 23, 162-174.
- Bargielowski, I.E., Lounibos, L.P., Carrasquilla, M.C.,** 2013. Evolution of resistance to satyrization through reproductive character displacement in populations of invasive dengue vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 2888-2892.
- Bariami, V., Jones, C.M., Poupardin, R., Vontas, J., Ranson, H.,** 2012. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e1692.
- Bass, C., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L.M., Williamson, M.S.,** 2004. Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Management Science* 60, 1157-1162.
- Berthet, N., Nakoune, E., Kamgang, B., Selekon, B., Descorps-Declere, S., Gessain, A., Manuguerra, J.C., Kazanji, M.,** 2014. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 14, 862-865.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O.,** 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504-507.
- Biswal, S., Reynales, H., Saez-Llorens, X., Lopez, P., Borja-Tabora, C., Kosalaraksa, P., Sirivichayakul, C., Watanaveeradej, V., Rivera, L., Espinoza, F.,** 2019. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children and adolescents. *New England Journal of Medicine* 381, 2009-2019.
- Black, B.C., Hollingworth, R.M., Ahammadsahib, K.I., Kukel, C.D., Donovan, S.,** 1994. Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 50, 115-128.
- Bobanga, T., Moyo, M., Vulu, F., Irish, S.,** 2018. First report of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Democratic Republic of Congo. *African Entomology* 26, 234-236.
- Bonilauri, P., Bellini, R., Calzolari, M., Angelini, R., Venturi, L., Fallacara, F., Cordioli, P., Angelini, P., Venturelli, C., Meriardi, G., Dottori, M.,** 2008. Chikungunya Virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerging Infectious Diseases* 14, 852-854.
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., James, A.A.,** 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology* 29, 460-468.

- Bonning, B.C., Hemingway, J.**, 1991. Identification of reduced fitness associated with an insecticide resistance gene in *Culex pipiens* by microtitre plate tests. *Medical and Veterinary Entomology* 5, 377-380.
- Borgherini, G., Poubeau, P., Jossaume, A., Gouix, A., Cotte, L., Michault, A., Arvin-Berod, C., Paganin, F.**, 2008. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clinical Infectious Diseases* 47, 469-475.
- Braks, M.A., Honório, N.A., Lourenço-De-Oliveira, R., Juliano, S.A., Lounibos, L.P.**, 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology* 40, 785-794.
- Brooke, B., Hunt, R., Matambo, T.S., Koekemoer, L., Van Wyk, P., Coetzee, M.**, 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Medical and Veterinary Entomology* 20, 294-299.
- Brooks, J.T.**, 2016. Update: interim guidance for prevention of sexual transmission of Zika virus—United States, July 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65, 323-325.
- Cabié, Strobel, a.**, 2003. The clinical expression of dengue. In *La dengue dans les départements français d'Amérique : Comment optimiser la lutte contre cette maladie ?* IRD Éditions. 167-171.
- Carnevale, P., Mouchet, J.**, 1990. Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Médecine Tropicale* 50, 391-398.
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M.D., Abadie, V., Garel, C.**, 2016. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet* 387, 2125-2132.
- Chaiphongpachara, T., Moolrat, L.**, 2017. Insecticide resistance of temephos on *Aedes aegypti* as dengue vector in Samut Songkhram, Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Public Health* 10, 1439.
- Chan, Y.C., Chan, K.L., Ho, B.C.**, 1971. *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore City. 1. Distribution and density. *Bulletin of the World Health Organization* 44, 617-627.
- Charles, J., de Barjac, H.**, 1981. Histopathologie de l'action de la δ -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves d'*Aedes aegypti* (Dip.: Culicidae). *Entomophaga* 26, 203-212.

- Chen, C., Nazni, W., Lee, H., Seleena, B., Mohd Masri, S., Chiang, Y., Sofian-Azirun, M.,** 2006. Research Note Mixed breeding of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse in four dengue endemic areas in Kuala Lumpur and Selangor, Malaysia. *Tropical Biomedicine* 23, 224-227.
- Chen, L.H., Wilson, M.E.,** 2010. Dengue and chikungunya infections in travelers. *Current Opinion in Infectious Diseases* 23, 438-444.
- Cho, A.,** 2012. Constructing phylogenetic trees using maximum likelihood. *Scripps Senior Theses*. 46.
- Christophers, S.,** 1960. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure*, 739.
- Chuaycharoensuk, T., Juntarajumnong, W., Boonyuan, W., Bangs, M.J., Akwatanakul, P., Thammapalo, S., Jirakanjanakit, N., Tanasinchayakul, S., Chareonviriyaphap, T.,** 2011. Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of Vector Ecology* 36, 204-212.
- Clark, A., Shamaan, N.,** 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22, 249-261.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.,** 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1660.
- Clements, A.,** 2000. The biology of mosquitoes volume 1: development. *Nutrition and Reproduction*, 231-234.
- Corbel, V., N'Guessan, R.,** 2013. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. In *Anopheles mosquitoes- New insights into malaria vectors*. IntechOpen, 579-635.
- Das, M., Dutta, P.,** 2014. Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam, India. *International Journal of Mosquito Research* 1, 35-41.
- Debach, P.,** 1974. Biological control by natural enemies. *Biological control by natural enemies.*, (Ed. 2) Cambridge University Press 1-40.
- Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J. S., Thiria, J., Failloux, A. B., & Fontenille, D.,** 2008. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite (Paris, France)*, 15(1), 3-13.

- Delatte, H., Desvars, A., Bouétard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., Fontenille, D.,** 2010. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10, 249-258.
- Demanou, M., Pouillot, R., Grandadam, M., Boisier, P., Kamgang, B., Hervé, J.P., Rogier, C., Rousset, D., Paupy, C.,** 2014. Evidence of dengue virus transmission and factors associated with the presence of anti-dengue virus antibodies in humans in three major towns in Cameroon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2950.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P.,** 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology* 43, 545-569.
- Diallo, M., Thonnon, J., Traore-Lamizana, M., Fontenille, D.,** 1999. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 281-286.
- Diallo, M., Ba, Y., Sall, A.A., Diop, O.M., Ndione, J.A., Mondo, M., Girault, L., Mathiot, C.,** 2003. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerging Infectious Diseases* 9, 362-367.
- Diallo, D., Sall, A.A., Buenemann, M., Chen, R., Faye, O., Diagne, C.T., Faye, O., Ba, Y., Dia, I., Watts, D.,** 2012. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1649.
- Dick, G., Kitchen, S., Haddow, A.,** 1952. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 509-520.
- Djènontin, A., Chandre, F., Dabiré, K.R., Chabi, J., N'Guessan, R., Baldet, T., Akogbéto, M., Corbel, V.,** 2010. Indoor use of plastic sheeting impregnated with carbamate combined with long-lasting insecticidal mosquito nets for the control of pyrethroid-resistant malaria vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 266-270.
- Dong, K.,** 1997. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 93-100.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C.,** 2009b. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine* 360, 2536-2543.

- Elliott, M., Janes, N.**, 1978. Synthetic pyrethroids—a new class of insecticide. *Chemical Society Reviews* 7, 473-505.
- Fagbami, A.H.**, 1979. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *Journal of Hygiene* 83, 213-219.
- Failloux, A.-B., Vazeille, M., Rodhain, F.**, 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution* 55, 653-663.
- Faye, O., Freire, C.C., Iamarino, A., de Oliveira, J.V., Diallo, M., Zanotto, P.M., Sall, A.A.**, 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2636.
- Felsenstein, J.**, 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125, 1-15.
- Ffrench-Constant, R.H., Rocheleau, T.A., Steichen, J.C., Chalmers, A.E.**, 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449-451.
- Fokam, E., Levai, L., Guzman, H., Amelia, P., Titanji, V., Tesh, R., Weaver, S.**, 2010. Silent circulation of arboviruses in Cameroon. *East African Medical Journal* 87, 262-268.
- Fontenille, D.**, 2010. "Vecteurs d'arbovirus et indicateurs de lutte. IRD, UR 016 Caractérisation et contrôle des populations de vecteurs, Montpellier."
- Fontenille, D., Toto, J.C.**, 2001. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerging Infectious Diseases* 7, 1066.
- Fournier, D., Bride, J.-M., Mouches, C., Raymond, M., Magnin, M., Berge, J.-B., Pasteur, N., Georghiou, G.P.**, 1987. Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens L.* complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 27, 211-217.
- Foy, B.D., Kobylinski, K.C., Chilson Foy, J.L., Blitvich, B.J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A.D., Lanciotti, R.S., Tesh, R.B.**, 2011. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases* 17, 880-882.
- Fritz, M., Taty, R.T., Portella, C., Guimbi, C., Mankou, M., Leroy, E.M., Becquart, P.**, 2019. Re-emergence of chikungunya in the Republic of the Congo in 2019 associated with a possible vector-host switch. *International Journal of Infectious Diseases* 84, 99-101.

- Gake, B., Vernet, M.A., Leparc-Goffart, I., Drexler, J.F., Gould, E.A., Gallian, P., Lamballerie, X.d.,** 2017. Low seroprevalence of Zika virus in Cameroonian blood donors. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 21, 481-483.
- George, L., Lenhart, A., Toledo, J., Lazaro, A., Han, W.W., Velayudhan, R., Ranzinger, S.R., Horstick, O.,** 2015. Community-effectiveness of temephos for dengue vector control: a systematic literature review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9, e0004006.
- Gilotra, S.K., Rozeboom, L.E., Bhattacharya, N.,** 1967. Observations on possible competitive displacement between populations of *Aedes aegypti* Linnaeus and *Aedes albopictus* Skuse in Calcutta. *Bulletin of the World Health Organization* 37, 437.
- Giner, M., Vassal, C., Kouaik, Z., Chiroleu, F., Vassal, J.,** 1999. Win DL version 2.0. Paris: CIRAD-CA, URBI/MABIS.
- Goma, L.K.H.,** 1966. The mosquito. *The mosquito. Hutchinson tropical monographs* 145.
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I.M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., Leroy, E.M.,** 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2681.
- Gratz, N.,** 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology* 18, 215-227.
- Grigoraki, L., Balabanidou, V., Meristoudis, C., Miridakis, A., Ranson, H., Swevers, L., Vontas, J.,** 2016. Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Insect Molecular Biology and Biochemistry* 74, 61-67.
- Gubler, D.J.,** 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480-496.
- Gubler, D.J.,** 2002a. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research* 33, 330-342.
- Gubler, D.J.,** 2002b. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology* 10, 100-103.
- Haddow, A.D., Nasar, F., Guzman, H., Ponlawat, A., Jarman, R.G., Tesh, R.B., Weaver, S.C.,** 2016. Genetic Characterization of Spondweni and Zika Viruses and Susceptibility of Geographically Distinct Strains of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to Spondweni Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, e0005083.

- Hall, T.A.**, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*, 95-98.
- Hamon, J., Mouchet, J.**, 1961. Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. *Médecine tropicale* 21, 643-660.
- Hargreaves, K., Koekemoer, L., Brooke, B., Hunt, R., Mthembu, J., Coetzee, M.**, 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 181-189.
- Harris, A.F., Rajatileka, S., Ranson, H.**, 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 277-284.
- Hassal, K.**, 1990. The biochemistry and use of pesticides: structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. *Second edition. Weinheim: VCH*, 536.
- Hawley, W.A.**, 1988. The biology of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement 1, 1-39.
- Helvecio, E., Romão, T.P., de Carvalho-Leandro, D., de Oliveira, I.F., Cavalcanti, A.E.H.D., Reimer, L., de Paiva Cavalcanti, M., de Oliveira, A.P.S., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H.**, 2020. Polymorphisms in GSTE2 is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 165, 104464.
- Hemingway, J., Karunaratne, S.**, 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* 12, 1-12.
- Hemingway, J., Ranson, H.**, 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371-391.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H.**, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 653-665.
- Hosie, A., Sattelle, D., Aronstein, K.**, 1997. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neurosciences* 20, 578-583.
- Ioos, S., Mallet, H.-P., Goffart, I.L., Gauthier, V., Cardoso, T., Herida, M.**, 2014. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44, 302-307.
- Ishak, I.H., Jaal, Z., Ranson, H., Wondji, C.S.**, 2015. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites and Vectors* 8, 181.
- Ishak, I.H., Riveron, J.M., Ibrahim, S.S., Stott, R., Longbottom, J., Irving, H., Wondji, C.S.**, 2016. The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in kdr-

- free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific Reports* 6, 24707.
- Ishak, I.H., Kamgang, B., Ibrahim, S.S., Riveron, J.M., Irving, H., Wondji, C.S.,** 2017. Pyrethroid resistance in Malaysian populations of dengue vector *Aedes aegypti* is mediated by CYP9 family of cytochrome P450 genes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005302.
- Jirakanjanakit, N., Rongnoparut, P., Saengtharatip, S., Chareonviriyaphap, T., Duchon, S., Bellec, C., Yoksan, S.,** 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *Journal of Economic Entomology* 100, 545-550.
- Juliano, S.A., Philip Lounibos, L.,** 2005. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology Letters* 8, 558-574.
- Kalluri, S., Gilruth, P., Rogers, D., Szczur, M.,** 2007. Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathogens* 3, e116.
- Kamgang, B., Happi, J.Y., Boisier, P., Njiokou, F., HERVÉ, J.P., Simard, F., Paupy, C.,** 2010. Geographic and ecological distribution of the dengue and chikungunya virus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in three major Cameroonian towns. *Medical and Veterinary Entomology* 24, 132-141.
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V., Paupy, C.,** 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites and Vectors* 4, 1-8.
- Kamgang, B., Nchoutpouen, E., Simard, F., Paupy, C.,** 2012. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites and Vectors* 5, 1-4.
- Kamgang, Ngoagouni, C., Manirakiza, A., Nakoune, E., Paupy, C., Kazanji, M.,** 2013. Temporal patterns of abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and mitochondrial DNA analysis of *Aedes albopictus* in the Central African Republic. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2590.
- Kamgang, B., Yougang, A.P., Tchoupo, M., Riveron, J.M., Wondji, C.,** 2017. Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasites and Vectors* 10, 1-9.
- Kamgang, B., Vazeille, M., Tedjou, A.N., Wilson-Bahun, T.A., Yougang, A.P., Mousson, L., Wondji, C., Failloux, A.-B.,** 2019. Risk of dengue in Central Africa: Vector

competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. *PLoS neglected tropical diseases* 13, e0007985.

Kamgang, B., Vazeille, M., Tedjou, A., Yougang, A.P., Wilson-Bahun, T.A., Mousson, L., Wondji, C.S., Failloux, A.-B., 2020a. Different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Central Africa are susceptible to Zika virus infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008163.

Kamgang, B., Wilson-Bahun, T.A., Yougang, A.P., Lenga, A., Wondji, C.S., 2020b. Contrasting resistance patterns to type I and II pyrethroids in two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Republic of the Congo, Central Africa. *Infectious Diseases of Poverty* 9, 1-10.

Kasai, S., Ng, L.C., Lam-Phua, S.G., Tang, C.S., Itokawa, K., Komagata, O., Kobayashi, M., Tomita, T., 2011. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64, 217-221.

Kasai, S., Komagata, O., Itokawa, K., Shono, T., Ng, L.C., Kobayashi, M., Tomita, T., 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2948.

Kasai, S., Caputo, B., Tsunoda, T., Cuong, T.C., Maekawa, Y., Lam-Phua, S.G., Pichler, V., Itokawa, K., Murota, K., Komagata, O., 2019. First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: a new emerging threat to controlling arboviral diseases. *Eurosurveillance* 24.

Kawada, H., Higa, Y., Futami, K., Muranami, Y., Kawashima, E., Osei, J.H., Sakyi, K.Y., Dadzie, S., de Souza, D.K., Appawu, M., 2016. Discovery of point mutations in the voltage-gated sodium channel from African *Aedes aegypti* populations: potential phylogenetic reasons for gene introgression. *PLoS neglected tropical diseases* 10, e0004780.

Kay, B., Nam, V.S., 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *The Lancet* 365, 613-617.

Kinde-Gazard, D., Baglo, T., 2012. Assessment of microbial larvicide spraying with *Bacillus thuringiensis israelensis*, for the prevention of malaria. *Médecine et Maladies Infectieuses* 42, 114-118.

- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E.,** 2001. Glutathione S–transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 313-319.
- Kow, C.Y., Koon, L.L., Yin, P.F.,** 2001. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. *Journal of Medical Entomology* 38, 475-479.
- Krippner, R., Laer, G.,** 2002. First Confirmed Dengue-1 Fever Cases Reported from Cameroon. *Journal of Travel Medicine* 9, 273-274.
- Kroeger, A., Lenhart, A., Ochoa, M., Villegas, E., Levy, M., Alexander, N., McCall, P.,** 2006. Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomised trials. *British Medical Journal* 332, 1247-1252.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.,** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874.
- Lacey, L.A.,** 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23, 133-163.
- Lee, C., Yap, H.,** 2003. Status of urban pest control in Malaysia. *Urban Pest Control, A Malaysian Perspective. Universiti Sains Malaysia*, 1-8.
- Leroy, E.M., Nkoghe Mba, D., Ollomo, B., Nze-Nkogue, C., Becquart, P., Grard, G., Pourrut, X., Charrel, R., Moureau, G., Ndjoi-Mbiguino, A.,** 2009. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 15, 591-593.
- Linthicum, K.J., Kramer, V.L., Madon, M.B., Fujioka, K., Surveillance-Control, T.,** 2003. Introduction and potential establishment of *Aedes albopictus* in California in 2001. *Journal of the American Mosquito Control Association* 19, 301.
- Lounibos, L.P.,** 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 47, 233-266.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M.,** 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. *Invasive Species Specialist Group Auckland* 11.
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L.A., Somboon, P., Lycett, G., Ranson, H.,** 2011. The role of the *Aedes aegypti*

- Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 203-209.
- Lund, A.E., Narahashi, T.**, 1983. Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20, 203-216.
- Macoris Mde, L., Andrighetti, M.T., Wanderley, D.M., Ribolla, P.E.**, 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of Sao Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47, 573-578.
- Majambere, S., Lindsay, S.W., Green, C., Kandeh, B., Fillinger, U.**, 2007. Microbial larvicides for malaria control in The Gambia. *Malaria Journal* 6, 1.
- Majambere, S., Pinder, M., Fillinger, U., Ameh, D., Conway, D.J., Green, C., Jeffries, D., Jawara, M., Milligan, P.J., Hutchinson, R.**, 2010. Is mosquito larval source management appropriate for reducing malaria in areas of extensive flooding in The Gambia? A cross-over intervention trial. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 176-184.
- Marcombe, S., Farajollahi, A., Healy, S.P., Clark, G.G., Fonseca, D.M.**, 2014. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PloS One* 9, e101992.
- Marcombe, S., Chonephetsarath, S., Thammavong, P., Brey, P.T.**, 2018. Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. *Parasites and Vectors* 11, 1-8.
- Marcombe, S., Fustec, B., Cattel, J., Chonephetsarath, S., Thammavong, P., Phommavanh, N., David, J.-P., Corbel, V., Sutherland, I.W., Hertz, J.C.**, 2019. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13.
- Marquardt, W., Kondratieff, B.** Biology of disease vectors. 2005. *Elsevier Academic Press, Burlington, MA* 649-60.
- Marten, G.G.**, 1990. Elimination of *Aedes albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclus albidus* (Copepoda, Cyclopidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 6, 689-693.
- Matsumura, F.**, 2010. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities

- in the past, the present and the future prospects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97, 133-139.
- Mattingly, P.**, 1957. Genetical Aspects of the *Aedes aegypti* Problem: I.—Taxonomy and Bionomics. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 51, 392-408.
- Messina, J.P., Brady, O.J., Scott, T.W., Zou, C., Pigott, D.M., Duda, K.A., Bhatt, S., Katzelnick, L., Howes, R.E., Battle, K.E.**, 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology* 22, 138-146.
- Mohsin, M., Naz, S.I., Khan, I.A., Jabeen, A., Bilal, H., Ahmad, R., Alshamrani, Y., IM, E.**, 2016. Susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* against insecticides at eastern Punjab, Pakistan. *International Journal of Mosquito Research*, 3(5), 41-6.
- Mouchet, J., Cordellier, R., Germain, M., Carnevale, P., Barathe, J., Sannier, C.**, 1972. Résistance aux insecticides d'*Aedes aegypti* L. et *Culex pipiens fatigans* en Afrique Centrale. *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 10 (4), 347-354.
- Mount, G.A.**, 1998. A critical review of ultralow-volume aerosols of insecticide applied with vehicle-mounted generators for adult mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14, 305-334.
- Moyes, C.L., Vontas, J., Martins, A.J., Ng, L.C., Koou, S.Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J.-P.**, 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005625.
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Shan Yan, A., Cao-Lormeau, V.M., Broult, J.**, 2014. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles*, 19(14).
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M.**, 2015. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infectious Diseases* 21, 359-361.
- Musso, D., Stramer, S.L., Busch, M.P.**, 2016. Zika virus: a new challenge for blood transfusion. *Lancet* 387, 1993-1994.
- Nasci, R., Miller, B.**, 1996. Culicine mosquitoes and the agents they transmit. *The biology of disease vectors. Niwot: University Press of Colorado*, 85-97.

- Ngoagouni, C., Kamgang, B., Nakouné, E., Paupy, C., Kazanji, M.,** 2015. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasites and Vectors* 8, 1-7.
- Ngoagouni, C., Kamgang, B., Brengues, C., Yahouedo, G., Paupy, C., Nakouné, E., Kazanji, M., Chandre, F.,** 2016. Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic. *Parasites and Vectors* 9, 1-13.
- Ngoagouni, C., Kamgang, B., Kazanji, M., Paupy, C., Nakouné, E.,** 2017. Potential of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* populations in the Central African Republic to transmit enzootic chikungunya virus strains. *Parasites and Vectors* 10, 1-5.
- Nkya, T.E., Akhouayri, I., Kisinza, W., David, J.-P.,** 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 407-416.
- Olivry, J.C.,** 1986. Fleuves et rivières du Cameroun, *Monographies hydrologiques, Edition de l'ORSTOM, Bondy, France* (9), 733.
- Paquet, C., Quatresous, I., Solet, J., Sissoko, D., Renault, P., Pierre, V., Cordel, H., Lassalle, C., Thiria, J., Zeller, H.,** 2006. Chikungunya outbreak in Reunion: epidemiology and surveillance, 2005 to early January 2006. *Weekly releases (1997–2007)*, 11(5), 2891.
- Pasteur, S.,** 2016. Dengvaxia® Le premier vaccin au monde pour la prévention de la dengue, enregistré au mexique. Sanofi Pasteur.
- Paul, A., Harrington, L.C., Scott, J.G.,** 2006. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 43, 55-60.
- Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, L., Scott, J.G.,** 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21, 305-309.
- Paupy, C., Brengues, C., Kamgang, B., Hervé, J.-P., Fontenille, D., Simard, F.,** 2008. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *Journal of Medical Entomology* 45, 391-400.
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., Fontenille, D.,** 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infection* 11, 1177-1185.
- Paupy, C., Ollomo, B., Kamgang, B., Moutailler, S., Rousset, D., Demanou, M., Herve, J.P., Leroy, E., Simard, F.,** 2010. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes*

- aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 10, 259-266.
- Peyrefitte, C.N., Rousset, D., Pastorino, B.A., Pouillot, R., Bessaud, M., Tock, F., Mansaray, H., Merle, O.L., Pascual, A.M., Paupy, C.,** 2007. Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerging Infectious Diseases* 13, 768.
- Pialoux, G., Gaüzère, B.-A., Jauréguiberry, S., Strobel, M.,** 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 319-327.
- Poitras, E., Houde, A.,** 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2, 2-11.
- Powers, A.M., Brault, A.C., Tesh, R.B., Weaver, S.C.,** 2000. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology* 81, 471-479.
- Rageau, J., Adam, J.-P.,** 1952. Culicines of the Cameroons. In: *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 27, 610-635.
- Rault, L.C., O'Neal, S.T., Johnson, E.J., Anderson, T.D.,** 2019. Association of age, sex, and pyrethroid resistance status on survival and cytochrome P450 gene expression in *Aedes aegypti* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 156, 96-104.
- Ravi, V.,** 2006. Re-emergence of chikungunya virus in India. *Indian Journal of Medical Microbiology* 24, 83.
- Raymond, M., Pasteur, N., Fournier, D., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M.,** 1985. Genetics of a propoxur insensitive acetylcholinesterase responsible for resistance in *Culex pipiens* L. [propoxur (carbamate), insecticide]. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie (France)* 509.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M., Pasteur, N.,** 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* 79, 1452-1458.
- Reis, S., Cornel, A.J., Melo, M., Pereira, H., Loiseau, C.,** 2017. First record of *Aedes albopictus* (Skuse 1894) on São tomé island. *Acta Tropica* 171, 86-89.
- Reiter, P.,** 1998. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association* 14, 83-94.
- Reiter, P., Sprenger, D.,** 1987. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3, 494-501.

- Reiter, P., Gubler, D. J.**, 1997. Surveillance and control of urban dengue vectors. IN: Gubler, DJ and Kuno, G. (eds.) *Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*. CAB International: London ; 425-462.
- Rigau-Pérez, J.G., Clark, G.G., Gubler, D.J., Reiter, P., Sanders, E.J., Vorndam, A.V.**, 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 352, 971-977.
- Robinson, M.C.**, 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49, 28-32.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A.**, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34, 3299-3302.
- Rückert, C., Weger-Lucarelli, J., Garcia-Luna, S., Young, M., Byas, Alex., Murrieta, R., Fauver, J., Ebel, G.**, 2017. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature Communication* 8, 15412.
- Rudnick, A.**, 1965. Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. *Journal of Medical Entomology* 2, 203-208.
- Rudnick, A., Hammon, W.M.**, 1960. Newly recognized *Aedes aegypti* problems in Manila and Bangkok. *Mosquito News* 20(3) 247-259.
- Saavedra-Rodriguez, K., Strode, C., Flores Suarez, A., Fernandez Salas, I., Ranson, H., Hemingway, J., Black, W.C.t.**, 2008. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180, 1137-1152.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.**, 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saingamsook, J., Saeung, A., Yanola, J., Lumjuan, N., Walton, C., Somboon, P.**, 2017. A multiplex PCR for detection of knockdown resistance mutations, V1016G and F1534C, in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors* 10, 465.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.**, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.

- Santos, A., Cabezas, M., Tavares, A., Xavier, R., Branco, M.,** 2015. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, 32(4), 627-628.
- Sathantriphop, S., Paeporn, P., Supaphathom, K.,** 2006. Detection of insecticides resistance status in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* to four major groups of insecticides. *Tropical Biomedicine* 23, 97-101.
- Savage, H., T VI, E., Nwankwo, A.,** 1992. First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *Médecine & Hygiène* 25, 318-325.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J.,** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols* 3(6), 1101-1108.
- Scholte, E.-J., Schaffner, F.,** 2007. 14. Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe* 1, 241.
- Scholte, E.J., Dijkstra, E., Blok, H., De Vries, A., Takken, W., Hofhuis, A., Koopmans, M., De Boer, A., Reusken, C.,** 2008. Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Medical and Veterinary Entomology* 22, 352-358.
- Scully, C., Robinson, A.,** 2016. Check before you travel: Zika virus-another emerging global health threat. *British Dental Journal* 220, 265-267.
- Seixas, G., Grigoraki, L., Weetman, D., Vicente, J.L., Silva, A.C., Pinto, J., Vontas, J., Sousa, C.A.,** 2017. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005799.
- Service, M.W.,** 2012. Medical entomology for students. *Cambridge University Press*.
- Sharp, B.L., Ridl, F.C., Govender, D., Kuklinski, J., Kleinschmidt, I.,** 2007. Malaria vector control by indoor residual insecticide spraying on the tropical island of Bioko, Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, 6(1), 1-6.
- Simard, F., Nchoutpouen, E., Toto, J.C., Fontenille, D.,** 2005. Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *Journal of Medical Entomology* 42, 726-731.
- Simmons, C.P., Farrar, J.J., van Vinh Chau, N., Wills, B.,** 2012. Dengue. *New England Journal of Medicine* 366, 1423-1432.
- Simo, F.B.N., Yousseu, F.B.S., Mbarga, A.E., Bigna, J.J., Melong, A., Ntoude, A., Kamgang, B., Bouyne, R., Fewou, P.M., Demanou, M.,** 2018. Investigation of an

Outbreak of Dengue Virus Serotype 1 in a Rural Area of Kribi, South Cameroon: A Cross-Sectional Study. *Intervirology* 61, 265-271.

- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.-M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V.,** 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5-34.
- Sissoko, D., Malvy, D., Ezzedine, K., Renault, P., Moschetti, F., Ledrans, M., Pierre, V.,** 2009. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e389.
- Smith, C.,** 1956. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 243-251.
- Smith, D.,** 1999. Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. *International Journal of Epidemiology* 28, 179-188.
- Sombié, A., Saiki, E., Yaméogo, F., Sakurai, T., Shirozu, T., Fukumoto, S., Sanon, A., Weetman, D., McCall, P.J., Kanuka, H.,** 2019. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Songandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Tropical Medicine and Health* 47, 2.
- Sprenger, P.R.D.,** 1987. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3, 494.
- Tedjou, A.N., Kamgang, B., Yougang, A.P., Njiokou, F., Wondji, C.S.,** 2019. Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13, e0007137.
- Tewari, S., Thenmozhi, V., Katholi, C., Manavalan, R., Munirathinam, A., Gajanana, A.,** 2004. Dengue vector prevalence and virus infection in a rural area in south India. *Tropical Medicine & International Health* 9, 499-507.
- Thavara, U., Tawatsin, A., Chansang, C., Kong-ngamsuk, W., Paosriwong, S., Boon-Long, J., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N.,** 2001. Larval Occurrence, Oviposition Behavior and Biting Activity of Potential Mosquito Vectors of Dengue on Samui Island, Thailand. *Journal of Vector Ecology* 26, 172-180.
- Thavara, U., Tawatsin, A., Chansang, C., Asavadachanukorn, P., Zaim, M., Mulla, M.S.,** 2007. Simulated field evaluation of the efficacy of two formulations of diflubenzuron,

- a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) in water-storage containers. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(2), 269.
- Thomas, S.J., Yoon, I.-K.**, 2019. A review of Dengvaxia®: Development to deployment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 15, 2295-2314.
- Thompson, M., Shotkoski, F., ffrench-Constant, R.**, 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Letters* 325, 187-190.
- Thonnon, J., Spiegel, A., Diallo, M., Diallo, A., Fontenille, D.**, 1999. Chikungunya virus outbreak in Senegal in 1996 and 1997. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* (1990) 92, 79-82.
- Tsalefac, M.**, 2006. Le Cameroun. *Climat In Atlas du Cameroun, Collection Atlas de l'Afrique, Les éditions JA-Edition du Jaguar, Paris. Edition*, 62-63.
- Tsetsarkin, K.A., Chen, R., Sherman, M. B., Weaver, S. C.**, 2011. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Current opinion in virology* 1, 310317.
- Uhel, F., Zafrani, L.**, 2019. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation*, 28(6), 464-472.
- Valle, D., Bellinato, D.F., Viana-Medeiros, P.F., Lima, J.B.P., Martins Junior, A.d.J.**, 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 114.
- Vontas, J.G., Graham, J., Hemingway, J.**, 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal* 357, 65-72.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., Ranson, H.**, 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, 126-131.
- Vu, S., Nguyen, T., Kay, B.H., Marten, G.G., Reid, J.W.**, 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam, using copepods and community participation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 657-660.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., Raymond, M.**, 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423, 136-137.

- Whitehead, S.S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., Murphy, B.R.,** 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology* 5, 518-528.
- WHO,** 1997. Haemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control, Second edition. World Health Organization 1-84
- WHO,** 2006. Pesticides and their application: for the control of vectors and pests of public health importance, WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1 6th edition World Health Organization 125.
- WHO,** 2016a. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005)(IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. *Saudi Medical Journal* 37, 332-333.
- WHO,** 2016b. Entomological surveillance for *Aedes* spp. in the context of Zika virus: interim guidance for entomologists. No. WHO/ZIKV/VC/16.2. World Health Organization 10.
- WHO** 2020. Chikungunya au Tchad. In *Rapport de la Situation Épidémiologique (Ministère de la santé publique)*, 5.
- Wilder-Smith, A.,** 2019. Can dengue virus be sexually transmitted? *Journal of Travel Medicine* 26, tay157.
- Xu, J., Bonizzoni, M., Zhong, D., Zhou, G., Cai, S., Li, Y., Wang, X., Lo, E., Lee, R., Sheen, R.,** 2016. Multi-country survey revealed prevalent and novel F1534S mutation in voltage-gated sodium channel (VGSC) gene in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004696.
- Yadouleton, A., Martin, T., Padonou, G., Chandre, F., Asidi, A., Djogbenou, L., Dabiré, R., Aikpon, R., Boko, M., Glitho, I.,** 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasites and Vectors* 4, 1-11.
- Yap, H., Chong, N., Foo, A., Lee, C.,** 1984. Vector control in Malaysia—present status and future prospects. *Journal of Malaysian Society of Health* 4, 7-12.
- Yousseu, F.B.S., Nemg, F.B.S., Ngouanet, S.A., Mekanda, F.M.O., Demanou, M.,** 2018. Detection and serotyping of dengue viruses in febrile patients consulting at the New-Bell District Hospital in Douala, Cameroon. *PloS One* 13, e0204143.

ANNEXES

Annexe 1 : articles publiés dans le cadre de cette thèse

1. **YOU GANG, A. P., KAM GANG MBOUHOM, B., TEDJOU, A. N., WILSON-BAHUN, T. A., NJIOKOU, F., & WONDJI, C. S. 2020. Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *PLoS One*, 15(6), e0234572.**
2. **YOU GANG, A. P., KAM GANG MBOUHOM, B., WILSON-BAHUN, T. A., TEDJOU, A. N., NGUIFFO-NGUETE, D., NJIOKOU, F., & WONDJI, C. S. 2020. First detection of F1534C knockdown resistance mutation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cameroon. *Infectious Diseases of Poverty* 9(1), 1-12.**

RESEARCH ARTICLE

Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon

Aurelie P. Yougang^{1,2}*, Basile Kamgang¹*, Armel N. Tedjou^{1,2}, Theodel A. Wilson-Bahun^{1,3}, Flobert Njiokou², Charles S. Wondji^{1,4}

1 Centre for Research in Infectious Diseases, Yaoundé, Cameroon, **2** Department of Animal Biology and Physiology, Parasitology and Ecology Laboratory, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon, **3** Laboratory of vertebrate and invertebrate bioecology, Faculty of Science and Technology, Marien-Ngouabi University, Brazzaville, Congo, **4** Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom

* These authors contributed equally to this work.

* aurelie.yougang@crd-cam.net (APY); basile.kamgang@crd-cam.net (BK)



OPEN ACCESS

Citation: Yougang AP, Kamgang B, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Njiokou F, Wondji CS (2020) Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. PLoS ONE 15(6): e0234572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572>

Editor: Abdallah M. Samy, Faculty of Science, Ain Shams University (ASU), EGYPT

Received: March 25, 2020

Accepted: May 28, 2020

Published: June 18, 2020

Copyright: © 2020 Yougang et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by a Wellcome Trust Training Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (204862/Z/16/Z) awarded to BK. BK, APY, ANT, and TAW received salaries from the funder. The funder had no role in study design, data collection or analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The Asian mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse), is an invasive mosquito which has become one of the most important vectors of dengue, Zika, and chikungunya viruses worldwide. This species was reported for the first time in Cameroon in early 2000s and became the dominant *Aedes* species in the urban areas in the southern part of Cameroon but remain poorly characterized. Here, we assessed the susceptibility profile of *A. albopictus* collected throughout Cameroon and investigated the potential resistance mechanisms involved. Immature stages of *A. albopictus* were collected between March and July 2017 in 15 locations across Cameroon and reared until G1/G2 generation. Larval, adult bioassays, and synergists [piperonyl butoxide (PBO) and diethyl maleate (DEM)] assays were carried out according to WHO recommendations. F1534C mutation was genotyped in field collected adults (Go) using allele specific PCR. All tested populations were susceptible to both larvicides, temephos and *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), after larval bioassays. Adult bioassays revealed a high level of resistance of *A. albopictus* to 4% DDT with mortality rates ranging from 12.42% in Bafang to 75.04% in Kumba. The resistance was reported also in 0.05% deltamethrin, 0.25% permethrin, and 0.1% propoxur in some locations. A loss of susceptibility to 0.1% bendiocarb was found in one of three populations analysed. A full susceptibility to 1% fenitrothion were observed across the country. A full recovery or partial of susceptibility was observed in *A. albopictus* when pre-exposed to PBO or DEM and then to DDT and permethrin, respectively. The F1534C *kdr* mutation was not detected in *A. albopictus*. This study showed that the susceptibility profile of *A. albopictus* to insecticide vary according to the sampling location and insecticides used. These findings are useful to planning vector control program against arbovirus vectors in Cameroon and can be used as baseline data for further researches.

Introduction

The Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) 1894, originated from South East Asia has invaded all the five continents during the past four decades [1]. This mosquito species is one of the most important vectors of several arboviruses including dengue virus (DENV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*) [2], chikungunya virus (CHIKV, *Togaviridae*, *Alphavirus*) and Zika virus (ZIKV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*) [3,4] worldwide. During the last two decades, diseases caused by these viruses are increasingly reported in several regions of the world including Central Africa [3,5–13] where the epidemics were formerly considered as scarce. Coincidentally, the emergence of arboviral diseases notably dengue and chikungunya has matched with the establishment of *A. albopictus* in the region. Indeed, *A. albopictus* was reported for the first time in Central Africa in Cameroon in early 2000s [14], and has rapidly colonized almost all countries of the subregion [15]. Nowadays, in Cameroon *A. albopictus* is the dominant *Aedes* species in most cities located under 6°N latitude [16]. This species was suspected as the main vector during dengue and chikungunya outbreaks in Cameroon in 2006 [6]. It was also recently demonstrated that *A. albopictus* populations collected in different ecological settings in Cameroon are able to transmit dengue 2 virus [17].

Control of *A. albopictus* relies on destruction of breeding sites and insecticide-based interventions. Indeed, the use of larvicides such as *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*) or temephos to treat water storage containers and space spraying of adulticides in emergency situations can help to reduce the density of *Aedes* mosquitoes [18,19]. Unfortunately, intensive and prolonged use of insecticides usually leads to the emergence of resistance in mosquito species under selection pressure, by decreasing the frequency of susceptible mosquitoes and reducing variability of field mosquitoes [20]. Thus, many vector control programmes are facing the challenge from the development of insecticide resistance in *A. albopictus*. Two main mechanisms are associated in insecticide resistance: target site due to the mutation that reduces or blocks the binding affinity between the insecticide and target site [21], and metabolic resistance [22]. Target site resistance is caused by the mutation in target genes such as the acetylcholinesterase (*Ace-1*), the GABA receptor, and the voltage-gated sodium channel (VGSC) causing knockdown resistance (*kdr*). Among target site resistance, *kdr* resistance is one of the main conferring resistance to both pyrethroids and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). In *A. albopictus*, *kdr* mutation is less prevalent with only four VGSC mutations detected affecting two codons (1532 and 1534). Among these mutations only the F1534S variant has been shown to be moderately associated with resistance to DDT and pyrethroids [23,24]. Furthermore, metabolic resistance through upregulation of detoxification genes is a common resistance mechanism in *A. albopictus*. It is caused primarily by three main enzyme families, the monooxygenases (cytochrome P450s), glutathione S-transferases (*GSTs*) and carboxylesterases (*COEs*) [22,25]. *CYP6P12* gene has been shown to be over-expressed in pyrethroid resistant *A. albopictus* in Asia [26]. In Cameroon, data on insecticide resistance in *A. albopictus* are very scarce apart preliminary studies which highlighted the high resistance of this species to DDT, and a loss of susceptibility to pyrethroids and carbamates [27,28]. As insecticide resistance is a dynamic process which can vary according geographical space and time, we undertook this study aiming to assess the susceptibility profile of *A. albopictus* nationwide and the potential resistance mechanisms involved.

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the Cameroonian national ethics committee for human health research N°2017/05/911/CE/CNERSH/SP including using of rabbits. Oral consent to inspect the potential breeding sites was obtained in the field from household or business occupants.

Mosquito sampling. *Aedes albopictus* mosquitoes were sampled as larvae or pupae between March and July 2017 in 15 locations across Cameroon (Fig 1): Edéa (03°48'N; 10°08'E), Buea (04°09'N; 09°14'E), Bafang (05°09'N; 10°14'E), Bafoussam (05°28'N; 10°25'E), Bamenda (05°56'N; 10°10'E), Sangmelima (02°56'N; 11°58'E), Ebolowa (02°54'N; 11°09'E), Mbalmayo (03°31'N; 11°30'E), Bertoua (04°33'N; 13°46'E), Kribi (02°57'N; 09°55'E), Kumba (04°38'N; 09°27'E), Tibati (06°28'N; 12°38'E), Foumban (05°43'N; 10°55'E), Melong (05°07'N; 09°57'E), and Douala (04°03'N; 09°42'E).

Immature stages (field generation, G0) were collected from different potential breeding sites: domestic (e.g. jars, tanks), peri-domestic (e.g. used tires, discarded tanks), and natural (e.g. tree holes). In each location, larvae or pupae from 20 positive larval breeding places were collected, stored in plastic boxes and transferred to insectary, pooled according to the location and reared to adult stage for identification using taxonomic keys [29,30]. Mosquitoes identified as *A. albopictus* were reared until generation G1 for adult bioassays and G2 for larval bioassays. Mosquito populations were maintained at insectary conditions (27°C ± 2°C; relative humidity 80% ± 10%), and females were fed on rabbits to complete their gonotrophic cycle. The *A. albopictus* susceptible strain from the Malaysia Vector Control Research Unit (VCRU) lab strain coming from Malaysia was used as reference strain.

Larval bioassays. Larval bioassays were performed according to WHO guidelines [31] using G2 generation larvae. The susceptibility of larvae was evaluated against technical grade temephos (Sigma Aldrich-Pestanal®, Seelze, Germany) and a formulated *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) product (Vectobac® 12AS, Illinois, USA). First, stock solutions and serial dilutions were prepared in 95% ethanol for temephos and distilled water for *Bti* and stored at 4°C. Six doses of concentrations ranging from 0.08 to 0.2 mg/l for *Bti*, and from 0.001 to 0.006 mg/l for temephos have been used. 80 to 100 larvae per concentration (with three to four replicates, depending on the sample and the number of larvae available) were tested. Late-third or early-fourth instars larvae of *A. albopictus* were placed in plastic cups with 99 ml of distilled mineral water, and 1 ml insecticide solution at the required concentration was added.

Control groups were run systematically with larvae exposed to 1 ml of ethanol for temephos or 1 ml of distilled water for *Bti*. No food was provided to larvae during the bioassays, which were run at 27 ± 2°C and 80 ± 10% relative humidity. Mortality was determined after 24 hrs of exposure to the insecticide. Mortality rates were corrected with Abbott's formula [32], when the mortality of controls was > 5%. All data were analysed with Win DL v. 2.0 software [33]. Lethal concentrations (LC50 and LC95) were calculated with their 95% confidence intervals (CIs). Resistance ratios (RR50 and RR95) were calculated by comparing the LC50 and LC95 for each species with those of susceptible strain, as $RR_{50(95)} = LC_{50(95)} \text{ of studied population} / LC_{50(95)} \text{ susceptible strain}$ and $RR_{95} = LC_{95(95)} \text{ of studied population} / LC_{95(95)} \text{ reference strain}$. The resistance levels were ranked into three categories: susceptibility ($RR_{50} < 5$), medium or moderate resistance ($5 \leq RR_{50} \leq 10$), and high resistance ($RR_{50} > 10$) [31].

Adult bioassays. Bioassays were carried out according to WHO protocol [31] using 3–5 days-old G1 generation *A. albopictus* mosquitoes with 4 replicates of 20–25 mosquitoes per tube. Six insecticides were tested: 0.25% permethrin (type I pyrethroid), 0.05% deltamethrin (type II pyrethroid), 4% DDT (organochlorine), 0.1% propoxur (carbamate), 0.1% bendiocarb (carbamate), and 1% fenitrothion (organophosphate). Insecticide-impregnated papers were

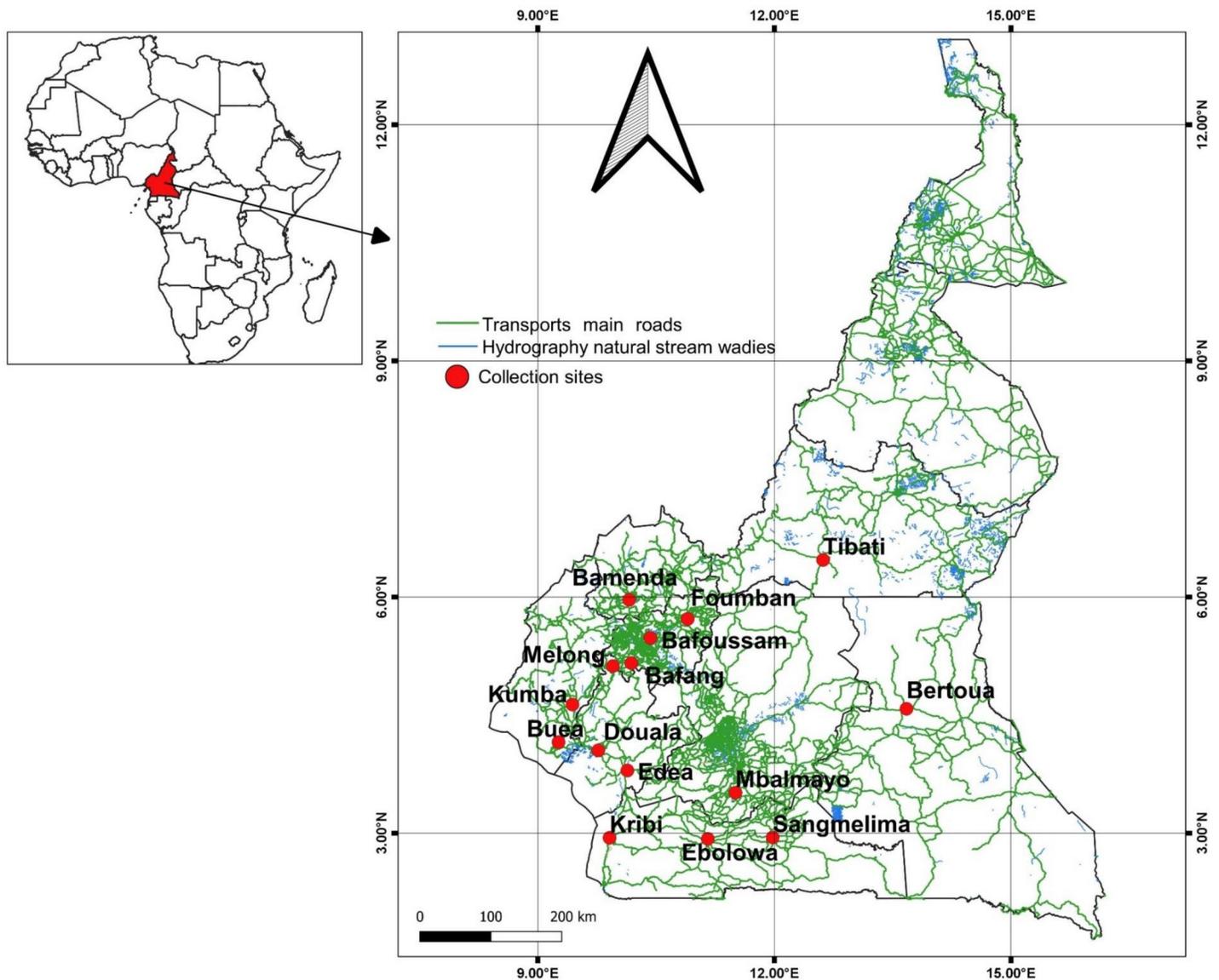


Fig 1. Map of Cameroon showing the sampling sites of *Aedes albopictus*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.g001>

supplied by Liverpool School of Tropical Medicine. Mortality was recorded 24 hrs later and mosquitoes alive and dead after exposure 24h were stored in RNA later and silica gel, respectively. The resistance status was defined as follows: susceptible (mortality rate between 98–100%), probable resistance (mortality rate between 90–98%), and resistant (mortality rate inferior to 90%) [31]. For populations (Bafang, Bafoussam, Tibati, and Edéa) which revealed a high level of resistance to diagnostic dose of permethrin (0.25%) recommended by WHO, an additional test was performed with 2x (0.5%) and 3x (0.75%) of the discriminating dose of permethrin. Four replicates of 20–25 females per tube were exposed to 0.25, 0.5, and 0.75% permethrin for 1 h. The *A. albopictus* strain from the Malaysia Vector Control Research Unit (VCRU) was used as reference susceptible lab strain.

Synergist assays. In order to investigate the potential role of oxidases and glutathioneS-transferases (GSTs) in the metabolic resistance mechanism, synergist assay was performed,

when number of mosquitoes permitted, using 4% piperonyl butoxide (PBO) and/or 8% diethyl maleate (DEM) respectively. 3-5-days-old adults were pre-exposed for one hour to PBO- or DEM-impregnated papers and after that immediately exposed to the selected insecticide. Mortality was scored 24 hrs later and compared to the results obtained with each insecticide without synergist according to the WHO standards [34]. The comparison of mortality rate after pre-exposure of mosquitoes to synergist and without pre-exposure to synergist was done using Chi-square test. The difference was statistically different when *P-value* was inferior to 0.05.

Investigating of F1534 mutation using allele specific PCR. Genomic DNA of 30 specimens of *A. albopictus* per populations was extracted using Livak protocol [35]. This DNA was used to genotype the F1534 mutation using allele specific (AS) PCR as described previously [36,37]. Each PCR reaction was performed using a Gene Touch thermal cycler (Bulldog Bio, Portsmouth, USA) in a 15 μ l volume containing: 1 μ l of DNA sample, 0.4 units of Kapa Taq DNA polymerase, 0.12 μ l of 25 mM dNTPs (0.2 mM), 0.75 μ l of 25 mM MgCl₂ (1.5 mM), 1.5 μ l of 10 \times PCR buffer (1 \times), 0.51 μ l of each primers (0.34 mM). The amplification consisted of 95 $^{\circ}$ C for a 5 min heat activation step, followed by 35 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 30 s, 55 $^{\circ}$ C for 30 s and 72 $^{\circ}$ C for 45 s with a 10 min final extension step at 72 $^{\circ}$ C. PCR products were detected by agarose gel electrophoresis in Tris-Acid-EDTA buffer (TAE). The 3% gel was prepared with Midori green, staining dye, and visualized with the aid of UV light.

Results

Larval bioassays to *A. albopictus*

Due to the limited number of larvae available, larval bioassays were performed for six populations from Bertoua, Douala, Bafoussam, Tibati, Bafang, and Edéa with temephos, and four populations from Bertoua, Bafoussam, Tibati, and Edéa with *Bti* (Tables 1 and 2). Analysis revealed that for both larvicides and populations tested, RR₅₀ and RR₉₅ were less than 5 suggesting that *A. albopictus* from these locations are susceptible to *Bti* and temephos.

Adult bioassays

Bioassays performed with susceptible strain revealed that this *A. albopictus* strain was fully susceptible to almost all insecticides tested excepted DDT for which 80.7% mortality rate were found.

Analysis revealed that 14 populations of *A. albopictus* analysed across Cameroon exhibited a high level of resistance to organochlorine DDT with mortality rates ranging from 12.42% in Bafang to 90.03% in Melong (Figs 2 and 3). Resistance was also observed against pyrethroids notably to permethrin (type I) for which nine populations out of 13 were found resistant with

Table 1. Larval bioassays with temephos against *Aedes albopictus* larvae.

Strain and Site	N	LC ₉₅ (mg/L) (95% CI)	RR ₉₅	LC ₅₀ (mg/L) (95% CI)	RR ₅₀
VCRU	574	0.0068 (0.00512–0.0209)	-	0.0031 (0.00128–0.00413)	-
Bertoua	439	0.0073 (0.00695–0.00789)	1.07	0.0053 (0.00512–0.00547)	1.68
Douala	432	0.0120 (0.01007–0.0173)	1.75	0.0079 (0.00738–0.00921)	2.52
Bafoussam	508	0.0077 (0.0071–0.00856)	1.12	0.0043 (0.00421–0.00461)	1.38
Tibati	547	0.0055 (0.00440–0.00915)	0.80	0.0030 (0.00238–0.00360)	0.95
Bafang	523	0.0056 (0.00520–0.00641)	0.83	0.0031 (0.00291–0.00330)	0.98
Edéa	549	0.0066 (0.00589–0.00775)	0.97	0.0028 (0.00254–0.00320)	0.91

LC₉₅ and LC₅₀: 95 and 50% lethal concentrations; CI: confidence interval; RR: resistance ratio; VCRU: Vector Control Research Unit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.t001>

Table 2. Larval bioassays with *Bti* against *Aedes albopictus* larvae.

Strain and Site	N	LC ₉₅ (mg/L) (95% CI)	RR ₉₅	LC ₅₀ (mg/L) (95% CI)	RR ₅₀
VCRU	574	0.0408 (0.0332–0.0546)	-	0.0108 (0.0096–0.0120)	-
Bertoua	548	0.0570 (0.0445–0.0893)	1.39	0.0169 (0.0139–0.0193)	1.56
Bafoussam	556	0.150 (0.0827–0.953)	3.67	0.0272 (0.0208–0.0342)	2.51
Tibati	547	0.0907 (0.0648–0.163)	2.22	0.0298 (0.0263–0.0359)	2.75
Edéa	526	0.0322 (0.0261–0.0426)	0.78	0.0088 (0.00302–0.0132)	0.81

LC₉₅ and LC₅₀: 95 and 50% lethal concentrations; CI: confidence interval; RR: resistance ratio; VCRU: Vector Control Research Unit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.t002>

mortality rates varying from 34.16% in Bafang to 85.23% in Kribi, probable resistance was found in four populations (Bamenda, Mbalmayo, Kumba, and Melong). In contrast, similar analysis with deltamethrin (type II) revealed that nine populations out of 14 were rather susceptible, and resistance suspected only in five populations with mortality rates ranging from 90.99% in Tibati to 95% in Bafang. Resistance was also reported against carbamates notably to propoxur but only in two populations out of 12 tested, in Edéa and Bamenda, with mortality rates of 66.94% and 88.99%, respectively. However, probable resistance to the carbamate propoxur was found in five populations (Buea, Bafoussam, Mbalmayo, Bertoua, and Tibati) with mortality rates between 94% and 97% while five other populations were susceptible (Figs 2 and 3). In three populations tested with bendiocarb (carbamate), two from Foumban and Kumba were full susceptible and a loss of susceptibility was reported in Bertoua samples. All tested populations across Cameroon exhibited a full susceptibility toward the organophosphate fenitrothion (Fig 4).

Using different doses of permethrin (0.25, 0.5 and 0.75%), results showed that the mortality rate increased with dose of permethrin used (Fig 5). Populations of Bafang did not have a full susceptibility even with 2X concentrated permethrin as 100% mortality observed only with 3X. However, population from Edéa exhibit 100% mortality at 2X permethrin.

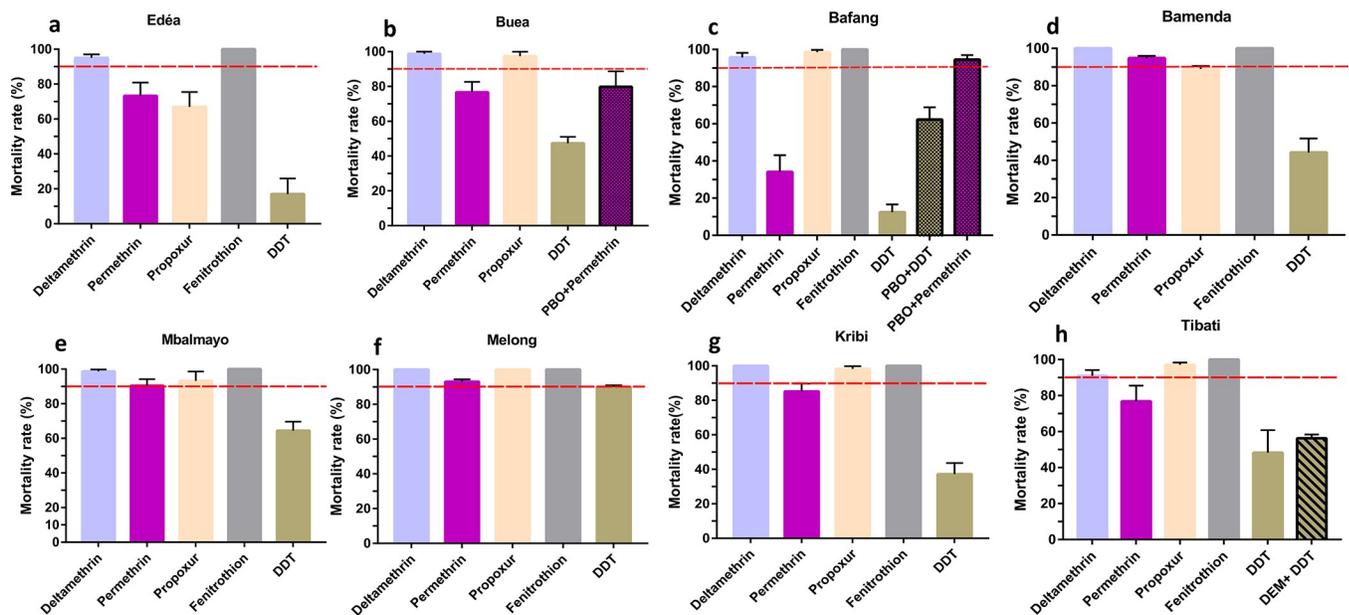


Fig 2. Mortality rates of adult *A. albopictus* from Cameroon (8 locations) 24 hrs after exposure to insecticides alone or with 1 h pre-exposure to synergist. a, Edéa; b, Buea; c, Bafang; d, Bamenda; e, Mbalmayo; f, Melong; g, Kribi; h, Tibati. Error bars represent standard error of the mean (SEM). DDT, Dichlorodiphenyltrichloroethane. PBO, Piperonyl butoxide. DEM, Diethyl maleate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.g002>

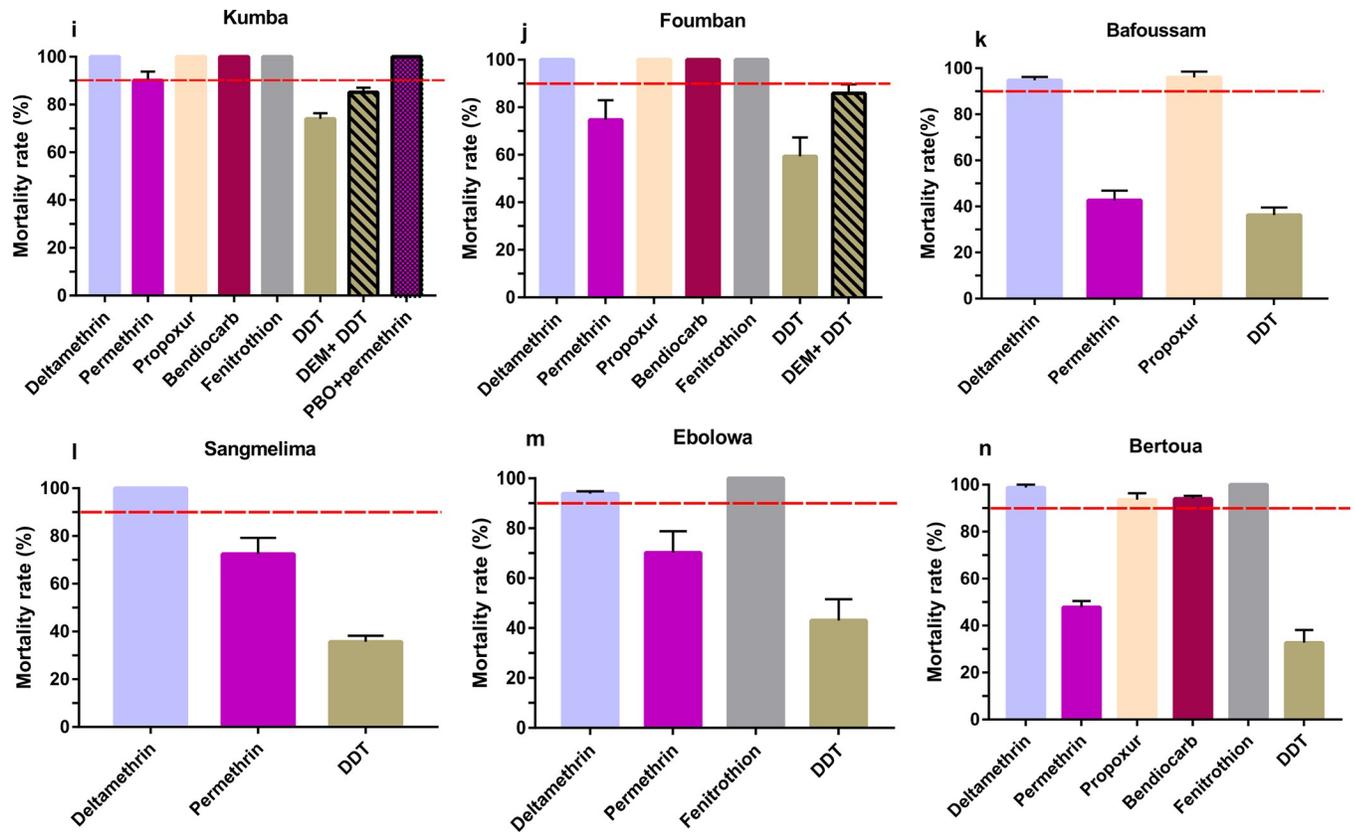


Fig 3. Mortality rates of adult *A. albopictus* from Cameroon (6 locations) 24 hrs after exposure to insecticides alone or with 1 h pre-exposure to synergist. i, Kumba; j, Foumban; k, Bafoussam; l, Sangmelima; m, Ebolowa; n, Bertoua. Error bars represent standard error of the mean. DDT, Dichlorodiphenyltrichloroethane. PBO, Piperonyl butoxide. DEM, Diethyl maleate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.g003>

Synergist assay

Results from the synergist bioassays showed a full recovery of susceptibility to permethrin after PBO pre-exposure to Kumba population ($90.10 \pm 3.36\%$ mortality without PBO pre-exposure vs $100.0 \pm 0.0\%$ mortality after PBO pre-exposure, $\chi^2 P > 0.25$) while a partial recovery to permethrin was recorded in Buea ($76.68 \pm 5.96\%$ mortality without PBO pre-exposure vs $79.76 \pm 8.91\%$ mortality after PBO pre-exposure, $P < 0.75$) and Bafang ($34.16 \pm 8.93\%$ of mortality without PBO pre-exposure vs $94.58 \pm 2.39\%$ of mortality after PBO pre-exposure, $P < 0.05$) populations, respectively (Figs 2 and 3). The partial recovery of susceptibility to DDT was also reported in Bafang population after pre-exposure to PBO ($12.4 \pm 4.24\%$ mortality without PBO pre-exposure vs $62.28 \pm 6.59\%$ mortality after PBO pre-exposure, $P < 0.005$). Similar analysis with DEM also induced a partial recovery of susceptibility to DDT with significant difference in Foumban ($59.36 \pm 7.93\%$ without DEM pre-exposure vs $85.85 \pm 7.63\%$ mortality after DEM pre-exposure $P < 0.005$), however in Tibati ($48.33 \pm 12.44\%$ without DEM pre-exposure vs $56.25 \pm 2.13\%$ mortality after DEM pre-exposure $P > 0.25$) and Kumba ($74.05 \pm 2.29\%$ without DEM pre-exposure vs $85.14 \pm 1.93\%$ mortality after DEM pre-exposure $P < 0.25$) no significant difference was reported (Figs 2 and 3).

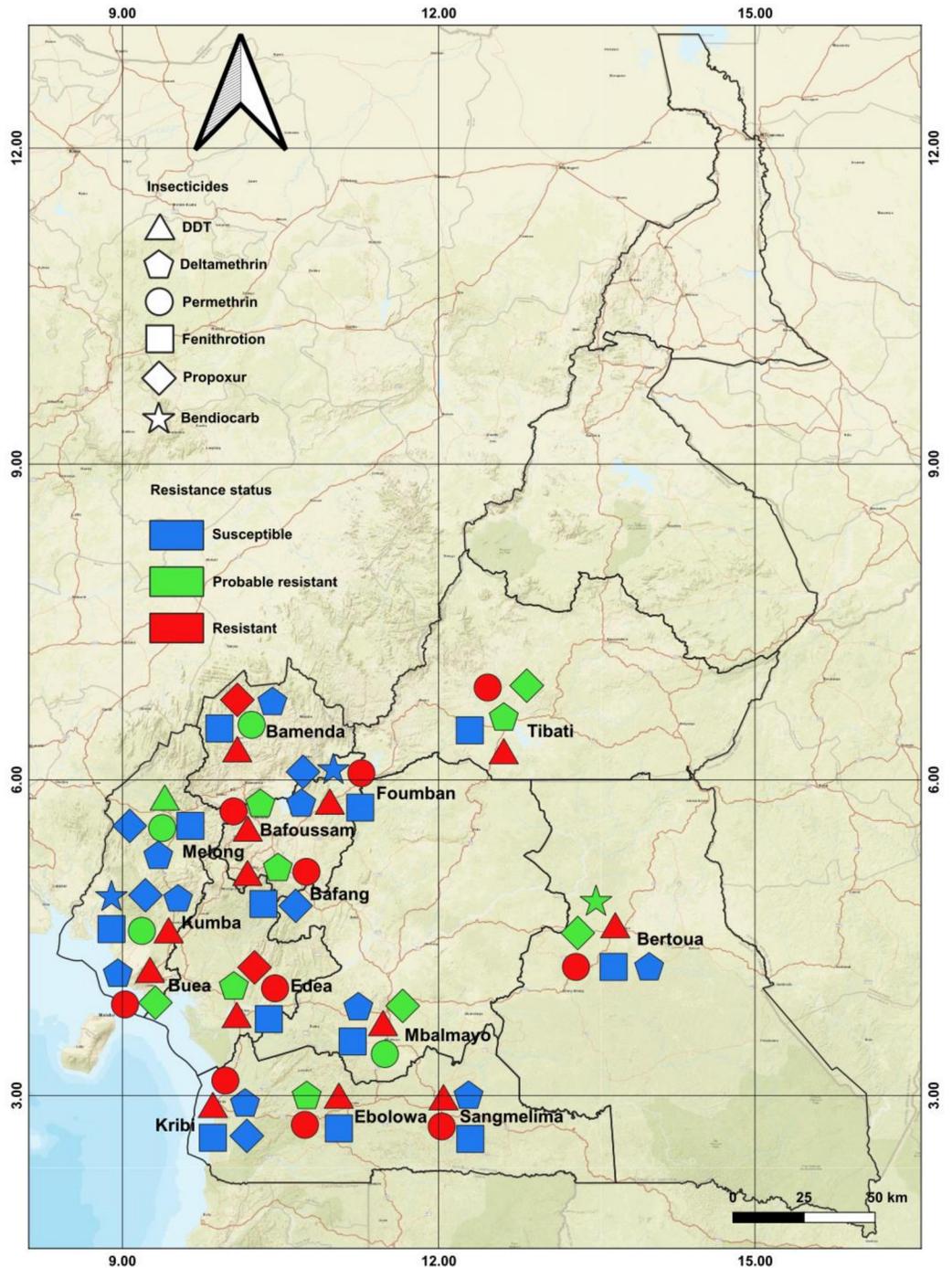


Fig 4. Map of Cameroon showing the insecticide resistance status of *Aedes albopictus* in 14 locations of Cameroon. DDT, Dichlorodiphenyltrichloroethane.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.g004>

F1534 *kdr* genotyping

After genotyping of 420 specimens of *A. albopictus* from 14 locations across Cameroon no resistant individual was detected. We observed 100% mosquitoes homozygote for the susceptible F1534 allele.

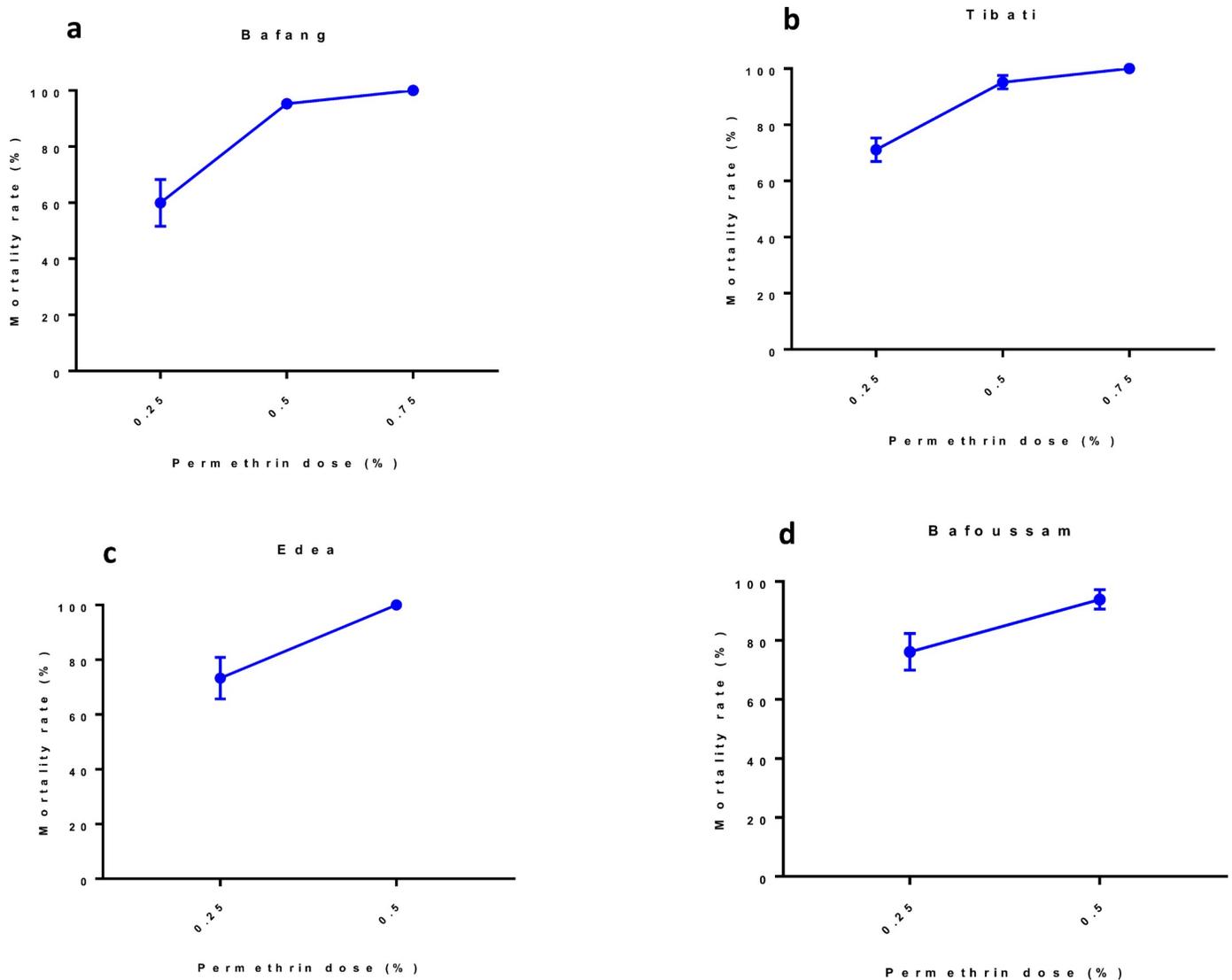


Fig 5. Tests with different doses of permethrin in *A. albopictus* from Cameroon. a, Bafang; b, Tibati; c, Edéa; d, Bafoussam.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234572.g005>

Discussion

This study investigated the resistance profile of 15 populations of *A. albopictus* collected across Cameroon and explored the potential resistance mechanisms involved. Analysis of larval bioassays revealed that all *A. albopictus* samples were susceptible to *Bti* and temephos. Similar results were previously obtained in Central Africa notably Cameroon [27], Gabon [27], and Central African Republic [38]. It is important to highlight that data on *Bti* resistance in field populations of mosquitoes are very scarce apart the case of *Culex pipiens* reported in USA [39]. On the other hand, the resistance to temephos has been reported in several countries such as in Greece [40], Malaysia [41,42], and Sri Lanka [43]. Selection of the resistance results from extensive and long-term use of the product incriminated, meanwhile in our knowledge, temephos as well as *Bti* had never been used in vector control program in Central Africa which probably explains the full susceptibility reported for both larvicides in *A. albopictus* collected across Cameroon.

Higher level of resistance to DDT was reported in *A. albopictus* collected in several places in Cameroon. Indeed, none of the *A. albopictus* populations analysed from Cameroon can be considered fully susceptible to DDT, as all populations were either resistant or probable resistant. This result is in accordance with previous data reported in some Central Africa countries especially in Cameroon [28], Central African Republic [38] and the Republic of the Congo [44], and outside Africa: India, Malaysia, and USA [41,45,46]. A significant level of resistance to pyrethroid type I permethrin was reported in nine *A. albopictus* populations while for the pyrethroid type II deltamethrin, the resistance was suspected only in five populations. The striking difference of the resistance pattern in both pyrethroids tested could be due to the fact that diagnostic dose used for deltamethrin 0.05% is high than 0.03% recommended for *Aedes* [34] as suggested previously [44]. Indeed, the assessing of intensity of resistance to permethrin using 0.75% permethrin which is the dose recommended for *Anopheles* as 0.05% deltamethrin, populations tested exhibited the full susceptibility. However, the loss of the susceptibility has been previously reported to deltamethrin in Cameroon and Central African Republic [27,28,38]. Although data on permethrin remain scarce in Central Africa preliminary studies in Yaoundé Cameroon highlighted the resistance of this compound [28] using the *Anopheles* diagnostic dose 0.75%. Previous studies in other parts of the world using the diagnostic dose recommended for *Anopheles* had shown that the level of resistance of *A. albopictus* to permethrin was higher than those of deltamethrin [41,47]. In contrast, the more recent studies in China highlighted that *A. albopictus* is more resistant to deltamethrin than permethrin [43,48]. As in this study, the loss of susceptibility to propoxur and bendiocarb was reported in certain locations across the country [28]. Similar results were observed in Central African Republic [38] and outside Africa in *A. albopictus* [41,49,50].

The reduced susceptibility to both pyrethroids tested in *A. albopictus* may pose a serious threat for vector control programs, because pyrethroids are mainly recommended for the control of adult *Aedes* mosquitoes [51,52]. In addition, it was demonstrated that *A. albopictus* was the dominant *Aedes* species in urban area in southern Cameroon [16] and could be considered as main arbovirus vectors in these areas. The source of selection driving the observed resistance to DDT, permethrin, deltamethrin, propoxur and bendiocarb in some *A. albopictus* populations remains unclear notably as the use of insecticides against *A. albopictus* is limited in the region [27,28,44]. As suggested previously [28,38], domestic use of insecticides through the indoor spraying and impregnating bed nets, and agriculture use could be the main source of resistance selection in *Aedes* vectors in Central Africa. Indeed, the use of pesticides in agriculture for the protection of market gardening could also promote the emergence of resistance in mosquitoes by contamination of breeding sites and resting places of mosquitoes. As *A. albopictus* was firstly reported in Cameroon in early 2000s [14], we cannot exclude the possibility that the invading populations possessed the resistance background, as previously suggested [27,38,44].

A partial or full recovery of susceptibility to permethrin and DDT after pre-exposure to synergist PBO or DEM suggests that the cytochrome P450 monooxygenases and glutathione-S-transferases are playing an important role in the resistance in these populations role in the observed resistance which is consistent with previous data from the sub-region [28,38,44] and in other regions such as in Malaysia where a major P450, *CYP6P12* was associated with pyrethroid resistance [26]. None of the specimens of *A. albopictus* genotyped possesses the 1534C allele suggesting this mutation is not currently involved in pyrethroid resistance in populations of this species across Cameroon. Nevertheless, this mutation has been detected in *A. albopictus* from several countries outside Africa like Brazil, India, Greece, Singapore, and China [53]. It will be interesting to investigate the role of other *kdr* mutations such as V1016I/G which was

described in *A. albopictus* in Europe and Asia [54] and investigate the genes involved in metabolic resistance in *A. albopictus*.

Conclusions

Our result showed that the resistance profile varied significantly depending on the insecticides and populations tested. The full susceptibility reported to organophosphates in both larval stages (temephos) and adult stages (fenitrothion) as well as to *Bti* suggests that these insecticides are suitable for control *A. albopictus* across the country. These findings could help to design and implement the best strategies of insecticide-based interventions in Cameroon against arbovirus vector *A. albopictus*.

Acknowledgments

We would like to thank the people living around all the different collection sites and the garage owners for their cooperation during the field investigations.

Author Contributions

Conceptualization: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Charles S. Wondji.

Data curation: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Theodel A. Wilson-Bahun.

Formal analysis: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Theodel A. Wilson-Bahun.

Funding acquisition: Basile Kamgang, Charles S. Wondji.

Investigation: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Armel N. Tedjou, Theodel A. Wilson-Bahun.

Methodology: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Theodel A. Wilson-Bahun, Charles S. Wondji.

Project administration: Basile Kamgang, Charles S. Wondji.

Resources: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang.

Software: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang.

Supervision: Basile Kamgang, Charles S. Wondji.

Validation: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Theodel A. Wilson-Bahun, Flobert Njiokou, Charles S. Wondji.

Visualization: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang.

Writing – original draft: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang.

Writing – review & editing: Aurelie P. Yougang, Basile Kamgang, Armel N. Tedjou, Theodel A. Wilson-Bahun, Flobert Njiokou, Charles S. Wondji.

References

1. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, et al. (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *elife* 4: e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347> PMID: 26126267
2. Peng H-J, Lai H-B, Zhang Q-L, Xu B-Y, Zhang H, et al. (2012) A local outbreak of dengue caused by an imported case in Dongguan China. *BMC public health* 12: 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-83> PMID: 22276682

3. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mbouï Ondo S, et al. (2014) Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2681. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681> PMID: 24516683
4. Azar SR, Roundy CM, Rossi SL, Huang JH, Leal G, et al. (2017) Differential vector competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 97: 330–339. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0969> PMID: 28829735
5. Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkoghe C, Becquart P, et al. (2009) Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis* 15: 591–593. <https://doi.org/10.3201/eid1504.080664> PMID: 19331740
6. Peyrefitte CN, Rousset D, Pastorino BA, Pouillot R, Bessaud M, et al. (2007) Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerg Infect Dis* 13: 768–771. <https://doi.org/10.3201/eid1305.061500> PMID: 17553262
7. Peyrefitte CN, Bessaud M, Pastorino BA, Gravier P, Plumet S, et al. (2008) Circulation of Chikungunya virus in Gabon, 2006–2007. *J Med Virol* 80: 430–433. <https://doi.org/10.1002/jmv.21090> PMID: 18205212
8. Pastorino B, Muyembe-Tamfum JJ, Bessaud M, Tock F, Tolou H, et al. (2004) Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J Med Virol* 74: 277–282. <https://doi.org/10.1002/jmv.20168> PMID: 15332277
9. Moyon N, Thiberville SD, Pastorino B, Nougaiïre A, Thirion L, et al. (2014) First reported chikungunya fever outbreak in the republic of Congo, 2011. *PLoS One* 9: e115938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115938> PMID: 25541718
10. Fritz M, Taty Taty R, Portella C, Guimbi C, Mankou M, et al. (2019) Re-emergence of chikungunya in the Republic of the Congo in 2019 associated with a possible vector-host switch. *Int J Infect Dis* 84: 99–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.013> PMID: 31096054
11. Nemg Simo FB, Sado Yousseu FB, Evouna Mbarga A, Bigna JJ, Melong A, et al. (2018) Investigation of an Outbreak of Dengue Virus Serotype 1 in a Rural Area of Kribi, South Cameroon: A Cross-Sectional Study. *Intervirology* 61: 265–271. <https://doi.org/10.1159/000499465> PMID: 31048588
12. Yousseu FBS, Nemg FBS, Ngouanet SA, Mekanda FMO, Demanou M (2018) Detection and serotyping of dengue viruses in febrile patients consulting at the New-Bell District Hospital in Douala, Cameroon. *PLoS One* 13: e0204143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204143> PMID: 30281633
13. Kraemer MUG, Faria NR, Reiner RC Jr., Golding N, Nikolay B, et al. (2017) Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 17: 330–338. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30513-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30513-8) PMID: 28017559
14. Fontenille D, Toto JC (2001) *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerging infectious diseases* 7: 1066. <https://doi.org/10.3201/eid0706.010631> PMID: 11747746
15. Ngoagouni C, Kamgang B, Nakoune E, Paupy C, Kazanji M (2015) Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasit Vectors* 8: 191. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0808-3> PMID: 25885461
16. Tedjou AN, Kamgang B, Yougang AP, Njiokou F, Wondji CS (2019) Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. *PLoS neglected tropical diseases* 13: e0007137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007137> PMID: 30883552
17. Kamgang B, Vazeille M, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Yougang AP, et al. (2019) Risk of dengue in Central Africa: Vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. *PLoS neglected tropical diseases* 13: e0007985. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007985> PMID: 31887138
18. WHO (2016) Vector control operations framework for Zika virus. Geneva: World Health Organization, WHO/ZIKV/VC/ 164: 10.
19. Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Levy M, et al. (2006) Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomised trials. *BMJ* 332: 1247–1252. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7552.1247> PMID: 16735334
20. Valle D, Belinato TA, Martins A (2015) Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. *Dengue: teorias e práticas Rio de Janeiro: Fiocruz*: 93–126.
21. Hemingway J, Ranson H (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology* 45: 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371> PMID: 10761582
22. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology* 34: 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018> PMID: 15242706

23. Xu J, Bonizzoni M, Zhong D, Zhou G, Cai S, et al. (2016) Multi-country survey revealed prevalent and novel F1534S mutation in voltage-gated sodium channel (VGSC) gene in *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases* 10: e0004696. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004696> PMID: 27144981
24. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, et al. (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11: e0005625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625> PMID: 28727779
25. Perry T, Batterham P, Daborn PJ (2011) The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 411–422. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.03.003> PMID: 21426939
26. Ishak IH, Riveron JM, Ibrahim SS, Stott R, Longbottom J, et al. (2016) The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in *kdr*-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific reports* 6: 24707. <https://doi.org/10.1038/srep24707> PMID: 27094778
27. Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, et al. (2011) Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasit Vectors* 4: 79. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-79> PMID: 21575154
28. Kamgang B, Yougang AP, Tchoupo M, Riveron JM, Wondji C (2017) Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasites & vectors* 10: 469.
29. Edwards FW (1941) Mosquitoes of the Ethiopian Region. HI.-Culicine Adults and Pupae. Mosquitoes of the Ethiopian Region HI-Culicine Adults and Pupae.
30. Jupp PG (1996) Mosquitoes of Southern Africa: Culicinae and Toxorhynchitinae: Ekogilde Publishers.
31. WHO (2016) Entomological surveillance for *Aedes* spp. in the context of Zika virus: interim guidance for entomologists.
32. Abbott W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J econ Entomol* 18: 265–267.
33. Giner M, Vassal C, Kouaik Z, Chiroleu F, Vassal J (1999) Win DL version 2.0. Paris: CIRAD-CA, URBI/MABIS.
34. WHO (2016) Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Geneva: World Health Organization, WHO/ZIKV/VC/ 161.
35. Livak KJ (1984) Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics* 107: 611–634. PMID: 6430749
36. Harris AF, Rajatileka S, Ranson H (2010) Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 83: 277–284. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0623> PMID: 20682868
37. Aguirre-Obando OA, Martins AJ, Navarro-Silva MA (2017) First report of the Phe1534Cys *kdr* mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. *Parasites & vectors* 10: 160.
38. Ngoagouni C, Kamgang B, Brengues C, Yahouedo G, Paupy C, et al. (2016) Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic. *Parasit Vectors* 9: 599. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1887-5> PMID: 27881148
39. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG (2005) Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 305–309. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2005\)21\[305:IRICPF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[305:IRICPF]2.0.CO;2) PMID: 16252522
40. Grigoraki L, Lagnel J, Kioulos I, Kampouraki A, Morou E, et al. (2015) Transcriptome profiling and genetic study reveal amplified carboxylesterase genes implicated in temephos resistance, in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases* 9: e0003771. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003771> PMID: 26000638
41. Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS (2015) Contrasting patterns of insecticide resistance and knock-down resistance (*kdr*) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasit Vectors* 8: 181. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0797-2> PMID: 25888775
42. Rahim J, Ahmad AH, Maimusa AH (2017) Effects of temephos resistance on life history traits of *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae), a vector of arboviruses. *Revista Brasileira de Entomologia* 61: 312–317.
43. Abeyrathna W, Fernando H, de Silva B (2019) Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* from Sri Lanka: First report of the F1534C mutation in the country.
44. Kamgang B, Wilson-Bahun TA, Yougang AP, Lenga A, Wondji CS (2020) Contrasting resistance patterns to type I and II pyrethroids in two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Republic of the Congo, Central Africa. *Infectious Diseases of Poverty* 9: 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0617-6>

45. Das M, Dutta P (2014) Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam, India. *International Journal of Mosquito Research* 1: 35–41.
46. Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM (2014) Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS one* 9: e101992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101992> PMID: 25013910
47. Chuaycharoensuk T, Juntarajumnong W, Boonyuan W, Bangs MJ, Akwatanakul P, et al. (2011) Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecol* 36: 204–212. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00158.x> PMID: 21635659
48. Gao J-P, Chen H-M, Shi H, Peng H, Ma Y-J (2018) Correlation between adult pyrethroid resistance and knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field populations in China. *Infectious diseases of poverty* 7: 86. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0471-y> PMID: 30176907
49. Su X, Guo Y, Deng J, Xu J, Zhou G, et al. (2019) Fast emerging insecticide resistance in *Aedes albopictus* in Guangzhou, China: Alarm to the dengue epidemic. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13: e0007665. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007665> PMID: 31525199
50. Li Y, Xu J, Zhong D, Zhang H, Yang W, et al. (2018) Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. *Parasites & vectors* 11: 4.
51. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharapit S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, et al. (2007) Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. *J Econ Entomol* 100: 545–550. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2007\)100\[545:irsias\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[545:irsias]2.0.co;2) PMID: 17461081
52. Macoris M, Andrihella M, Wanderley D, Ribolla P. (2014) Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the state of Sao Paulo *Rev Soc Bras Med Trop*: 573–578.
53. Auteri M, La Russa F, Blanda V, Torina A (2018) Insecticide Resistance Associated with *kdr* Mutations in *Aedes albopictus*: An Update on Worldwide Evidences. *Biomed Res Int* 2018: 3098575. <https://doi.org/10.1155/2018/3098575> PMID: 30175124
54. Kasai S, Caputo B, Tsunoda T, Cuong TC, Maekawa Y, et al. (2019) First detection of a *Vssc* allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in *Aedes albopictus* collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: a new emerging threat to controlling arboviral diseases. *Eurosurveillance* 24.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



First detection of F1534C knockdown resistance mutation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cameroon

Aurelie P. Yougang^{1,2†}, Basile Kamgang^{1*} , Theodel A. Wilson Bahun^{1,3}, Armel N. Tedjou^{1,2}, Daniel Nguiffo-Nguete^{1,4}, Flobert Njiokou² and Charles S. Wondji^{1,5}

Abstract

Background: *Aedes* borne viral diseases, notably dengue, are increasingly reported in Cameroon with *Aedes aegypti* being a major vector. Data on insecticide resistance of this vector and underlying mechanisms needed for outbreak preparedness remain scarce in Cameroon. Here, we present the nationwide distribution of insecticide resistance in *Ae. aegypti* and investigate the potential resistance mechanisms involved.

Methods: Immature stages of *Ae. aegypti* were collected between March and July 2017 in 13 locations across Cameroon and reared until G1/G2/G3 generation. Larval, adult bioassays, and piperonyl butoxide (PBO) synergist assays were carried out according to World Health Organization guidelines. F1534C mutation was genotyped using allele specific polymerase chain reaction in field collected adults (Go) and the polymorphism of the sodium channel gene was assessed. The χ^2 test was used to compare the mortality rate between bioassays with insecticides only and bioassays after preexposure to PBO synergist.

Results: Larval bioassay revealed that all the three populations tested with temephos were susceptible. Adult bioassays showed a good level of susceptibility toward both pyrethroids tested, 0.25% permethrin and 0.05% deltamethrin, with six out of 10 populations susceptible. However, two populations (Douala and Edéa) were resistant (deltamethrin [73.2–92.5% mortality], permethrin [2.6–76.3% mortality]). The resistance to 4% dichlorodiphenyltrichloroethane was observed in four out of 10 populations tested (16.8–87.1% mortality). Resistance was also reported to carbamates including 0.1% propoxur (60.8–87.1% mortality) and to 0.1% bendiocarb (82.9% mortality). All populations tested were fully susceptible to 1% fenitrothion. A partial recovery of susceptibility was observed in the pyrethroid resistant population of Douala after pre-exposed to PBO suggesting the implication of cytochrome P450 monooxygenases permethrin resistance. Genotyping and sequencing detected the F1534C *kdr* mutation in the two pyrethroid resistant locations of Edéa and Douala, with allelic frequency of 3.3% and 33.3% respectively. However, the high genetic diversity of the sodium channel gene supports the recent introduction of this mutation in Cameroon.

Conclusions: This study revealed the contrasting resistance profiles to insecticides of *Ae. aegypti* populations in Cameroon suggesting that, instead of a unique nationwide control approach, a regionally adapted strategy will be needed to control this vector. The localised distribution of the F1534C *kdr* mutation supports this region-specific control strategy.

*Correspondence: kamgang_d@yahoo.fr; basile.kamgang@crid-cam.net

†Aurelie P. Yougang and Basile Kamgang have contribute equally.

¹ Centre for Research in Infectious Diseases, P.O. Box 13591, Yaoundé, Cameroon

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



Keywords: *Aedes aegypti*, Insecticide resistance, *Kdr* mutation, Cameroon, Arbovirus

Background

The mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) is the main vector of several arboviral related diseases such as dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever in subtropical and tropical world. This domestic mosquito usually bites during daylight, feeding mainly on humans, mating and resting indoor/outdoor, and breeding in man-made containers in and around human habitations [1].

In Cameroon, where several cases of arboviral related diseases such as dengue [2–5], chikungunya [6, 7], yellow fever [8] and Zika [9] are increasingly reported, it was demonstrated that *Ae. aegypti* is present across the country and found as dominant *Aedes* species in some locations notably in the northern part [10]. It was also demonstrated that local *Ae. aegypti* populations are able to transmit dengue [11], Zika [12] and yellow fever [13] viruses in different urban settings in Cameroon. Prevention of large outbreaks caused by these virus relies on control of *Aedes* vectors based on destruction of breeding sites and insecticide-based interventions such as treatment of breeding sites with larvicides, insecticide-treated nets [14] and space spraying of adulticides in emergency situations [15, 16]. However, at the operational level, many vector control programmes are facing the challenge of the development of insecticide resistance in *Ae. aegypti*. Indeed, *Ae. aegypti* has been found to be resistant to several classes of insecticides in different regions across the world with significant variation according to the population's origin and the insecticide classes [17–24].

The insecticide resistance in mosquitoes is primarily associated to two main mechanisms: insensitivity of target sites (target-site resistance) due to mutations that reduce the binding affinity between the insecticide and the target site, and metabolic resistance resulting in an overproduction of enzymes that will facilitate the detoxification of insecticides [25, 26]. The metabolic resistance through overexpression of detoxification genes is a common resistance mechanism in *Ae. aegypti* as well as in *Ae. albopictus*. The three main enzyme families responsible for insecticide resistance in mosquitoes are the monooxygenases (cytochrome P450s), glutathione S-transferases (*GSTs*), and carboxylesterases (*COEs*) [26, 27].

Target site resistance is caused by mutations in target genes such as the acetylcholinesterase (*Ace-1*), the *GABA* receptor and the voltage-gated sodium channel (*VGSC*) causing knockdown resistance (*kdr*). One of

the most important target site resistance for mosquitoes is *kdr* as it confers resistance to both pyrethroids and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). Eleven *kdr* mutations in *VGSC* domain I-IV have been identified in *Ae. aegypti* around the world and the association between F1534C, V1016G, I1011M, and V410L mutations and pyrethroid resistance has been established [22, 28, 29]. In Africa 1534 and 1016 mutations have been previously reported in *Ae. aegypti* in Burkina-Faso and Ghana [21], and 410 mutation in Angola [30]. In Cameroon, data on insecticide resistance in *Ae. aegypti* and resistance mechanisms involved are very limited apart from the preliminary studies highlighting the resistance of this species to DDT, deltamethrin, and bendiocarb in some locations and suggesting the implication of cytochrome P450 enzymes in pyrethroids and DDT resistance [19, 20]. Thereby, we present here the nationwide distribution of insecticide resistance to *Ae. aegypti* and investigate the potential implication of 1534 *kdr* mutation in the pyrethroid resistance. This was done by assessing the presence and distribution of the 1534C resistant allele and analysing the genetic diversity of the related portion of the sodium channel gene country-wide.

Methods

Collection of mosquitoes

Immature stages of *Aedes* were collected between March and July 2017 in 13 locations across Cameroon (Fig. 1): Maroua (10° 35' N; 14° 18' E), Benoué national park (08° 20' N; 13° 50' E), Garoua (09° 18' N; 13° 24' E), Mbé (07° 51' N; 13° 35' E), Banyo (06° 45' N; 11° 49' E), Tibati (06°28'N; 12°38'E), Meiganga (06°31'N; 14°18'E), Ngaoundéré (07° 19' N; 13° 35' E), Edéa (03° 48' N; 10° 08' E), Limbé (04° 00' N; 09° 13' E), Douala (04° 03' N; 09° 42' E), Melong (05° 07' N; 09° 57' E), and Yaoundé (03° 52' N; 11° 31' E). Detailed characteristics of each collection site are presented in previous studies [10]. In each location, mosquitoes were collected in peri-urban and downtown at a minimum of 20 positive larval breeding places per site. Larvae/pupae of *Aedes* mosquitoes were transported to an insectary and pooled together according to the city and maintained until they emerged as adults before morphological identification using a suitable taxonomic key [31, 32]. Adult mosquitoes were maintained at insectary and reared in the controlled conditions (27 °C ± 2 °C; relative humidity 80% ± 10%). Mosquitoes identified as *Ae.*

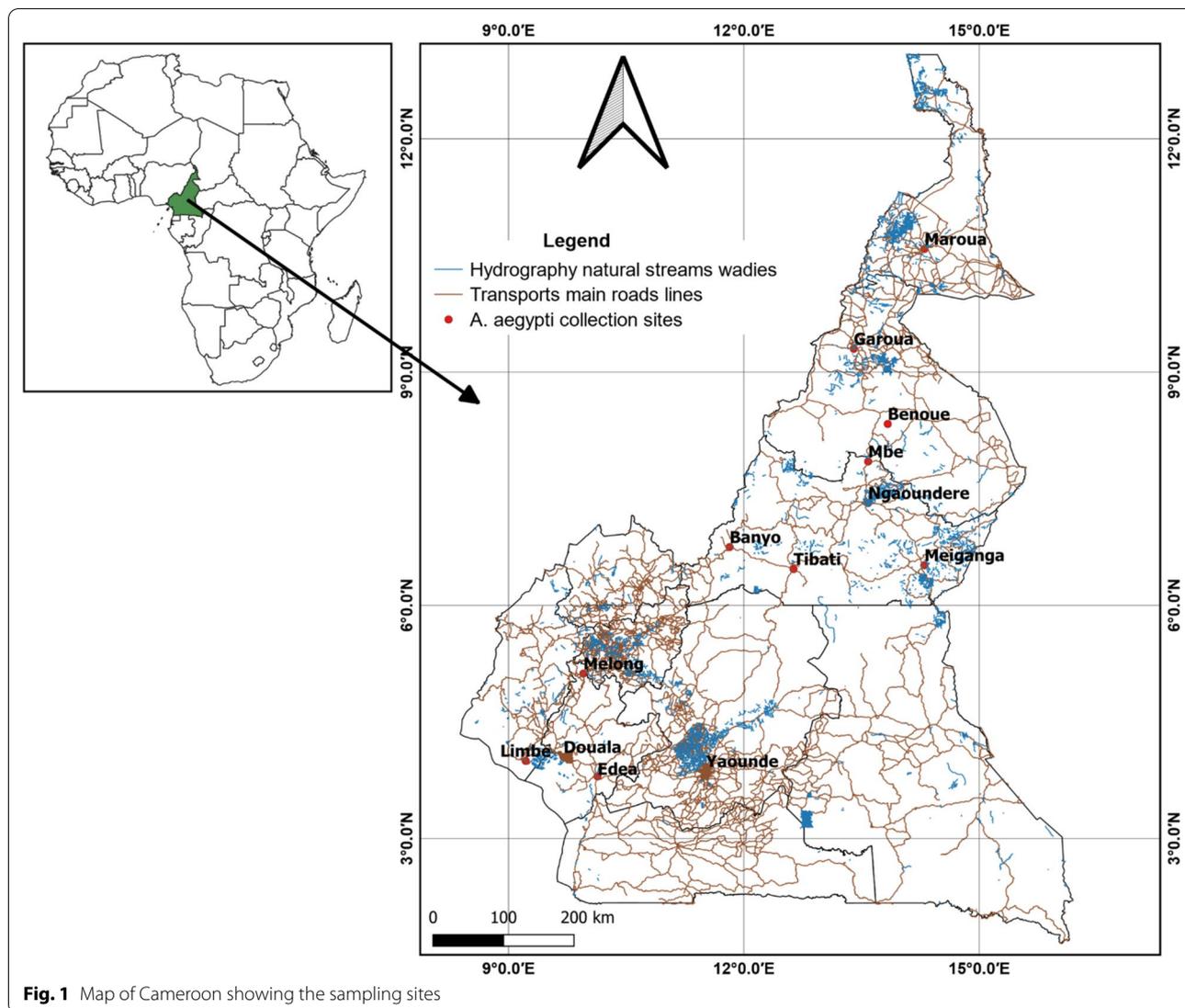


Fig. 1 Map of Cameroon showing the sampling sites

aegypti were reared until generation until G1/G2/G3. *Ae. aegypti* New Orleans (NO) strain was used as reference susceptible strain.

Insecticides susceptibility tests

Larval bioassays

Larval tests were conducted following World Health Organization (WHO) protocol [33]. The late third- and early fourth instar larvae were used for each mosquito population. Four replicates were tested with 20–25 larvae per replicate and per concentration. The susceptibility of larvae was evaluated against technical-grade temephos (97.3%; Sigma Aldrich-Pestanal, Seelze, Germany). First, stock solutions and serial dilution were prepared in 95% ethanol for temephos and stored at 4 °C. Seven concentrations ranging from 0.0005 and 0.006 mg/L

have been used to test both field strain and susceptible lab strain (New Orleans). Larvae were not fed during the experiment and the conditions of the room were 27 ± 2 °C (temperature) and 70 ± 10% (relative humidity). Larval mortality was recorded after 24 h of exposure to larvicide.

All the results were analyzed with win DL software (v. 2.0, CIRAD-CD, Montpellier, France) to determine the lethal concentration for 50% (LC₅₀) and 95% (LC₉₅) of the populations. Resistance ratios (RR₅₀ and RR₉₅) were calculated using LC₅₀ and LC₉₅ rates from *Ae. aegypti* field populations compared with the LC₅₀ and LC₉₅ rates of the reference strain. The resistance levels were ranked into three categories: low resistance (RR₅₀ < 5), medium or moderate resistance (5 ≤ RR₅₀ ≤ 10), and high resistance (RR₅₀ > 10) [33].

Insecticides susceptibility bioassays

Adult bioassays were carried out according to WHO guidelines [33]. Six insecticides were tested: 0.25% permethrin (Type I pyrethroid), 0.05% deltamethrin (Type II pyrethroid), 4% DDT (organochlorine), 0.1% propoxur (carbamate), 0.1% bendiocarb (Carbamate), and 1% fenitrothion (organophosphate). Four replicates of 20–25 unfed two to five days old female *Ae. aegypti* were exposed to insecticide-impregnated papers for 1 h under the insectary conditions described above, and then transferred to holding tubes with access to 10% sugar solution. The mortality rate was recorded 24 h later. The dead mosquitoes were stored in silica gel desiccant and the survivor in RNA later at -80 °C freezer. The resistance status was defined as follows: susceptible (mortality rate between 98 and 100%), probable resistance (mortality rate between 90 and 98%) and resistant (mortality rate inferior to 90%) [33].

Synergist assays

In order to investigate the potential role of oxidases in the metabolic resistance mechanism, synergist assay was performed in Douala population using 4% piperonyl butoxide (PBO). 2–5-day-old adults were pre-exposed for one hour to PBO-impregnated papers and immediately exposed to permethrin. Mortality was scored 24 h later and compared to the results obtained with permethrin without synergist according to the WHO standard [34]

F1534C *kdr* genotyping using allele specific polymerase chain reaction (PCR)

As previous study in Central Africa [18] had not reported any mutation associated to pyrethroid resistance, we decided to focus our analysis in F1534C mutation which is mostly found worldwide including in West Africa [21, 35]. For this purpose, genomic DNA of 30 individual mosquitoes per populations was extracted using Livak protocol [36]. That DNA was used to genotype the F1534C mutation which has been described to be associated to pyrethroids and DDT resistance. Allele specific PCR assays were performed following using Harris et al. protocol [37]. Each PCR reaction was performed in a 15 µl volume containing: 1 µl of DNA sample, 0.4 units of Kapa *Taq* DNA polymerase, 0.12 µl of 25 mmol/L dNTPs (0.2 mmol/L), 0.75 µl of 25 mmol/L MgCl₂ (1.5 mmol/L), 1.5 µl of 10× PCR buffer (1×), 0.51 µl of each primers (0.34 mmol/L). The amplification consisted of 95 °C for a 5 min heat activation step, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 45 s with a 10 min final extension step at 72 °C. The PCR products were separated on agarose gel 3% stained with Midori green.

Polymorphism of the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene

To assess the polymorphism of the *VGSC* gene and detect possible signatures of selection, a fragment of this gene spanning the F1534C mutation (a part of segment 6 of Domain III) was amplified and sequenced in 130 G₀ field collected mosquitoes from 13 locations across Cameroon. PCR reactions were carried out using 10 pmol of each primer [aegSCF7 (GAGAACTCGCCGATGAAC TT) and aegSCR7 (GACGACGAAATCGAACAGGT)] and 20 ng of genomic DNA as template in 15 µl reactions containing 1× Kapa *Taq* buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1U Kapa *Taq* (Kapa biosystems) [38]. The cycle conditions were 94 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by a final elongation step at 72 °C for 10 min. Amplicons from the PCR were analysed by agarose gel electrophoresis stained with Midori green and visualized under UV light. The amplified fragments of the expected size were purified using ExoSAP following manufacturer recommendations and directly sent for sequencing. The sequences were corrected with BioEdit software (v 7.1.8, London information retrieval ltd, London, UK) and aligned with Clustal W [39]. DNAsp (v 6.10.01, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) [40] was used to define the haplotype phase and compute the genetic parameters including the number of haplotypes (h), the number of polymorphism sites (S), haplotype diversity (Hd), and nucleotide diversity (π). The statistical tests of Tajima [41] and Fu Fs [42] were estimated with DnaSP in order to establish non-neutral evolution and deviation from mutation-drift equilibrium. Different haplotypes obtained and reference sequences were used to construct the maximum likelihood phylogenetic tree using Mega 6.0 [43]. A haplotype network was built using TCS [44] and TcsBu [45] programs to further assess the genealogical relationship between haplotypes.

Results

Larval bioassays

Larval assays were tested with temephos for three populations due to the limited number of larvae (Table 1). Analysis revealed that the resistance ratio for all populations tested was less than 2 suggesting the susceptibility of these populations to temephos.

Insecticide resistance profile in adults

Bioassays were performed in 10 *Ae. aegypti* populations collected across Cameroon (Figs. 2 and 3). Analysis revealed that four populations out of 10 were resistant to DDT with mortality rate ranging from 16.8% in Douala to 77.3% in Ngaoundéré populations. Six other populations

Table 1 Larval bioassays with temephos against *Aedes aegypti* larvae

Strain and Site	n	LC ₉₅ (mg/L) (95% CI)	RR ₉₅	LC ₅₀ (mg/L) (95% CI)	RR ₅₀
NO lab strain	531	0.0046 (0.0042–0.0051)	–	0.0026 (0.0025–0.0028)	–
Edéa	531	0.0046 (0.0036–0.0094)	1.00	0.0021 (0.0007–0.0028)	0.80
Douala	483	0.0078 (0.0069–0.0092)	1.68	0.0039 (0.0037–0.0042)	1.47
Yaoundé	537	0.0034 (0.00258–0.0069)	0.74	0.0015 (0.0009–0.0020)	0.59

n number of larvae tested; LC₉₅ and LC₅₀ 95 and 50% lethal concentrations; CI Confidence interval; RR resistance ratio; NO New Orleans

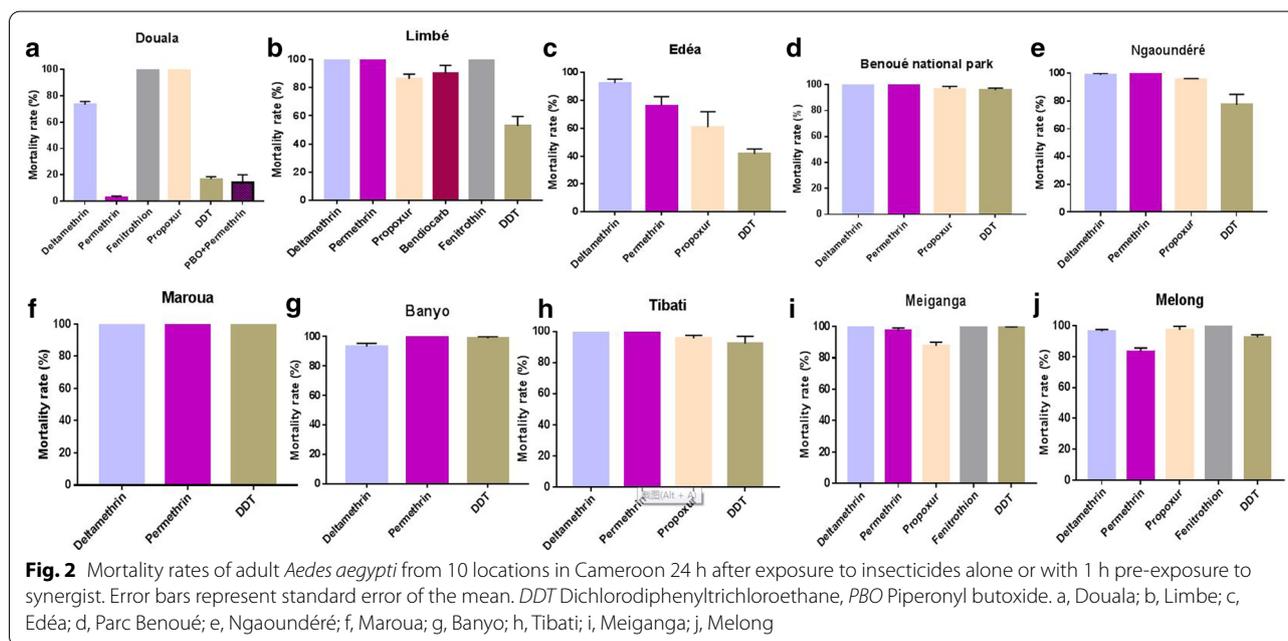


Fig. 2 Mortality rates of adult *Aedes aegypti* from 10 locations in Cameroon 24 h after exposure to insecticides alone or with 1 h pre-exposure to synergist. Error bars represent standard error of the mean. DDT Dichlorodiphenyltrichloroethane, PBO Piperonyl butoxide. a, Douala; b, Limbé; c, Edéa; d, Parc Benoué; e, Ngaoundéré; f, Maroua; g, Banyo; h, Tibati; i, Meiganga; j, Melong

were either probable resistant or susceptible with percentage of mortality varying from 92.32% in Tibati to 100% in Maroua. A good susceptibility level was observed against both pyrethroids tested, type I pyrethroid permethrin and type II pyrethroid deltamethrin, with six susceptible populations, two probable resistant and two resistant populations with lowest mortality rate (2.56%) in Douala population for permethrin (Fig. 2). A moderate level of resistance was reported against carbamates notably to propoxur for which mortality rates between of 60.82% and 87.71% in Edéa and in Meiganga populations, respectively. Nevertheless, probable resistance was detected in four populations with mortality rate ranging from 95.65% in Tibati to 97.33% in Melong. Only one population (Douala) was fully susceptible to propoxur. The unique population from Limbé tested to bendiocarb was resistant with mortality rate of 82.95%. All populations tested across Cameroon exhibited a full susceptibility toward the organophosphate fenitrothion

which is in line with temephos susceptibility observed in larvae (Fig. 3).

Synergist assay with PBO

The synergist assay analysis revealed a partial recovery of susceptibility to permethrin after PBO pre-exposure (Fig. 2) to Douala population ($2.56 \pm 1.48\%$ without PBO vs $14.28 \pm 5.8\%$ with PBO, $P < 0.005$) suggesting that the cytochrome P450 monooxygenases are also playing a role in pyrethroids resistance in this population.

F1534C *kdr* genotyping using allele specific PCR

A total of 331 specimens of *Ae. aegypti* from 13 locations across Cameroon was successfully amplified (Table 2). Among them, 320 (96.68%) were susceptible (1534 F/F), 8 (2.41%) were heterozygote resistant (1534 F/C), and 3 (0.91%) were homozygote resistant (1534 C/C). Overall, allelic frequency of susceptible was 0.98 while for resistant was 0.02. The F1534C mutation was found in only

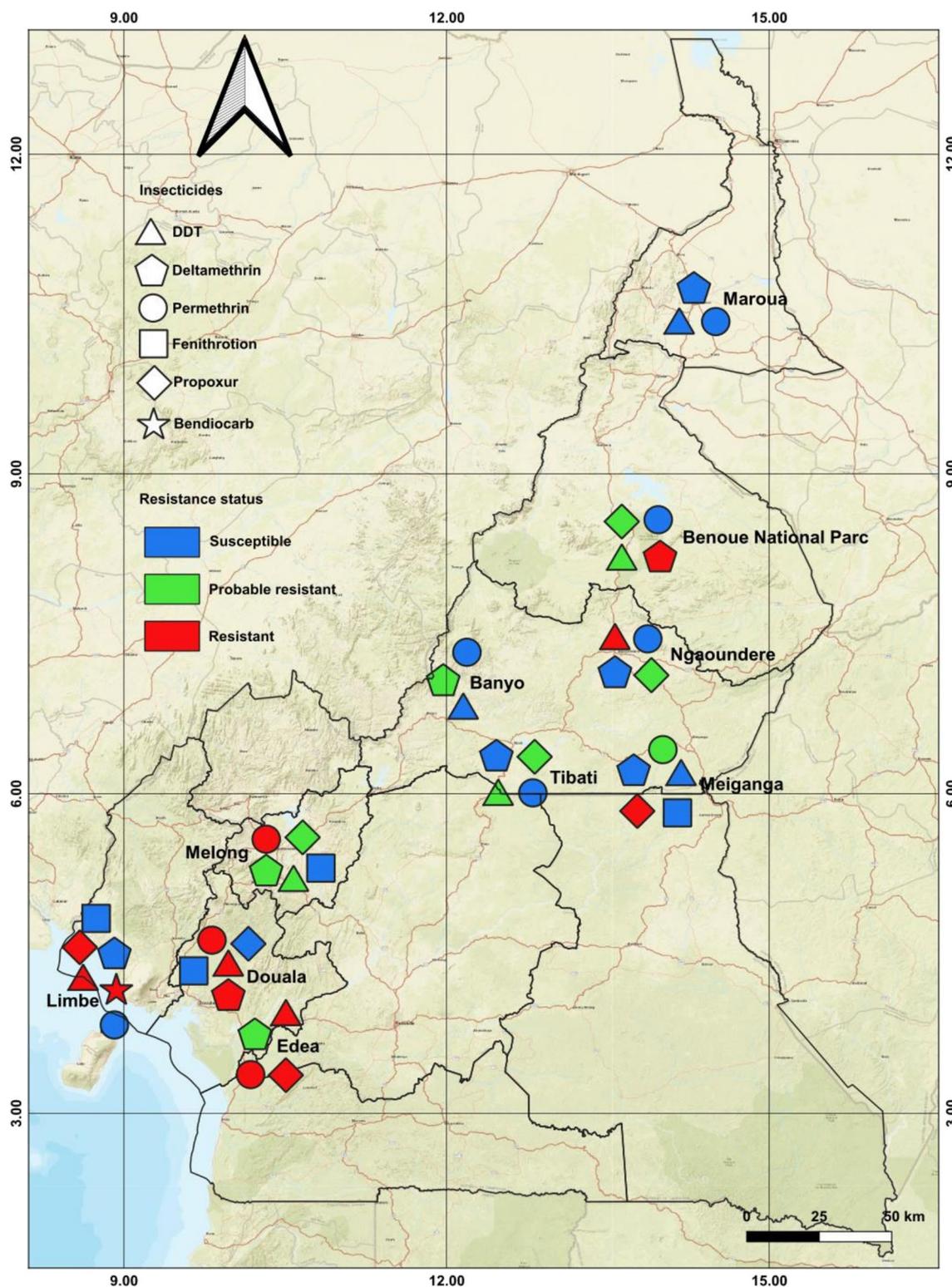


Fig. 3 Map showing the insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in Cameroon. DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane

Table 2 F1534C genotype numbers and the allelic frequency of the C mutation of *Aedes aegypti*

Location	F1534 genotypes			FF + FC + CC	Allelic frequencies	
	FF	FC	CC		% F	% C
Benoué national park	24	0	0	24	100	0
Maroua	27	0	0	27	100	0
Garoua	30	0	0	30	100	0
Mbé	17	0	0	17	100	0
Ngaoundéré	25	0	0	25	100	0
Banyo	29	0	0	29	100	0
Tibati	26	0	0	26	100	0
Meiganga	24	0	0	24	100	0
Edéa	29	0	1	30	96.67	3.33
Limbé	27	0	0	27	100	0
Douala	8	8	2	18	66.67	33.33
Melong	24	0	0	24	100	0
Yaoundé	30	0	0	30	100	0
Total	320	8	3	331	97.89	2.11

F: phenylalanine; C: cysteine; F/F: absence of the F1534C mutation; F/C: presence of the F1534C mutation with 2 alleles: one resistant, allele C and another susceptible allele; C/C: presence of the F1534C mutation with the 2 resistant alleles

two populations: Edéa and Douala with allelic frequencies of 3.33% and 33.33% respectively (Table 2).

Genetic diversity of VGSC in *Ae. aegypti*

One hundred and twenty-two field collected *Ae. aegypti* from 13 locations were successfully sequenced for a 201 bp fragment of the VGSC gene spanning the codon 1534. Analysis confirmed the presence of mutation 1534C in Douala and Edéa samples (Fig. 4). Overall, 25 polymorphic sites, 38 haplotypes (46 haplotypes, when taking into account insertions or deletions) with a high haplotype diversity (0.879) and low nucleotide diversity (0.010) (Table 3). Among these haplotypes,

H1 (15.98%), H10 (13.93%), H2 (9.83%) and H3 (9.42%) were the most represented (Fig. 5a). The resistant haplotype H36 was detected in Douala (80%) and Edéa (20%) populations (Fig. 5a, b). A maximum likelihood (ML) tree of the sequences analysed confirms a high diversity with the probable four clusters (Fig. 5c). Globally, all the statistics estimated were negatives ($D = -1.479$, $Fu's F_s = -33.498$) with $Fu's F_s$ statistically significant (Table 3). Negative values for these indexes indicate an excess of rare polymorphisms in a population and suggest a recent expansion of the gene studied across the populations or background selection.

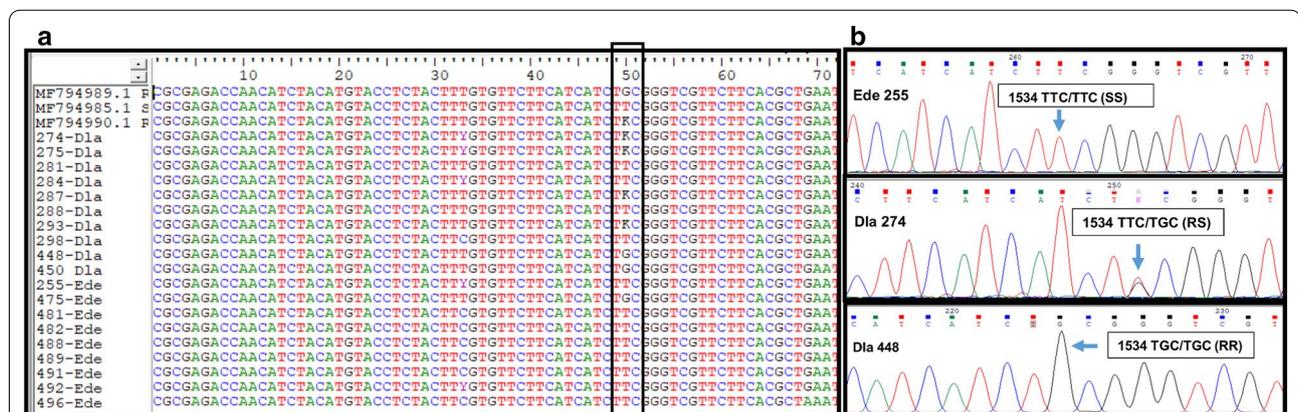


Fig. 4 3: Sequencing of the portion of the voltage gated sodium channel gene at the F1534C point mutation in field collected adult mosquitoes (F0), **b** Chromatogram traces showing the three genotypes at the 1534 coding position

Table 3 Genetic diversity parameters of F1534C mutation among Cameroonian *Aedes aegypti* populations

Populations	2N	S	Syn	Nsyn	π	H	Hd	D	Fu Fs
Benoué national park	20	5	4	1	0.006	6	0.726	-0.591	-1.874
Maroua	18	5	4	1	0.006	5	0.745	-0.703	-0.945
Garoua	20	9	7	2	0.011	9	0.863	-0.592	-3.113*
Mbe	18	9	8	1	0.014	9	0.922	0.023	-2.581*
Ngaoundéré	20	6	6	0	0.007	6	0.763	-0.479	-1.195
Banyo	16	7	5	2	0.012	9	0.908	0.318	-3.584*
Tibati	20	5	4	1	0.008	8	0.868	0.379	-3.062*
Meiganga	20	12	11	1	0.013	9	0.847	-1.020	-2.544*
Douala	20	6	4	2	0.008	7	0.784	-0.122	-1.850
Limbé	20	5	4	1	0.009	8	0.853	0.836	-2.590*
Melong	14	7	7	0	0.011	6	0.813	-0.097	-0.787
Yaoundé	20	5	4	1	0.006	7	0.800	-0.283	-2.653*
Edéa	18	8	6	2	0.009	9	0.895	-0.740	-4.088*
Total	244	25	18	8	0.010	38	0.879	-1.479	33.498***

2N, number of sequences; S, number of polymorphic sites; h, number of haplotypes; Hd, haplotype diversity; π , nucleotide diversity; Syn and Nsyn, synonymous and non-synonymous mutation; D and Fs, Tajima's D and Fu Fs statistics, *degree of significance

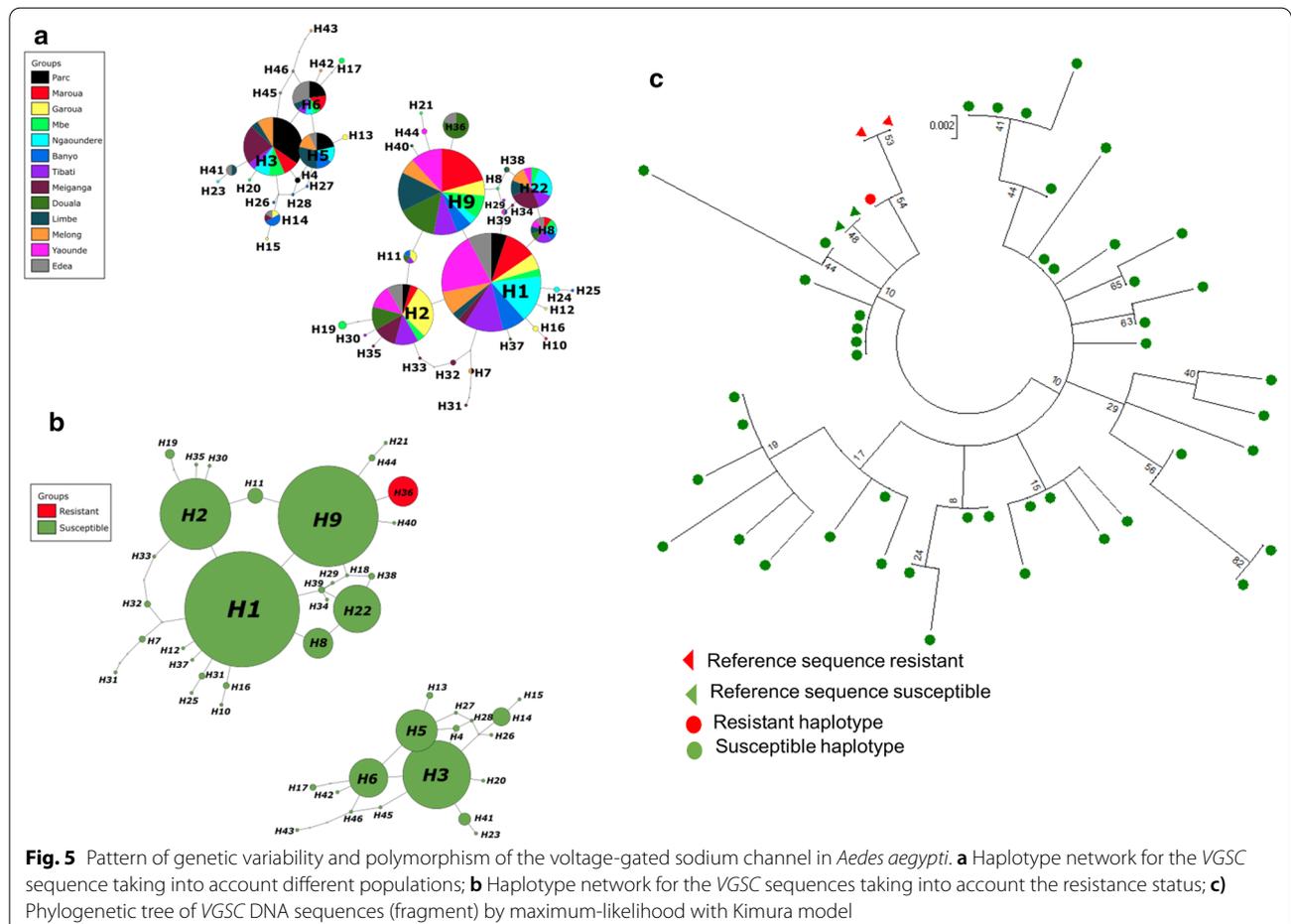


Fig. 5 Pattern of genetic variability and polymorphism of the voltage-gated sodium channel in *Aedes aegypti*. **a** Haplotype network for the VGSC sequence taking into account different populations; **b** Haplotype network for the VGSC sequences taking into account the resistance status; **c** Phylogenetic tree of VGSC DNA sequences (fragment) by maximum-likelihood with Kimura model

Discussion

This study investigated the nationwide insecticide profile of *Ae. aegypti* in Cameroon and assessed the contribution of F1534C *kdr* mutation in insecticide resistance. Larval bioassays analysis revealed that all *Ae. aegypti* populations tested were susceptible to the organophosphate temephos. This observation is similar to those made by previous studies from several countries in Central Africa such as in Cameroon [19], Central African Republic [18], and Republic of the Congo [24]. Nonetheless, the resistance of *Ae. aegypti* to this compound was reported in several countries such as in Laos [23], Brazil [46], Thailand [47], Malaysia [48], and Cape Verde [49]. This organophosphate is the larvicide mainly used to control *Aedes* larvae by treating water storage containers [46, 50, 51]. However, selection of the resistance results from extensive and long-term use of the product incriminated, whereas in our knowledge, temephos had never been used in vector control programs in Cameroon. This probably explains the full susceptibility reported in *Ae. aegypti* as suggested previously [19].

Adult bioassays analysis revealed that four *Ae. aegypti* samples were found resistant to DDT and the remaining were either susceptible or probably resistant. A decreasing susceptibility of the *Ae. aegypti* population from Yaoundé and Brazzaville towards DDT was already mentioned in 1970s [52], suggesting that this resistance may have resulted from a continuing selection pressure on *Aedes* populations as suggested previously [18, 19]. Indeed, recent study in Central Africa reported the resistance of *Ae. aegypti* to DDT [18, 20, 24]. The full susceptibility reported in some populations such as in Maroua and Meiganga shows that the DDT resistance is not nationwide in Cameroon and suggests that this compound can still be effective to control *Ae. aegypti*.

Aedes aegypti populations showed a good level of susceptibility toward type I pyrethroid permethrin with only three resistant populations out of 10 tested. The loss of susceptibility to this pyrethroid was previously reported in Cameroon [20] and outside Africa [23, 48]. Similarly, a good level susceptibility was reported against type II pyrethroid deltamethrin. These results suggest that the resistance to deltamethrin and permethrin has not yet spread country-wide and these insecticides are still effective to control *Aedes* in some locations of Cameroon. A loss of sensitivity was observed to carbamates notably propoxur with moderate level of resistance in some locations such as: Limbé, Edéa, and Tibati. This result is comparable to previous reports in the Republic of the Congo [24] and in Burkina Faso [29] in Africa and in several countries outside Africa such as Malaysia [48], Pakistan [53], and Saudi Arabia [54]. The source of selection driving the observed resistance to DDT, permethrin,

deltamethrin, propoxur and bendiocarb in some *Ae. aegypti* populations remains unclear notably as the use of insecticides against *Aedes* is limited in the region [19, 20]. As suggested previously [18, 20], domestic use of insecticides through the indoor spraying and impregnating bed nets, and agriculture use could be the main source of resistance selection in *Aedes* vectors in Central Africa. Indeed, the use of pesticides in agriculture for the protection of market gardening could also promote the emergence of resistance in mosquitoes by contamination of breeding sites and resting places of mosquitoes [55].

A partial recovery of susceptibility to permethrin was reported in Douala population after pre-exposure to PBO synergist. This result indicates that the cytochrome P450 monooxygenases are playing a role in the observed resistance perhaps in association with other enzyme families or/and other resistance mechanisms as the recovery was only modest. The implication of cytochrome P450 monooxygenases in *Ae. aegypti* resistance has been previously reported in several regions in the world including Central Africa the sub-region [18, 20].

The F1534C mutation is common in *Ae. aegypti* and has a worldwide distribution [22] although it was not yet detected in Cameroon [20]. Our analysis revealed the first evidence of this mutation in *Ae. aegypti* from two locations (Edéa and Douala) of Cameroon. This *kdr* mutation was previously reported in Africa in Ghana [21] and Burkina Faso [29, 35]. The allelic frequency of this mutation observed in Cameroon (3.3–33.3%) is low compared to those found in Ghana for example (33.3–68.42%) [21]. In fact, the result of neutrality test suggests a recent selection of this mutation in Cameroon with a potential origin from Douala. The presence of a unique resistant haplotype H36 support a unique origin of the 1534C allele in Cameroon probably in Douala with a gradual spread in the country. As Douala is the main port of Cameroon, it is not excluded that the 1534C may have been imported recently instead of a *de novo* local selection. Indeed, our sequences clustered with the reference sequences downloaded in GenBank (accession numbers: MF794989.1, MF794985.1 and MF794990.1) coming from Thailand [56].

The absence of a reduced diversity at the *VGSC* in Douala and Edéa as shown from ML tree and TCS haplotype network is due to recent selection of this resistant allele in these locations which is further supported by the low frequency of homozygote CC. However, these populations will need to be monitored as increasing pressure may lead to the further selection associated with reduced diversity as seen in other locations such as in Malaysia [48] for *Ae. aegypti*. Such increasing selection pressure on mosquitoes populations have also been observed for metabolic resistance genes such as *GSTe2* for the L119F

in Benin [57] or cytochrome P450 (*CYP6P9a/b*) [58–60] leading to drastic reduced diversity.

In addition, it will be interesting to genotype other mutations such as 1016 and 410 which have been found implicated in *kdr* resistance in *Ae. aegypti* [22, 28–30] and investigate the genes involved in metabolic resistance such as *CYP9* overexpressed in several regions worldwide including in Africa [35].

Conclusions

Our result revealed a variable level of susceptibility among populations towards insecticides tested across the country. The full susceptibility to organophosphates at both larval (temephos) and adult stages (fenitrothion) makes this insecticide class very suitable for control *Ae. aegypti* in Cameroon. Furthermore, this study revealed for the first time the presence of target site mutation F1534C in Cameroon. Data generated in this study could serve as baseline to implement further investigations and planning efficient insecticide-based interventions against *Ae. aegypti* in Cameroon.

Abbreviations

AS: Allele specific; DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane; DNA: Deoxyribonucleic acid; *kdr*: Knockdown resistance; LC: Lethal concentration; PBO: Piperonyl butoxide; PCR: Polymerase chain reaction; RR: Resistance ratio; VCRU: Vector control research unit; VGSC: Voltage-gated sodium channel; WHO: World Health Organization.

Acknowledgements

We thank the people living around all the different collection sites and the garage owners for their cooperation during the field investigations.

Authors' contributions

APY, BK, FN and CSW conceived and designed the experiments. APY, BK, and ANT participated in mosquito collections. APY and TAWB performed the bioassays. APY, TAWB, DNN and BK carried out the data analyses. APY conducted the molecular analyses. APY, BK and CSW wrote the paper. All authors read and approved final version of the manuscript.

Funding

This study was supported by the Wellcome Trust Training Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (204862/Z/16/Z) awarded to BK. The funders had no role in study design, data collection or analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

All the relevant data generated during this study are included in the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

An ethical clearance No. 2017/05/911/CE/CNERSH/SP was delivered by the Cameroonian National Ethics Committee for Human Health Research for this study. An oral consent form was obtained from the head or representative of each household owner prior to the survey.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Centre for Research in Infectious Diseases, P.O. Box 13591, Yaoundé, Cameroon. ² Parasitology and Ecology Laboratory, Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon. ³ Laboratory of Vertebrate and Invertebrate Bioecology, Faculty of Science and Technology, Marien-Ngouabi University, Brazzaville, Congo. ⁴ Laboratory of Biology and Applied Ecology, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University of Dschang, P.O. Box 96, Dschang, Cameroon. ⁵ Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke place, Liverpool L3 5QA, UK.

Received: 25 June 2020 Accepted: 19 October 2020

Published online: 02 November 2020

References

- Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Med*. 2008;5(3):e68.
- Simo FBN, Yousseu FBS, Mbarga AE, Bigna JJ, Melong A, Ntoute A, Kamgang B, Bouyne R, Fewou PM, Demanou M. Investigation of an outbreak of dengue virus serotype 1 in a rural area of Kribi, South Cameroon: a cross-sectional study. *Intervirology*. 2018;61(6):265–71.
- Tchuandom SB, Tchadji JC, Tchouangueu TF, Biloa MZ, Atabonkeng EP, Fumba MIM, Massom ES, Nchinda G, Kuiate J-R. A cross-sectional study of acute dengue infection in paediatric clinics in Cameroon. *BMC Public Health*. 2019;19(1):958.
- Monamele GC, Demanou M. First documented evidence of dengue and malaria co-infection in children attending two health centers in Yaounde, Cameroon. *PAMJ*. 2018;29:227.
- Yousseu FBS, Nemg FBS, Ngouanet SA, Mekanda FMO, Demanou M. Detection and serotyping of dengue viruses in febrile patients consulting at the New-Bell District Hospital in Douala, Cameroon. *PLoS ONE*. 2018;13(10):e0204143.
- Peyrefitte CN, Rousset D, Pastorino BA, Pouillot R, Bessaud M, Tock F, Mansaray H, Merle OL, Pascual AM, Paupy C. Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(5):768.
- Demanou M, Antonio-Nkondjio C, Ngapana E, Rousset D, Paupy C, Manuguerra J-C, Zeller H. Chikungunya outbreak in a rural area of Western Cameroon in 2006: a retrospective serological and entomological survey. *BMC Res Notes*. 2010;3(1):128.
- Noah BDN, Pouth FBB, Ndode C, Bohimbo C, Evouna A, Kouamen G, Els M. Yellow fever (YF) remains a public health problem in Cameroon: descriptive analysis of the national database (2010–2016, 50th epidemiological week). *PAMJ*. 2017;3(3):52.
- Gake B, Vernet MA, Leparac-Goffart I, Drexler JF, Gould EA, Gallian P. Lamballerie Xd: low seroprevalence of Zika virus in Cameroonian blood donors. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(4):481–3.
- Tedjou AN, Kamgang B, Yougang AP, Njiokou F, Wondji CS. Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(3):e0007137.
- Kamgang B, Vazeille M, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Yougang AP, Mousson L, Wondji C, Failloux A-B. Risk of dengue in Central Africa: vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):e0007985.
- Kamgang B, Vazeille M, Tedjou A, Yougang AP, Wilson-Bahun TA, Mousson L, Wondji CS, Failloux A-B. Different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Central Africa are susceptible to Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008163.
- Kamgang B, Vazeille M, Yougang AP, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Mousson L, Wondji CS, Failloux A-B. Potential of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transmit yellow fever virus in urban areas in Central Africa. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1636–41.
- Lenhart A, Orelus N, Maskill R, Alexander N, Streit T, McCall P. Insecticide-treated bednets to control dengue vectors: preliminary evidence from a controlled trial in Haiti. *Trop Med Int Health*. 2008;13(1):56–67.

15. WHO: Vector control operations framework for Zika virus. Geneva: WHO, WHO/ZIKV/VC/164. 2016;10.
16. Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Levy M, Alexander N, McCall PJ. Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomised trials. *BMJ*. 2006;332(7552):1247–52.
17. Polson KA, Rawlins SC, Brogdon WG, Chadee DD. Characterisation of DDT and pyrethroid resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*. *Bull Entomol Res*. 2011;101(4):435–41.
18. Ngoagouni C, Kamgang B, Brengues C, Yahouedo G, Paupy C, Nakoune E, Kazanji M, Chandre F. Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):599.
19. Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, Corbel V, Paupy C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasit Vectors*. 2011;4:79.
20. Kamgang B, Youngang AP, Tchoupo M, Riveron JM, Wondji C. Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasites Vectors*. 2017;10(1):469.
21. Kawada H, Higa Y, Futami K, Muranami Y, Kawashima E, Osei JH, Sakyi KY, Dadzie S, de Souza DK, Appawu M. Discovery of point mutations in the voltage-gated sodium channel from African *Aedes aegypti* populations: potential phylogenetic reasons for gene introgression. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):e0004780.
22. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, Raghavendra K, Pinto J, Corbel V, David J-P. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):e0005625.
23. Marcombe S, Fustec B, Cattel J, Chonephetsarath S, Thammavong P, Phommavanh N, David J-P, Corbel V, Sutherland IW, Hertz JC. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):e0007852.
24. Kamgang B, Wilson-Bahun TA, Youngang AP, Lenga A, Wondji CS. Contrasting resistance patterns to type I and II pyrethroids in two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Republic of the Congo, Central Africa. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1):1–10.
25. David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci*. 2013;368(1612):20120429.
26. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34(7):653–65.
27. Perry T, Batterham P, Daborn PJ. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011;41(7):411–22.
28. Haddi K, Tomé HV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF, Dong K, Oliveira EE. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Sci Rep*. 2017;7:46549.
29. Sombié A, Saïki E, Yaméogo F, Sakurai T, Shirozu T, Fukumoto S, Sanon A, Weetman D, McCall PJ, Kanuka H. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Trop Med Health*. 2019;47(1):2.
30. Ayres CF, Seixas G, Borrego S, Marques C, Monteiro I, Marques CS, Gouveia B, Leal S, Troco AD, Fortes F. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(5):e0008216.
31. Jupp PG. Mosquitoes of southern Africa: Culicidae and Toxorhynchitinae. Johannesburg: Ekogilde Publishers; 1996.
32. Edwards FW. Mosquitoes of the Ethiopian Region III-Culicidae adults and pupae. London: British Museum (Natural History); 1941.
33. WHO. Entomological surveillance for *Aedes* spp. in the context of Zika virus interim guidance for entomologists. Geneva: WHO; 2016.
34. WHO: Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Geneva: WHO, WHO/ZIKV/VC/161. 2016.
35. Badolo A, Sombié A, Pignatelli PM, Sanon A, Yaméogo F, Wangrawa DW, Sanon A, Kanuka H, McCall PJ, Weetman D. Insecticide resistance levels and mechanisms in *Aedes aegypti* populations in and around Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(5):e0007439.
36. Livak KJ. Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics*. 1984;107(4):611–34.
37. Harris AF, Rajatileka S, Ranson H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):277–84.
38. Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(3):217–21.
39. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series: 1999*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.: 95–98.
40. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol*. 2017;34(12):3299–302.
41. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):585–95.
42. Fu Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997;147(2):915–25.
43. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.
44. Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol*. 2000;9(10):1657–9.
45. dos Santos A, Cabezas M, Tavares A, Xavier R, Branco M. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*. 2016;32:627–8.
46. Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior AdJ: resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e180544.
47. Chaiphongpachara T, Moolrat L. Insecticide resistance of temephos on *Aedes aegypti* as dengue vector in Samut Songkhram, Thailand. *Ann Trop Med Public Health*. 2017;10(6):1439.
48. Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasit Vectors*. 2015;8:181.
49. Rocha HDR, Paiva MHS, Silva NM, de Araújo AP, da Moura AJF, Gómez LF, Ayres CF, de Melo Santos MAV. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. *Acta Trop*. 2015;152:66–73.
50. Marcombe S, Chonephetsarath S, Thammavong P, Brey PT. Alternative insecticides for larval control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Lao PDR: insecticide resistance and semi-field trial study. *Parasites Vectors*. 2018;11(1):1–8.
51. George L, Lenhart A, Toledo J, Lazaro A, Han WW, Velayudhan R, Ranzinger SR, Horstick O. Community-effectiveness of temephos for dengue vector control: a systematic literature review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0004006.
52. Mouchet J, Cordellier R, Germain M, Carnevale P, Barathe J, Sannier C. Résistance aux insecticides d'*Aedes Aegypti* L. et *Culex pipiens fatigans* en Afrique Centrale. *Cah ORSTOM SO Ent méd et Parasitol*. 1972;4:341–435.
53. Mohsin M, Naz SI, Khan IA, Jabeen A, Bilal H, Ahmad R, Alshamrani Y. IM E: susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* against insecticides at eastern Punjab, Pakistan. *Int J Mosq Res*. 2016;3(5):41–6.
54. Al Nazawi AM, Aqili J, Alzahrani M, McCall PJ, Weetman D. Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasites Vectors*. 2017;10(1):161.
55. Youngang AP, Kamgang B, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Njiokou F, Wondji CS. Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *PLoS ONE*. 2020;15(6):e0234572.
56. Saingamsook J, Saeung A, Yanola J, Lumjuan N, Walton C, Somboon P. A multiplex PCR for detection of knockdown resistance mutations, V1016G and F1534C, in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites Vectors*. 2017;10(1):465.
57. Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, Menze BD, Ismail HM, Hemingway J, Ranson H, Albert A. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol*. 2014;15(2):1.

58. Barnes KG, Weedall GD, Ndula M, Irving H, Mzihalowa T, Hemingway J, Wondji CS. Genomic footprints of selective sweeps from metabolic resistance to pyrethroids in African malaria vectors are driven by scale up of insecticide-based vector control. *PLoS Genet.* 2017;13(2):e1006539.
59. Mugenzi LMJ, Menze BD, Tchouakui M, Wondji MJ, Irving H, Tchoupo M, Hearn J, Weedall GD, Riveron JM, Wondji CS. Cis-regulatory CYP6P9b P450 variants associated with loss of insecticide-treated bed net efficacy against *Anopheles funestus*. *Nat Commun.* 2019;10(1):4652.
60. Weedall GD, Mugenzi LMJ, Menze BD, Tchouakui M, Ibrahim SS, Amvongo-Adjia N, Irving H, Wondji MJ, Tchoupo M, Djouaka R, et al. A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Sci Transl Med.* 2019;11(484):7386.

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Annexe 2 : liste des présentations orales à différentes conférences

1. YOUNGANG, A. P., KAMGANG MBOUHOM, B., TEDJOU, A. N., WILSON-BAHUN, T. A., NJIOKOU, F., & WONDJI, C. S. Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. [présentation orale], *6th PAMCA annual conference & exhibition (Cameroon), 23-25 September 2019.*

2. YOUNGANG, A. P., KAMGANG MBOUHOM, B., WILSON-BAHUN, T. A., TEDJOU, A. N., NGUIFFO-NGUETE, D., NJIOKOU, F., & WONDJI, C. S. First detection of F1534C knockdown resistance mutation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cameroon. [présentation orale], *second PAMCA Cameroon annual conference, Yaoundé-Cameroon, 06th-07th July 2021.*

Annexe 3 : poster présenté en conférence

YOU GANG, A. P., KAM GANG MBOUHOM, B., TEDJOU, A. N., WILSON-BAHUN, T. A., NJIOKOU, F., & WONDJI, C. S. Nationwide profiling of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon; [poster presentation] *Symposium scientifique pour les 60 ans du Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé 14-15 novembre 2019.*

Nationwide distribution of insecticide resistance in *Aedes albopictus* (Skuse), 1894 (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa

Aurelie P. Yougang^{1,2}, Basile Kamgang¹, Arnel Tedjou^{1,2}, Theodel A. Wilson Bahun^{1,2}, Flobert Njikou² and Charles Wondji^{1,4}

P41



¹ Centre for Research in Infectious Disease, P.O. Box 13591, Yaoundé, Cameroon
² Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon
³ Faculty of Science and Technology, Marie-Ngozi University, P.O. Box Brazzaville, Republic of Congo
⁴ Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke place, Liverpool L3 5QA, UK
 Email: aurelie.yougang@cris.cpi.iafrica.net



1 Introduction

Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse), 1894 is an invasive species that is currently found on all continents. It has been described in Central Africa for the first time in Cameroon in 2000s¹ and a few years later in most countries of the region². This species is considered to be one of the main epidemic vector of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus worldwide. In the absence of effective treatment and efficient vaccines, vector control remains the cornerstone to prevent transmission of these viruses.

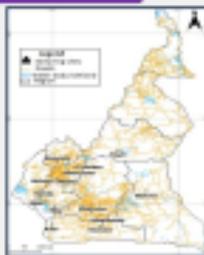
Aim: To establish the current susceptibility profile and the mechanisms involved in insecticide resistance of *A. albopictus* in Cameroon in order to prevent and facing against large outbreaks.

- 1) To assess the susceptibility profile of *A. albopictus* to insecticides
- 2) To search potential mechanism involved in insecticide resistance



Aedes albopictus

2 Methodology



Adult bioassays



- Insecticides**
- Fenitrothion 1% (Organophosphate)
 - Propoxur 0.7% and bendiocarb 0.7% (Carbamate)
 - DDT 4% (Organochlorine)
 - Deltamethrin 0.05% and permethrin 0.05% (Pyrethroid)
 - Pyrethrum in pyrethrin isolate (PI) or abate molecule (AB)
- ◊ Mortality > 95% = resistant confirmed
 ◊ Mortality 90-95% = possible resistant
 ◊ Mortality > 85% = susceptible

Larval bioassays

- Larvicides**
- Temephos (Organophosphate)
 - DDT (Organochlorine)
 - Deltamethrin (Pyrethroid)
- Analysis**
- +RR₅₀ < 5 = susceptible
 - +RR₅₀ between 5 + 10 = resistant
 - +RR₅₀ > 10 = highly resistant (WHO, 2016)

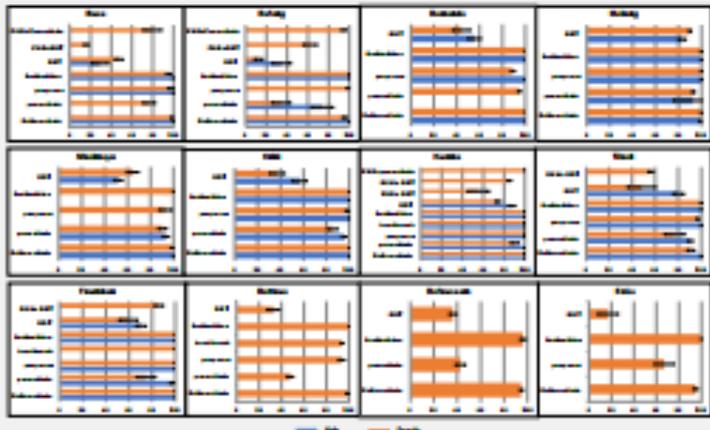


100-400 L3 or L4 and 7 stems of each larvicide 4 eggs per concentration

A. albopictus VCHU (left photo), Douala, Bafang, Bafoussam, Tibati, Edina

3 Results

Resistance profile of *A. albopictus* field strain to insecticides



Susceptibility of *Aedes albopictus* larvae to temephos

Strain and Site	N	LC ₅₀ (µg/L) (95% CI)	RR ₅₀	LC ₅₀ (µg/L) (95% CI)	RR ₅₀
VCHU	874	0.0068	*	0.0031	*
Bafang	129	(0.0012 = 0.0104)	1.07	(0.0018 = 0.0011)	1.08
Douala	132	(0.0016 = 0.0019)	1.27	(0.0012 = 0.0017)	1.32
Bafoussam	108	(0.0017 = 0.0112)	1.78	(0.0018 = 0.0015)	1.38
Tibati	107	(0.0011 = 0.0088)	1.12	(0.0011 = 0.0018)	1.38
Edina	103	(0.0010 = 0.0011)	0.80	(0.0010 = 0.0010)	0.96

Susceptibility of *Aedes albopictus* larvae to DDT

Strain and Site	N	LC ₅₀ (µg/L) (95% CI)	RR ₅₀	LC ₅₀ (µg/L) (95% CI)	RR ₅₀
VCHU	874	0.0038	*	0.0188	*
Bafang	128	(0.0012 = 0.0014)	1.39	(0.0018 = 0.0110)	1.04
Bafoussam	108	(0.0018 = 0.0019)	1.67	(0.0019 = 0.0017)	2.81
Tibati	107	(0.0017 = 0.001)	1.22	(0.0018 = 0.0017)	2.78
Edina	103	(0.0010 = 0.001)	0.78	(0.0010 = 0.0010)	0.81

All populations were susceptible to temephos and DDT

4 Discussion and conclusion

- ◊ Adult test showed high resistance to DDT and permethrin; moderate resistance to deltamethrin; low of susceptibility to propoxur and bendiocarb; full susceptibility to fenitrothion. Propoxur, bendiocarb and fenitrothion can be used in arbovirus vector control in Cameroon
- ◊ Full recovery with pre exposure to PBO suggesting that the cytochrome P450 are the main family enzyme involved in resistance of these populations;
- ◊ Partial recovery with pre exposure to PBO or DDM suggesting that cytochrome P450 and GSTs are not the only mechanisms implicated in the resistance observed.

Temephos and DDT larvicides could be used as alternative measure for the control of arbovirus vector in Cameroon however their use would be monitored !!!

5 Reference

1. Paupy C, Obama B, Kamgang B, Mouton R, Roussil D, Demasse W, Henne JF, Leray E, Simard F, 2006. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 16, 395-398.
2. Fontenille M, Tsetsi JC, 2001. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerging Infectious Diseases* 7, 1265-1267.
3. WHO, 2016. Entomological surveillance for *Aedes* spp. in the context of Zika virus infection outbreaks for entomologists 1-12

6 Funding and acknowledgment

This work was supported by a Wellcome Trust Training Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (204852) awarded to Basile Kamgang.