

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 ZOOLOGIE

LABORATORY OF ZOOLOGY

**Taxinomie et variations spatio-temporelles de la résistance
d'*Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Diptera: Culicidae) à la
deltaméthrine dans la Région du Nord-Cameroun**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D

en Biologie des Organismes Animaux

Option : Zoologie

par

MANDENG Stanislas Elysée

Matricule : 06Q373

Master ès-sciences

Jury

M. BILONG BILONG Charles Félix, Professeur, Université de Yaoundé I

Président

M. MIMPFOUNDI Rémy, Professeur, Université de Yaoundé I

Rapporteur

Mme ETANG Josiane, Maître de Conférences, Université de Douala

Rapporteur

M. NJIOKOU Flobert, Professeur, Université de Yaoundé I

Membre

M. KEKEUNOU Sévilor, Professeur, Université de Yaoundé I

Membre

M. MBIDA MBIDA Arthur, Maître de Conférences, Université de Douala

Membre



Année 2023

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°231460/UYI/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/SPDA/CB-nsr du 22 juin 2023 de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I, la thèse intitulée « **Taxonomie et variations spatio-temporelles de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Diptera : Culicidae) à la deltaméthrine dans la Région du Nord-Cameroun** » a été présentée et soutenue publiquement le **vendredi 14 juillet 2023** par l'étudiant **MANDENG Stanislas Elysée**, Matricule **06Q373**. Le document final a été corrigé suivant les recommandations du jury.

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

Fait à Yaoundé, le

Le Président du Jury


**Charles Félix
Bilong Bilong**
Professeur

Les Examineurs


Prof. Njoku

Le Chef de Département




**Charles Félix
Bilong Bilong**
Professeur

15 DEC 2023

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE 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 Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2022/2023
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 31 MAI 2023

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*
VICE-DOYEN / DPSAA: ATCHADE Alex de Théodore, *Professeur*
VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*
VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO ANGUE Monique, *Maître de Conférences*
Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*
Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (43)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	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	<i>Chef DAF / FS</i>
13.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
14.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
15.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
16.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
17.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
19.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
20.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
21.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
22.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste

23.	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
24.	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
25.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
26.	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
27.	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
28.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
29.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
30.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
31.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
32.	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
34.	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
35.	PECHANGO NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
36.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

37.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
38.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
39.	EYENGA Eliane Flore	Assistant	En Poste
40.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistant	En Poste
41.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistant	En Poste
42.	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
43.	WOGUIA Alice Louise	Assistant	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (52)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2.	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3.	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5.	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	CD et Vice Doyen/FMSB/UYI
7.	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
9.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
10.	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
11.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
12.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
13.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE
14.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

15.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
16.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18.	GOUNOUÉ KAMKUMO Raceline épouse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
19.	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
20.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
21.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
22.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
23.	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
24.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
25.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
26.	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
27.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
28.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

31.	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUNSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargé de Cours	En poste
36.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
37.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargé de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargé de Cours	En poste
42.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
43.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
44.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
45.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
46.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
47.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
48.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste

49.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Assistante	En poste
50.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
51.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
52.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
3.	MBOLO Marie	Professeur	En poste
4.	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5.	YOUMBI Emmanuel	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11.	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	<i>DAAC /UDla</i>
12.	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	En poste
13.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
14.	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT / MINRESI</i>
16.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18.	ONANA JEAN MICHEL	Maître de Conférences	En poste

19.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
20.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargée de Cours	En poste
21.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
22.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
23.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
24.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargé de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
25.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
26.	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Chargé de Cours	En poste
27.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
28.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
29.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
30.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
31.	TEMEGNE NONO Carine	Chargé de Cours	En poste
32.	MANGA NDJAGA JUDE	Assistant	En poste
33.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
34.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
----	--------------------	------------	--

2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen FS Univ.Ngaoundere</i>
6.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

8.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
9.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
11.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
12.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
13.	MBEY Jean Aime	Maître de Conférences	En poste
14.	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
15.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
16.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
17.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
18.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
19.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
20.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
21.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
22.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste

23.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
24.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
25.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
26.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
27.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
28.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (37)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
5.	WANDJI Jean	Professeur	En poste
6.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste

7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste

11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13.	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14.	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
15.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
16.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
17.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
18.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>DAAC/Uté Bertoua</i>
19.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
21.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23.	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
24.	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

25.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
26.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
27.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
28.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
29.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
31.	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
34.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargé de Cours	En poste
35.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

36.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Assistant	En poste
37.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général/ MINESUP</i>

3.	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINOUE HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste

9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
11.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
12.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
13.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
14.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
15.	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
16.	NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES	Chargé de Cours	En poste
17.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

19.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21.	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
22.	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département</i>
----	-----------------------	------------	----------------------------

2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
17.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
19.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
20.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
21.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste

22.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
23.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
24.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
25.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
26.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste

27.	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
29.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
30.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
31.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
32.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste
33.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>

3.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
4.	BOUGNOM Blaise Pascal	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.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
9.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

10.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
11.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
12.	MEYIN A EBONG Solange	Chargé de Cours	En poste
13.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargé de Cours	En poste
14.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
15.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargé de Cours	En poste
16.	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
17.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

18.	NKOUÉ TONG Abraham	Assistant	En poste
19.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistant	En poste
20.	EZO'O MENGO Fabrice Téléfor	Assistant	En poste
21.	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste

22.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistant	En poste
23.	NGOUEMAM Romial Joël	Assistant	En poste
24.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (43)

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. Uité Ngaoundéré</i>
4.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5.	HONA Jacques	Professeur	En poste
6.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
9.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10.	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINR ESI</i>
12.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FSUniv/Bda</i>
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	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
17.	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	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.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MEL'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
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 Sylvie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>
30.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>En stage depuis février 2023</i>
31.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
32.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
33.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
34.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste

35.	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
36.	FOUEJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cell. MINADER</i>
37.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
38.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
39.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	Directeur Unité de production des réactifs/IMPM
40.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	NGA ONGODO Dieudonné	Assistant	En poste
43.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

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

1.	BITOM Dieudonné-Lucien	Professeur	<i>Doyen / FASA /UDs</i>
2.	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
8.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

9.	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	En poste
11.	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
12.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
14.	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
15.	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i>
16.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
17.	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
19.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
20.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
21.	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
22.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
23.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
25.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

26.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
27.	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
28.	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
29.	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	En poste
30.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
31.	MBESSE Cécile Olive	Chargée de Cours	En poste
32.	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33.	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef Serv./Uté Maroua</i>
34.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
37.	TCHAPCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
38.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
39.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
40.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

41.	KOAH NA LEBOGO Serge Parfait	Assistant	En poste
42.	NGO'O ZE ARNAUD	Assistant	En poste
43.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	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)	15 (11)	13 (03)	7 (05)	43 (20)
BPA	14 (01)	16 (09)	18 (04)	4 (02)	52 (16)
BPV	6 (01)	12 (02)	13 (07)	3 (00)	34 (10)
CI	7 (01)	15 (04)	5 (01)	1 (00)	28 (06)
CO	6 (01)	18 (04)	11 (04)	2 (00)	37 (09)
IN	2 (00)	2 (00)	14 (01)	4 (00)	22 (01)
MAT	1 (00)	8 (00)	17 (01)	7 (02)	33 (03)
MIB	2 (01)	7 (03)	8 (04)	7 (02)	24 (10)
PHY	15 (01)	15 (04)	11 (01)	2 (00)	43 (06)
ST	8 (00)	17 (03)	15 (04)	3 (01)	43 (08)
Total	69 (07)	125 (40)	125 (30)	40 (12)	359 (89)

Soit un total de **359 (89)** dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **125 (40)**
- Chargés de Cours **125 (30)**
- Assistants **40 (12)**

() = Nombre de Femmes **89**

DÉDICACE

À ma tendre et chère maman

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Recherche sur le Paludisme de l'Organisation de Coopération pour la Lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC). Nous avons bénéficié de l'appui financier de la fondation « Bill and Melinda Gates » et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à travers le projet « Impact of Insecticide resistance » Grant Number : 48499101. Les travaux ont été menés à bien grâce à la collaboration et au soutien de nombreux organismes et personnes à qui je désire exprimer ma profonde gratitude et adresser mes sincères remerciements. Il s'agit de :

- Madame le Professeur ETANG Josiane Désirée qui m'a intégré dans son équipe de recherche et m'a proposé ce sujet de recherche ; de plus, elle a montré beaucoup de disponibilité et de patience dans la direction de ce travail. Ses conseils et sa rigueur m'auront aidé à relever le défi des difficultés de mon initiation à la recherche de terrain et de laboratoire sur « la résistance des insectes aux insecticides » ;

- Monsieur le Secrétaire Exécutif de l'OCEAC, Docteur OBIANG ADA Manuel-Nso, pour m'avoir accordé un stage académique dans l'institution dont il a la charge ;

- Professeur MIMPFOUNDI Rémy a bien voulu accepter d'en assumer la co-direction ; je lui adresse toute ma profonde gratitude ;

- Professeur BILONG BILONG Charles Félix pour ses critiques judicieuses qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce travail, qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour sa générosité et sa contribution pour ma formation ;

- Docteur AWONO AMBENE Parfait, Docteur ANTONIO-NKONDJIO et Docteur NWANE Philippe qui ont mis à ma disposition de la documentation, leurs conseils ont éclairé mon expérimentation, et Monsieur PIAMEU CHADOU Michael qui m'a initié à différentes techniques de laboratoire ; je voudrais leur dire à tous merci ;

- tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales pour la formation académique qu'ils m'ont offerte durant tout mon cursus universitaire, aux enseignants de Zoologie dont les Professeurs DJIETO LORDON Champlain, KEKEUNOU Sévilor et ALENE Désirée ;

- l'équipe de techniciens du Laboratoire, notamment Monsieur TOTO Jean Claude, Monsieur ONANA Etienne, Monsieur AGBOR Jean Pierre et feu Monsieur TCHIKAMGWA Isaac pour avoir su apporter leur expérience pour la collecte et l'analyse du matériel biologique ;

- le Doctorant FESUH Bertrand, les Docteurs EKOKO EYISAP Wolfgang et MBAKOP Lili Ranaise pour leur collaboration et leur assistance dans le traitement des données statistiques ;

- tous mes camarades de promotion, notamment Dr NDOGMO KENFACK Michel, Dr NANGA NANGA Samuel, Monsieur AKOUMBA John Francis et feu Dr KOPYA Edmon ; leurs suggestions m'ont été d'une grande utilité ;

- ma famille, si grande et dont je ne saurais énumérer les noms de tous les membres ; je ne peux pas de trouver les mots pour leur exprimer ma reconnaissance pour leur assistance pluridimensionnelle ;

- ma sœur ATSINA Michelle Nicaise, mes frères ONGEUTOU Emmanuel Junior et ONGUETOU ONGUETOU Emmanuel Yves, mes enfants EYENGA MANDENG Leslie Sheta et ONGUETOU MANDENG Parfait David pour leur présence physique et morale.

Je ne saurais oublier de remercier mon feu papa ONGUETOU MENDENG Emmanuel et ma maman Madame veuve ONGUETOU Marie pour tous les sacrifices consentis à mon éducation, pour leur amour, leur attention et leur rigueur ; papa je penserai toujours à toi.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont accordé un quelconque soutien trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

SOMMAIRE

	Page
ENSEIGNANTS PERMANENTS DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I.....	i
DÉDICACES	xii
REMERCIEMENTS	xiii
SOMMAIRE	xv
LISTE DES FIGURES	xviii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxi
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES	xxiv
RÉSUMÉ.....	xxvi
ABSTRACT	xxviii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE	6
I.1 Généralités sur le paludisme	7
I.2 Espèces plasmodiales	7
I.3 Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	8
I.4 Vecteurs du paludisme en Afrique	10
I.5 Position taxinomique des anophèles (<i>Anopheles gambiae</i> s.l.).....	10
I.6 Cycle de développement des anophèles	11
I.6.1 Phase aquatique	12
I.6.2 Phase aérienne	12
I.7 Complexe <i>Anopheles gambiae</i>	13
I.7.1 <i>Anopheles gambiae</i> s.s. Giles, 1902	13
I.7.2 <i>Anopheles arabiensis</i> Patton, 1905.....	14
I.7.3 <i>Anopheles melas</i> Theobald, 1903	14
I.7.4 <i>Anopheles merus</i> Dönitz, 1902.....	14
I.7.5 <i>Anopheles bwambae</i> White, 1985	14
I.7.6 <i>Anopheles quadriannulatus</i> A Theobald, 1911	15
I.7.7 <i>Anopheles quadriannulatus</i> B Hunt, 1998	15
I.8 Fondements de la lutte contre les vecteurs du paludisme	15
I.8.1 Méthodes de lutte chimique.....	16
I.8.2 Méthodes de lutte physique	18
I.8.3 Méthodes de lutte physico-chimique	18

I.8.4 Méthodes de lutte biologique	19
I.8.5 Méthodes de lutte génétique	19
I.8.6 Lutte contre les vecteurs du paludisme au Cameroun	19
I.9 Résistance des moustiques aux insecticides	20
I.9.1 Définition.....	20
I.9.2 Mécanisme de résistance	20
I.9.3 Facteurs conditionnant l'évolution de la résistance.....	25
I.9.4 Gestion de la résistance	26
I.10 Apport de la spatialisation dans la lutte antivectorielle.....	27
I.11 Situation du paludisme au Cameroun.....	27
I.11.1 Faciès épidémiologiques du paludisme au Cameroun.....	28
I.11.2 Vecteurs et transmission du paludisme.....	28
I.11.3 Traitement.....	29
CHAPITRE II : CADRE GÉOGRAPHIQUE, MATÉRIEL ET MÉTHODES	30
II.1 Cadre géographique	31
II.1.1 Sites d'étude.....	31
II.1.2 Milieu naturel et population humaine de la Région du Nord	34
II.1.3 Activités agricoles	34
II.1.4 Indice de brillance (bâti) de la zone d'étude	34
II.2 Matériel et méthodes.....	35
II.2.1 Collecte des larves d'anophèles et élevage en insectarium.....	35
II.2.2 Etudes taxinomiques d' <i>A. gambiae</i> s.l.	36
II.2.3 Tests de sensibilité aux insecticides	40
II.2.4 Caractérisation moléculaire des spécimens d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	45
II.2.5 Recherche des mutations « kdr » L995F et L995S chez <i>A. gambiae</i> s.l	50
II.2.6 Analyses des données.....	56
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	59
III.1 Résultats.....	60
III.1.1 Données taxinomiques chez <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	60
III.1.2 Variations spatio-temporelles de la résistance d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine 0,05%.....	89
III.1.3 Mécanismes de résistance	109
III.2 Discussions	126
III.2.1 Etude taxinomique d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	126

III.2.2 Résistance d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine 0,05%	128
III.2.3 Mécanismes de résistance d' <i>A. gambiae</i> s.l.	130
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	133
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136
ANNEXES	155

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pays présentant des cas autochtones de paludisme en 2000 et leur statut en 2018.....	7
Figure 2 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> chez l'homme et l'anophèle.....	9
Figure 3 : Cycle de développement des anophèles.....	12
Figure 4 : Carte du Nord-Cameroun montrant les districts santé étudiés et les sites de collecte des anophèles.....	32
Figure 5 : Schéma d'une aile d' <i>A. gambiae</i> s.l. illustrant la nomenclature des taches de l'aile et les nervures.....	37
Figure 6 : Schéma des palpes maxillaires d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	37
Figure 7 : Schéma de la patte postérieure d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	37
Figure 8 : Adulte femelle type d' <i>A. gambiae</i> d'après Holstein, 1949.....	38
Figure 9 : Illustration des mesures évaluant la forme de l'aile d'anophèle.....	39
Figure 10 : Illustration des différentes étapes du test de sensibilité aux insecticides.....	41
Figure 11 : Illustration de l'autocorrélation spatiale.....	43
Figure 12 : Schéma illustrant le principe de la PCR.....	47
Figure 13 : Représentation schématique d'une copie de l'ADN ribosomal.....	47
Figure 14 : Différentes étapes et cycles de températures d'une PCR pour l'identification des espèces du complexe <i>A. gambiae</i>	49
Figure 15 : Photographie d'un gel montrant l'identification simultanée des espèces du complexe <i>A. gambiae</i>	50
Figure 16 : Illustration du principe de la technique HOLA pour la détection de l'allèle résistant 995F du gène « kdr »	51
Figure 17 : Cycles des températures d'une PCR de la mutation « kdr ».....	52
Figure 18 : Cycles de températures d'une réaction de ligation pour la détection de la mutation « kdr ».....	54
Figure 19 : Plaque de microtitration présentant la réaction des différents génotypes de la mutation « kdr » obtenue par la technique HOLA.....	55
Figure 20 : Variations pigmentaires des segments de la nervure costale sur les ailes de moustiques examinés.....	64
Figure 21 : Variations pigmentaires des segments de la nervure radiale R1 sur les ailes de moustiques examinés.....	71

Figure 22 : Variations pigmentaires des segments des nervures radiales R2 et R3 sur les ailes de moustiques examinés.....	72
Figure 23 : Variations pigmentaires des segments des nervures médianes M1 et M2 sur les ailes de moustiques examinés.....	73
Figure 24 : Variations pigmentaires des segments de la nervure anale 1A sur les ailes de moustiques examinés.....	74
Figure 25 : Variations pigmentaires des segments de la frange alaire sur les ailes de moustiques examinés.....	75
Figure 26 : Taux de la mortalité causée par la deltaméthrine 0,05% dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. du District de Santé de Garoua au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015.....	95
Figure 27 : Taux de la mortalité causée par la deltaméthrine 0,05% dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. du District de Santé de Pitoa au Nord-Cameroun entre 2011 et 2014.....	98
Figure 28 : Taux de la mortalité causée par la deltaméthrine 0,05% dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. du District de Santé de Mayo Oulo au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015.....	101
Figure 29 : Evolution spatio-temporelle du niveau de sensibilité des moustiques à la deltaméthrine dans les sites d'étude des trois districts de santé de 2011 à 2015.....	104
Figure 30 : Distribution spatio-temporelle du taux de mortalité (TM24) et des temps de « knockdown » (Tkd50) de 2011 à 2015.....	106
Figure 31 : Variations de la fréquence relative des différentes espèces en fonction des taux de mortalité dans les sites de collecte entre 2011 et 2015.....	109
Figure 32 : Taux de la mortalité causée par la deltaméthrine associé au synergiste PBO dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015.....	114
Figure 33 : Taux de la mortalité causée par la deltaméthrine associé au synergiste DEF dans les échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015.....	117
Figure 34 : Carte des facteurs individuels montrant les interactions entre les sites en fonction des districts de santé sur les deux premières composantes principales [Dim 1 (16,57%) et Dim 2 (9,76%)] de l'analyse multifactorielle.....	124

Figure 35 : Cercle de corrélation pour le suivi des données quantitatives
(taux de mortalité, allèle « kdr » 995F, composition des
espèces et année) sur les deux premières composantes principales
[Dim 1 (16,57%) et Dim 2 (9,76%)] de l'analyse multifactorielle.....125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Sites de collecte des larves de moustiques et faciès écologiques.....	33
Tableau II : Terminologie comparative pour les nervures de l'aile.....	38
Tableau III : Composition du milieu réactionnel d'une PCR pour l'indentification des espèces du complexe <i>A. gambiae</i>	48
Tableau IV : Composition du milieu réactionnel d'une digestion enzymatique spécifique d' <i>A. gambiae</i> s.s. et d' <i>A. coluzzii</i>	49
Tableau V : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification PCR du fragment d'ADN renfermant le locus « kdr ».....	52
Tableau VI : Séquences des différentes amorces utilisées pour la ligation.....	53
Tableau VII : Composition du milieu réactionnel d'une ligation à chaud pour la détection de la mutation « kdr ».....	53
Tableau VIII : Calcul des fréquences génotypiques et alléliques.....	57
Tableau IX : Distribution d'abondance des espèces du complexe <i>A. gambiae</i> soumis à l'étude taxinomique.....	60
Tableau X : Terminologie des taches pâles sur les nervures et la frange de l'aile.....	62
Tableau XI : Description et fréquences des caractères pigmentaires des segments de nervures des ailes chez les femelles d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	65
Tableau XII : Description et fréquences des caractères pigmentaires des segments de nervures des ailes chez les mâles d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	67
Tableau XIII : Description des morphotypes alaires chez les espèces femelles et mâles d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	78
Tableau XIV : Distribution des proportions des morphotypes alaires dans les populations femelles d' <i>A. gambiae</i> s.l. en fonction des districts de santé.....	82
Tableau XV : Distribution des proportions des morphotypes alaires dans les populations mâles d' <i>A. gambiae</i> s.l. en fonction des districts de santé.....	84
Tableau XVI : Mensurations en millimètres des ailes d' <i>A. gambiae</i> s.l.....	86
Tableau XVII : Longueurs des segments de la patte métathoracique et valeurs de l'indice palpal.....	88

Tableau XVIII : Temps de « <i>knockdown</i> (Tkd50, Tkd95) » en minutes et statut de la sensibilité d' <i>A. gambiae</i> souche Kisumu exposée à la deltaméthrine seule ou associée aux synergistes.....	89
Tableau XIX : Suivi du niveau de sensibilité des échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine à 0,05% dans la Région du Nord de 2011 à 2015.....	91
Tableau XX : Temps de « <i>knockdown</i> (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine à 0,05% à Garoua.....	93
Tableau XXI : Temps de « <i>knockdown</i> (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine à 0,05% à Pitoa.....	97
Tableau XXII : Temps de « <i>knockdown</i> (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine à 0,05% à Mayo Oulo.....	100
Tableau XXIII : Evaluation de l'autocorrélation spatiale entre les sites d'étude en fonction des années.....	105
Tableau XXIV : Distribution des espèces du complexe <i>A. gambiae</i> en fonction du profil évolutif de la résistance à la deltaméthrine 0,05% entre 2011 et 2015.....	108
Tableau XXV : Temps de « <i>knockdown</i> (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi de la sensibilité des échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine à 0,05% associée au PBO dans les districts de Santé de Garoua, Mayo Oulo et Pitoa de 2011 à 2015.....	112
Tableau XXVI : Temps de « <i>knockdown</i> (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi de la sensibilité des échantillons d' <i>A. gambiae</i> s.l. à la deltaméthrine à 0,05% associée au DEF dans les districts de Santé de Garoua, et Pitoa de 2011 à 2015.....	116
Tableau XXVII : Fréquences relatives des allèles « <i>kdr</i> » 995F et 995S et conformité de l'équilibre de Hardy-Weinberg dans les populations d' <i>A. arabiensis</i>	120
Tableau XXVIII : Fréquences relatives des allèles « <i>kdr</i> » 995F et 995S et conformité de l'équilibre de Hardy-Weinberg dans les populations d' <i>A. coluzzii</i>	121

Tableau XXIX : Fréquences relatives des allèles « kdr » 995F et 995S
et conformité de l'équilibre de Hardy-Weinberg dans
les populations d'*A. gambiae* s.s.....122

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

AChE :	AcétylCholinestérase
BSA :	Bovine Serum Albumin
Csvd :	Canal sodium voltage dépendant
CTAB :	Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide
DDT :	Dichloro Diphényl Trichloroéthane
DEF :	s,s,s-tributylphosphotriothioate
DEM :	Diéthyl Maléate
dNTP :	désoxyribonucléotide triphosphate
dNTPs :	désoxyribonucléotides triphosphate stock
DS :	District de Santé
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide
ENS :	Estérase Non Spécifique
ETS :	External Transcribed Spacer
GABAr :	récepteur de l'Acide Gamma-Aminobutyrique
GST :	Glutathion S-Transférerase
HCl:	Chlorure d'Hydrogène
Hhal :	<i>Haemophilus haemoliticus</i>
HOLA :	Heated Oligonucleotid Ligation Asssay
IC :	Intervalle de Confiance
IGS :	Intergenic Spacer
IRAC :	Insecticide Resistance Action Committee
ITS :	Internal Transcribed Spacer
kdr :	knockdown resistance
MII :	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide
MILDA :	Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action
ml ; mm :	millilitre ; millimètre
mM ; nM :	millimolaire ; nanomolaire
NaCl :	Chlorure de Sodium
NaOH :	Hydroxyde de Sodium
OCEAC :	Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé

OPs :	Organophosphorés
pb :	paire de bases
PBO :	Pipéronyl Butoxide
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PH :	Potentiel Hydrogène
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rtkd :	Rapport des temps de knockdown
s.l. :	sens large
s.s. :	sens strict
SOD :	Superoxyde Dismutase
SODECOTON :	Société de Développement du Coton
Taq :	<i>Thermus aquaticus</i>
Tkd :	Temps de knockdown
TMB :	Tétraméthyl Benzidine
TNE :	Tris-Sodium Ethylène diamine tétra-acétique acide
TPX :	Thioredoxine Peroxidase
TrKd :	Taux de réversion de l'effet knockdown
trs/min :	tours par minute
WHO :	World Health Organization
WHOPES :	World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme.
CYP:	Cytochrome

RÉSUMÉ

En Afrique, le développement et l'expansion rapide de la résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides met à rude épreuve les actions de prévention et de lutte contre le paludisme. La présente étude visait à caractériser la dynamique de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine dans le Nord-Cameroun ; plus spécifiquement il s'agissait d'identifier, à l'aide des caractères morphologiques et moléculaires, les espèces du complexe *A. gambiae* impliquées dans la résistance aux insecticides, d'évaluer les variations spatio-temporelles de cette résistance et de déterminer les différents mécanismes qui y sont impliqués. Les larves de moustiques ont été collectées chaque année entre octobre et novembre, durant cinq années consécutives (2011-2015) dans trois districts de santé (DS) du Nord-Cameroun : Garoua, Pitoa et Mayo Oulo. Les études taxinomiques et les analyses de biologie moléculaire ont été réalisées entre avril 2013 et juillet 2017. Pour les études morphologiques, des moustiques adultes ont été disséqués ; les ailes, les pattes et les palpes maxillaires ont été délicatement enlevés du corps et montés entre lame et lamelle. La sensibilité des moustiques à la deltaméthrine a été évaluée en utilisant le protocole des tests de sensibilité de l'OMS pour moustiques adultes. Les parties restantes des spécimens disséqués pour les études taxinomiques et les spécimens des tests de sensibilité ont été utilisés pour l'identification des espèces en utilisant la PCR-RLFP. Les allèles « kdr » responsables de la résistance aux pyréthrinoïdes ont été génotypés à l'aide de la « hot oligonucleotide ligation assay » (HOLA). Au total, 229 spécimens ont été examinés pour les études taxinomiques ; cent quarante deux de ces moustiques étaient des femelles et 87 des mâles. Parmi ces spécimens, trois espèces d'*A. gambiae* s.l. ont été identifiées, notamment *A. arabiensis* (52%) espèce majoritaire, suivie d'*A. coluzzii* (33%) et d'*A. gambiae* s.s. (15%). Les études morpho-taxinomiques ont montré l'existence d'une très grande variabilité inter et intraspécifique, en particulier chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii*, comparativement à *A. gambiae* s.s.; en effet, nous avons observé 28 variants sur les nervures des ailes examinées. Chez les femelles, 13 caractères pigmentaires nous ont permis d'obtenir 31 morphotypes; parmi ces morphotypes, trois n'ont été retrouvés que chez *A. arabiensis* (de Mor₁ à Mor₃), neuf chez *A. coluzzii* (de Mor₁₄ à Mor₂₂) et quatre chez *A. gambiae* s.s. (de Mor₂₃ à Mor₂₆). Dix morphotypes ont été retrouvés chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii* (Mor₄ à Mor₁₃) et cinq chez les trois espèces (Mor₂₇ à Mor₃₁). Par contre, chez les mâles, ces différents caractères ont permis d'obtenir 28 morphotypes. Parmi ces morphotypes, neuf n'ont été observés que chez *A. arabiensis* (Mor₃₂ à Mor₃₇, Mor₂₉, Mor₃₀ et Mor₂₃), huit chez *A. coluzzii* (Mor₄₃ à Mor₅₀) et un chez *A. gambiae* s.s. (Mor₅₂). Trois morphotypes ont été retrouvés chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii* (Mor₅, Mor₃₈ et Mor₁₄), trois chez *A. arabiensis* et *A. gambiae* s.s. (Mor₃₉, Mor₄₀ et Mor₄) et deux chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. (Mor₅₁ et Mor₁₅). Deux morphotypes ont été retrouvés chez les trois espèces (Mor₄₁ et Mor₄₂). Par ailleurs, dans les deux sexes, trois morphotypes n'ont été retrouvés que chez *A. arabiensis* (Mor₄, Mor₂₉ et Mor₃₀), deux chez *A. coluzzii* (Mor₄, Mor₂₉) et un (Mor₅) n'a été

commun qu'*A. arabiensis* et *A. coluzzii*. Les tests de sensibilité à la deltaméthrine à 0,05% sur les populations d'*A. gambiae* s.l. ont montré une augmentation significative de la résistance entre 2011 et 2015, avec une baisse des taux de mortalité de 70-85% à 49-73% dans les trois DS $JT = 5638$, $p < 0,001$). La résistance a été plus élevée en zones urbaines comparée à celles des zones peri-urbaines et rurales ($JT = 5282$, $p < 0,0001$), avec autocorrélation spatiale positive de 2012 à 2015. L'analyse moléculaire de 2687 moustiques testés à la deltaméthrine a permis d'identifier trois espèces : *A. arabiensis* (68%), *A. coluzzii* (25%) et *A. gambiae* s.s. (7%). L'analyse moléculaire au locus « kdr » a révélé la présence de la mutation L995F, responsable de la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT avec des fréquences de l'allèle 995F de 18% chez *A. arabiensis*, 65% chez *A. coluzzii* et 58% chez *A. gambiae* s.s.. De plus, les fréquences alléliques ont augmenté de 0-30% en 2011 à 18-61% entre 2014 et 2015 dans les trois districts de santé ($JT = 620$, $p < 0,001$), spécialement chez l'espèce *A. coluzzii*. La mutation L995S a été identifiée à de très faibles fréquences chez *A. arabiensis* (< 1%) et *A. coluzzii* (2%). L'utilisation des synergistes (PBO 4%, DEF 0,25%) en association avec la deltaméthrine sur les populations de moustiques étudiées a induit une augmentation du niveau de sensibilité qui s'est traduite par une diminution des temps de « knockdown » et une augmentation significative de la mortalité ($p < 0,05$), atteignant parfois 100%. La présente étude a révélé une diversité des caractères pigmentaires des ailes de moustiques et une augmentation rapide et généralisée de la résistance à la deltaméthrine chez *A. arabiensis*, *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s., avec l'implication de deux principaux mécanismes : la mutation au locus 995 du gène « kdr » et l'activité des enzymes de détoxification telles que les oxydases et les estérases ; cette résistance multiple pourrait entraîner une baisse drastique de l'efficacité des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'Action (MILDA) à la deltaméthrine. Il est donc primordial de rechercher les outils complémentaires ou alternatifs de lutte antivectorielle tels que les moustiquaires imprégnées d'insecticides+PBO ou imprégnées de nouvelles molécules d'insecticides tels que le chlorphenapyr (classe des Pyrroles) qui est un insecticide de nouvelle génération pour renforcer la prévention du paludisme dans la Région du Nord-Cameroun.

Mots-clés : *Anopheles gambiae* s.l., morphologie, morphotype, insecticide, synergiste, mutation « kdr », lutte antivectorielle, Nord-Cameroun.

ABSTRACT

The development and rapid expansion of *Anopheles gambiae* s.l. resistance to insecticides in Africa jeopardize the efforts to prevent and control malaria. The present study aimed to characterize the dynamics of deltamethrin resistance in *A. gambiae* s.l. from North Cameroon; more specifically the objectives are to identify morphologically and by molecular markers the species of the *A. gambiae* complex involved in insecticide resistance and to evaluate the spatio-temporal variations of this resistance while determining the different mechanisms involved. Mosquito larvae were collected every year between October and November, for five consecutive years (2011-2015) in the Garoua, Pitoa and Mayo Oulo Health Districts (HDs) from North Cameroon. Taxonomic studies and molecular biology analyzes were carried out between April 2013 and July 2017. Mosquito specimens used for the morphological studies were dissected; the wings were gently removed from the body and mounted between blade and lamina. Susceptibility of mosquitoes to deltamethrin was assessed using the WHO susceptibility test protocol for adult mosquitoes. The remaining parts of the dissected mosquito specimen and those tested for deltamethrin susceptibility were identified down to species using PCR-RFLP. The *kdr* 995 alleles were genotyped using the hot oligonucleotide ligation assay (HOLA). A total of 229 specimens were examined for taxonomic studies, including 142 females and 87 males. Among these specimens, three species of the *A. gambiae* complex were identified : mainly *A. arabiensis* (52%), followed by *A. coluzzii* (33%) and *A. gambiae* s.s. (15%). Morpho-taxonomic studies revealed the existence of a very high inter and intraspecific variability, especially in *A. arabiensis* and *A. coluzzii*, compared to *A. gambiae* s.s.; indeed, we observed 28 variants on the wing veins. In females, 13 pigment characters allowed to obtain 31 morphotypes. Among these morphotypes, three were only found in *A. arabiensis* (Mor₁-Mor₃), nine in *A. coluzzii* (Mor₁₄-Mor₂₂) and four in *A. gambiae* s.s. (Mor₂₃-Mor₂₆). Ten morphotypes were found in *A. arabiensis* and *A. coluzzii* (Mor₄-Mor₁₃) and five in the three species (Mor₂₇-Mor₃₁). On the other hand, in males, these different characters resulted in 28 morphotypes. Among these morphotypes, nine were observed only in *A. arabiensis* (Mor₃₂-Mor₃₇, Mor₂₉, Mor₃₀ and Mor₂₃), eight in *A. coluzzii* (Mor₄₃-Mor₅₀) and one in *A. gambiae* s.s. (Mor₅₂). Three morphotypes were found in *A. arabiensis* and *A. coluzzii* (Mor₅, Mor₃₈ and Mor₁₄), three in *A. arabiensis* and *A. gambiae* s.s. (Mor₃₉, Mor₄₀ and Mor₄) and two in *A. coluzzii* and *A. gambiae* s.s. (Mor₅₁ and Mor₁₅). Two morphotypes were found in the three species (Mor₄₁ and Mor₄₂). Moreover, in both males and females, three morphotypes were only found in *A. arabiensis* (Mor₄, Mor₂₉ and Mor₃₀), two in *A. coluzzii* (Mor₄, Mor₂₉) and one (Mor₅) was only common to *A. arabiensis* and *A. coluzzii*. Susceptibility tests of *A. gambiae* s.l. to 0.05% deltamethrin

populations showed a significant increase in resistance between 2011 and 2015, with a decrease in mortality rates from 70-85% to 49-73% in the three HDs ($JT = 5638$, $p < 0.001$). Resistance was higher in urban settings compared to peri-urban and rural settings ($JT = 5282$, $p < 0.0001$), with a positive spatial relationship during the whole study period from 2012 to 2015. Molecular analysis of 2687 mosquitoes tested with deltamethrin revealed three species : *A. arabiensis* (68%), *A. coluzzii* (25%) and *A. gambiae* s.s. (7%). Molecular analysis at the « kdr » 995 locus revealed the presence of the L995F kdr mutation responsible for resistance to pyrethroids and DDT, with 18% allelic frequencies in *A. arabiensis*, 65% in *A. coluzzii* and 58% in *A. gambiae* s.s.. In addition, allelic frequencies increased from 0-30% in 2011 to 18-61% between 2014 and 2015 in the three health districts ($JT = 620$, $p < 0.001$), especially in *A. coluzzii*. The L995S allele was only identified at very low frequencies in *A. arabiensis* (< 1%) and *A. coluzzii* (2%). The use of synergists (PBO 4%, DEF 0.25%) in combination with deltamethrin on the tested mosquito populations induced an increase of susceptibility i.e., decrease in knockdown times and a significant increase in mortality up to 100% ($p < 0.05$). The present study shows a diversity of pigimentary characters on mosquito wings and a rapid and widespread increase of deltamethrin resistance in *A. arabiensis*, *A. coluzzii* and *A. gambiae* s.s., associated with two main mechanisms: the kdr 995 mutations at and the activity of detoxification enzymes such as oxidases and esterases ; this multiple resistance could lead to a drastic decrease in the effectiveness of deltamethrin-based long-lasting insecticidal nets (LLINs). It is therefore essential to seek complementary or alternative tools such as mosquito nets impregnated with insecticides+PBO or impregnated with new classes of insecticides such as chlorphenapyr (Pyrrole class) which is a new generation insecticide, to strengthen the prevention of malaria in the North Region of Cameroon.

Keywords: *Anopheles gambiae* s.l., morphology, morphotype, insecticide, synergist, kdr mutation, vector control, North Cameroon.

INTRODUCTION

Le paludisme constitue l'une des causes de morbidité et de mortalité les plus importantes dans les régions tropicales (WHO, 2006). Sa transmission est assurée par les moustiques du genre *Anopheles* Meigen, 1818. En Afrique sub-saharienne, le complexe d'espèces *Anopheles gambiae* Giles, 1902 et le groupe *Anopheles funestus* Giles, 1900 en sont les principaux vecteurs (Coetzee *et al.*, 2000). Le nombre de cas de paludisme enregistrés a été estimé à 241 millions en 2020 dans 85 pays d'endémie contre 227 millions de cas en 2000 (WHO, 2021a). En effet, malgré la réduction du nombre de malades au cours des 20 dernières années, cette maladie demeure un problème majeur de santé publique (WHO, 2021a). Des avancées sur la recherche d'un vaccin ont permis d'élaborer le RTS,S/AS01, qui est à ce jour le seul vaccin homologué pour prévenir le paludisme à *Plasmodium falciparum* chez les enfants vivant dans des zones de transmission modérée à élevée (Arora *et al.*, 2021) ; toutefois malgré ces efforts, la lutte antivectorielle constitue toujours le principal moyen de prévention de masse. Cette prévention est basée sur l'utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) et/ou des aspersion intra-domiciliaires (AID) (WHO, 2021a). Les insecticides de la famille des pyréthrinoïdes ont été pendant longtemps les seuls utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires ; à très faibles doses, ils agissent très rapidement sur les moustiques en produisant un effet de choc dit effet « *knockdown* » (Zaim *et al.*, 2000).

Cependant, l'efficacité de la lutte contre les moustiques vecteurs du paludisme se trouve actuellement menacée par la résistance de ces vecteurs aux insecticides de la famille des pyréthrinoïdes et aux trois autres familles d'insecticides (organochlorés, organophosphorés et carbamates) utilisés pour les aspersion intra-domiciliaires (WHO, 2014). La résistance des anophèles à ces familles d'insecticides vient donc mettre à rude épreuve les objectifs fixés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans son ambition de réduire le poids global du paludisme dans le monde de près de 90% en 2030 (WHO, 2015). Face à ce problème, de nouveaux produits ont été développés comme insecticides alternatifs pour renforcer l'efficacité de la lutte antivectorielle ; il s'agit du chlorfenapyr (pyrrole) et de la clothianidine (néonicotinoïde). Le chlorfenapyr constitue le principe actif de l'Interceptor® G2 (MILDA) en association avec l'alpha-cyperméthrine (Camara *et al.*, 2018) et la clothianidine, le principe actif de SumiShield (AID) en association avec la deltaméthrine (PqVC, 2019).

Au Cameroun, le choix du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) a été orienté vers l'utilisation massive des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'Action (MILDA) dans tout le pays et des campagnes de chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) dans les régions septentrionales. En effet, une première distribution massive de 8 millions de moustiquaires dans le pays a été réalisée en 2011 et une deuxième de

12 millions de moustiquaires entre 2015 et 2016 (PNLP, 2017). La combinaison de ces deux interventions de prévention a permis d'une part d'atteindre un taux de couverture d'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides à Longue Durée d'Action (MILDA) de plus de 80% dans les régions du Nord et de l'Extrême-Nord et, d'autre part, d'atteindre une baisse de la prévalence du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans de 30% en 2011 à 24% en 2018 (EDS, 2018). Cependant, le Cameroun est le onzième pays de la Région Africaine de l'OMS ayant rapporté le plus grand nombre de cas de paludisme (WHO, 2021b) avec des proportions de décès plus élevées dans les régions de l'Extrême-Nord (26%) et du Nord (27%) qui sont à risque d'épidémie (PNLP, 2017). Les facteurs explicatifs de cette persistance du paludisme au Cameroun restent encore peu élucidés ; mais ils seraient, en partie, liés à la résistance (1) des vecteurs face aux insecticides en imprégnation de moustiquaires et (2) des *Plasmodium* spp. aux médicaments antipaludiques. Deux types de mécanismes pouvant conférer la résistance des moustiques aux insecticides ont été rapportés au Cameroun :

- des mécanismes impliquant l'accroissement de la détoxification des insecticides par des enzymes telles que les estérases, les glutathion S-transférases et les monooxygénases à cytochrome P450 (Etang *et al.*, 2007) ;
- des mécanismes impliquant la modification de la cible des insecticides tels que les mutations « kdr » et celle de l'acétylcholinestérase (Etang *et al.*, 2006 ; Binyang *et al.*, 2022).

Dans les régions septentrionales du Cameroun, les travaux antérieurs ont montré une résistance multiple, c'est-à-dire avec plusieurs mécanismes d'*A. gambiae* s.l. aux insecticides ; cette résistance est en partie associée aux pratiques agricoles (Etang *et al.*, 2003 ; Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2013 ; Tene Fossog *et al.*, 2013a). En effet, la culture du coton et le développement du maraîchage engendrent la création des gîtes de reproduction des moustiques. De plus, l'utilisation massive des insecticides contre les insectes ravageurs de cultures entraîne une forte pression de sélection sur les larves de moustiques, engendrant ainsi une augmentation des niveaux de résistance (Fanello *et al.*, 2003). Cependant, il subsiste un manque de connaissances sur les facteurs biotiques et abiotiques qui influencent l'évolution de cette résistance aux insecticides dans le temps et dans l'espace, entre autres :

- les adaptations biologiques des espèces vectrices vis-à-vis de la pression insecticide (Chareonviriyaphap *et al.*, 2002) ;
- la diversité génétique des espèces vectrices par rapport aux différents mécanismes de résistance en présence (Kamdem *et al.*, 2017) ;

- l'influence démographique sur la distribution des espèces, sur la dispersion et sur le devenir des résidus insecticides en zones rurales, péri-urbaines et urbaines (Kamdem *et al.*, 2012).

Il nous a donc paru important de savoir quel serait la distribution spatio-temporelle et le profil génétique de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine qui a été l'insecticide utilisé en imprégnation des moustiquaires distribuées en 2011 (Permanet 2.0®) dans la Région du Nord-Cameroun. Dans cette région, trois vecteurs majeurs de *Plasmodium* spp. appartenant au complexe *A. gambiae* sont concernés par les phénomènes de résistance : *A. gambiae* s.s. Giles, 1902, *A. arabiensis* Patton, 1905 et *A. coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013. *Anopheles coluzzii* anciennement appelé *A. gambiae* s.s. forme moléculaire M a été érigé en espèce en 2013 (Coetzee *et al.*, 2013). Cette nouvelle classification a ainsi ouvert une perspective de recherche sur les critères morphologiques qui permettraient de distinguer *A. coluzzii* d'*A. arabiensis* et d'*A. gambiae* s.s., en particulier en zone de sympatrie où ils sont soumis à une même pression insecticide. L'identification morphologique des espèces étant la méthode de base dans les études de taxinomie, nous nous sommes proposés d'explorer à nouveau les critères morphologiques de distinction de ces trois espèces du complexe *A. gambiae*.

Notre hypothèse de travail est que la dynamique spatio-temporelle de la résistance aux insecticides influencerait diverses adaptations dans les populations de moustiques (dont celles agissant sur les caractères morphologiques) et que la fréquence des gènes de résistance serait liée à la distribution des espèces au sein du complexe *A. gambiae*. L'objectif général de cette étude est de caractériser la dynamique de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine dans la Région du Nord-Cameroun ; pour atteindre cet objectif, trois objectifs spécifiques ont été définis :

- identifier, sur la base des critères morphologiques et des marqueurs moléculaires, les espèces du complexe *A. gambiae* concernées par la résistance aux insecticides ;
- évaluer les variations spatio-temporelles de la résistance des populations d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine ;
- déterminer les mécanismes impliqués dans ces variations spatio-temporelles de la résistance des populations de moustiques à la deltaméthrine.

Ce travail est organisé en trois chapitres encadrés par une introduction et une conclusion. Le premier chapitre présente les généralités sur le paludisme, les vecteurs du paludisme dont en particulier ceux du complexe *A. gambiae*, la résistance aux insecticides et l'apport de la spatialisation dans la lutte antivectorielle. Le second chapitre porte sur la méthodologie utilisée

; il décrit le cadre géographique de l'étude, les protocoles utilisés et les méthodes d'analyse des données. Le troisième chapitre présente les principaux résultats obtenus et leur discussion.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1 Généralités sur le paludisme

Le paludisme ou malaria est une parasitose transmise aux vertébrés par la piqûre d'un anophèle femelle. Sur les 218 millions de cas de paludisme humains survenus en 2018 dans le monde, près de 93% étaient observés en Afrique, avec 94% des 405 000 décès enregistrés à l'échelle mondiale ; les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes constituent les sous-catégories les plus vulnérables, avec 67% des décès (272 000) enregistrés dans le monde (WHO, 2019). Cette maladie sévit de façon endémique en Afrique au Sud du Sahara, dans certains pays d'Amérique du Sud et en Asie du Sud-Est (figure 1).

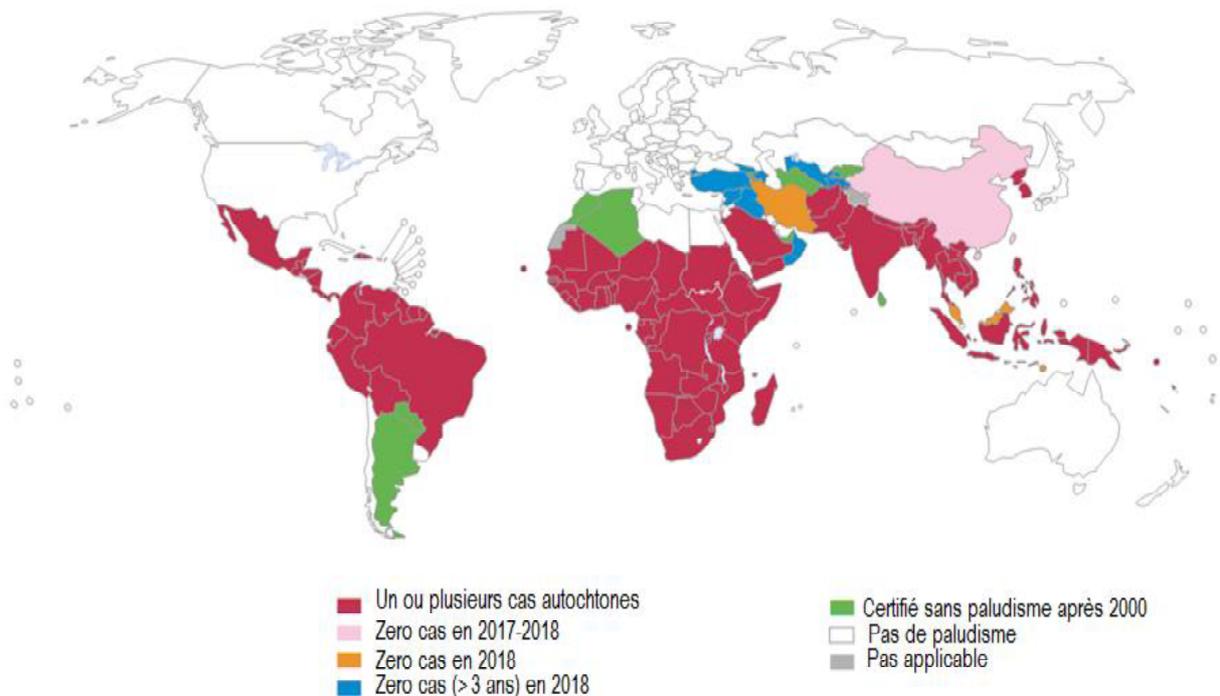


Figure 1 : Pays présentant des cas autochtones de paludisme en 2000 et leur statut en 2018

(WHO, 2019).

I.2 Espèces plasmodiales

Les parasites responsables du paludisme chez l'homme et les animaux sont des protozoaires hématophages appartenant au phylum des Apicomplexa, à la classe des Haemosporidea, à l'ordre des Haemosporida, à la famille des Plasmodiidae et au genre *Plasmodium* Laveran, 1881. Quatre espèces de *Plasmodium* sur les 80 espèces décrites sont pathogènes à l'homme (Mouchet et *al.*, 2004) ; il s'agit de :

- *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, l'espèce la plus répandue en zones tropicales ; elle est la plus redoutable et la plus mortelle car elle est responsable d'environ 90% des cas de morbidité et de mortalité palustres ;
- *Plasmodium malariae* Laveran, 1881, une espèce rare responsable de la fièvre quarte ;
- *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 l'agent de la fièvre bénigne en Afrique Centrale ;
- *Plasmodium vivax* Grassi et Feletti, 1890 responsable de la fièvre tierce bénigne en Afrique du Nord, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud.

I.3 Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* (Mouchet *et al.*, 2004)

Le cycle de *Plasmodium falciparum* est dixène, l'homme étant l'hôte intermédiaire et l'anophèle femelle hématophage l'hôte définitif ; ce cycle parasitaire commence quand l'anophèle femelle prend son repas sanguin sur un individu porteur de gamétocytes (figure 2). Au cours du prélèvement de sang, l'anophèle ingère des hématies parasitées de gamétocytes qui évoluent en gamètes mâles et femelles dont la fécondation, dans l'intestin, aboutit à la formation d'un ookinète qui subit une reproduction sexuée (sporogonie) et se transforme en oocyste. Une fois à maturité, les oocystes éclatent et libèrent les sporozoïtes qui migrent dans les glandes salivaires du moustique ; ces derniers sont injectés à l'homme dans le tissu sous-cutané lors de la piqûre par l'anophèle femelle, puis se retrouvent dans la circulation sanguine et atteignent les cellules hépatiques. Chaque sporozoïte pénètre dans un hépatocyte où il subit une schizogonie hépatique ou exo-érythrocytaire avec production des mérozoïtes ; l'hépatocyte parasité éclate et libère les mérozoïtes qui se retrouvent dans la circulation sanguine ; ils pénètrent, chacun dans une hématie où ils subissent un cycle de reproduction asexuée (schizogonie érythrocytaire ou endo-érythrocytaire), suivi d'une différenciation cellulaire qui aboutit à la formation des gamétocytes à nouveau ingérés par l'anophèle femelle lors du repas de sang.

Pour les trois autres espèces de *Plasmodium* évoluant chez l'homme, certains mérozoïtes pré-érythrocytaires ne pénètrent pas dans les érythrocytes ; ils s'attaquent plutôt à de nouveaux hépatocytes, maintenant ainsi dans le foie une parasitose dont la durée est variable : 2 à 3 ans pour *P. ovale*, 3 à 5 ans ou plus pour *P. vivax*, toute la vie pour *P. malariae*.

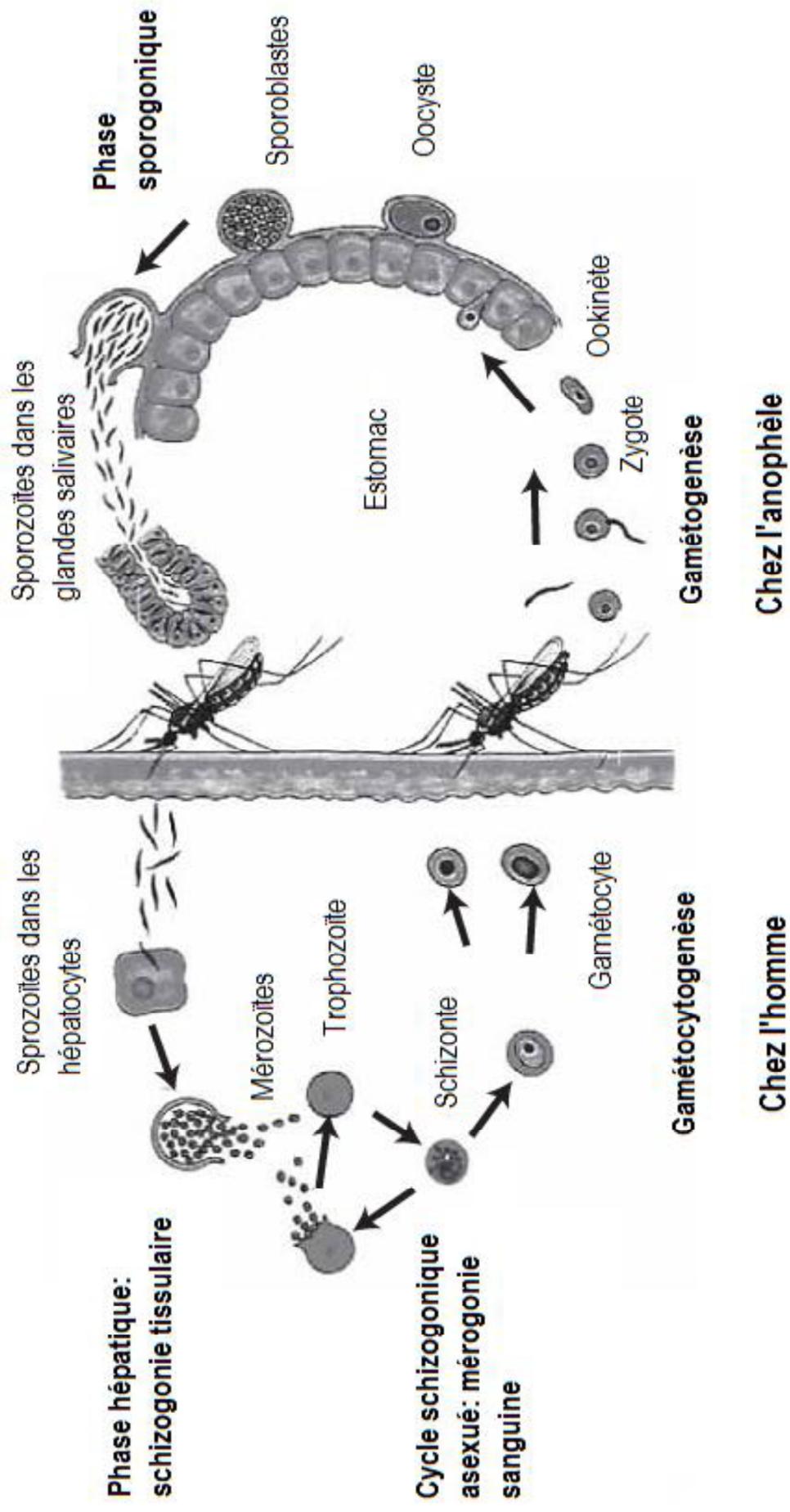


Figure 2 : Cycle de développement du *Plasmodium* chez l'homme et l'anophèle (Mouchet *et al.*, 2004).

I.4 Vecteurs du paludisme en Afrique

En Afrique subsaharienne, on dénombre plus de 450 espèces d'anophèles, dont 41 d'entre elles sont des vecteurs majeurs du paludisme (Fontenille *et al.*, 2005 ; Tabue *et al.* , 2017). Les principaux vecteurs du paludisme sont *A. gambiae* s.s., *A. coluzzii*, *A. arabiensis*, *A. funestus* Giles, 1900, *A. moucheti* Evans, 1925 et *A. nili* (Theobald), 1904. La répartition de ces moustiques n'est pas uniforme sur le continent ; *A. gambiae* s.s., *A. coluzzii* et *A. funestus* sont des espèces ubiquistes, *A. moucheti* et *A. nili* sont confinés dans les zones forestières et périforestières, alors qu'*A. arabiensis* se retrouve en zone de savane (Gillies & De Meillon, 1968). Cette répartition tient compte d'une part des facteurs écologiques et, d'autre part, des paramètres physico-chimiques (température, potentiel d'hydrogène, oxygène dissout, salinité, turbidité...) des milieux aquatiques et aériens (Tene Fossog *et al.*, 2013b).

I.5 Position taxinomique des anophèles (*Anopheles gambiae* s.l.)

La position taxinomique des anophèles, d'après Harbach (2004) et Gillot (2005), est la suivante :

Règne Animal :

- Organismes multicellulaires ;
- êtres hétérotrophes ;

Embranchement des Arthropodes (Siebold & Stannius, 1845) :

- corps segmenté et couvert d'une carapace de nature chitineuse ;
- présence d'appendices articulés ;

Sous-embranchement des Hexapodes :

- corps divisé en 3 tagmes : tête-thorax-abdomen ;
- présence de 3 paires de pattes thoraciques ;

Classe des des Insectes :

- pièces buccales visibles à l'extérieur au repos ;
- présence de l'organe de Johnston sur le scape antennaire ;

Sous-classe des Ptérygotes :

- présence d'ailes au cours du développement ;
- Dicondyliens ;

Section des Oligonéoptères :

- champ jugal avec une seule nervure longitudinale simple ;

Ordre des Diptères (Linné, 1758) :

- présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en balanciers ;

Sous-ordre des Nématocères (Latreille, 1825) :

- antennes longues et multiarticulées ;
- pronotum séparé du mésonotum par une suture transverse ;

Famille des Culicidae (Latreille, 1825) :

- corps recouvert d'écailles filiformes ;
- bord postérieur des ailes frangé d'écailles ;

Sous-famille des Anophelinae (Theobald, 1905) :

- trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête ;
- scutellum régulièrement courbé au bord postérieur ;

Tribu des Anophelini (Belkin, 1962) :

Genre *Anopheles* Meigen, 1818 :

- taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa ;
- présence ou non de touffes latérales sur l'abdomen ;

Espèce *Anopheles gambiae* Giles, 1902 :

- costa avec 5 taches pâles dont 2 basales ;
- fémurs et tibias antérieurs largement tachetés.

I.6 Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes holométaboles, car leur cycle évolutif présente une métamorphose complète. Comme le mâle, la femelle hématophage se nourrit également de sucres végétaux qui lui procurent de l'énergie pour le vol, la reproduction et les éléments de base pour la biosynthèse. La prise du repas sanguin, riche en azote favorise le développement des ovaires (Mouchet *et al.*, 2004). Le choix de l'hôte, le lieu de la prise du repas de sang et de repos pour la digestion sont caractéristiques pour chaque espèce. Certaines femelles prennent leur repas de sang sur l'homme (espèces anthropophiles), d'autres sur les animaux (espèces zoophiles), à l'intérieur des habitations (espèces endophages) ou à l'extérieur (espèces exophages). Pour certaines espèces, le repos et la digestion du sang ingéré lors de la piqûre du moustique ont lieu soit à l'intérieur des habitations (espèces endophiles), soit à l'extérieur (espèces exophiles). Les femelles gravides quittent leur lieu de repos en direction des gîtes aquatiques pour la ponte.

Le cycle de développement des moustiques comprend une phase aquatique (œuf, larve, nymphe) et une phase aérienne au stade adulte (figure 3).

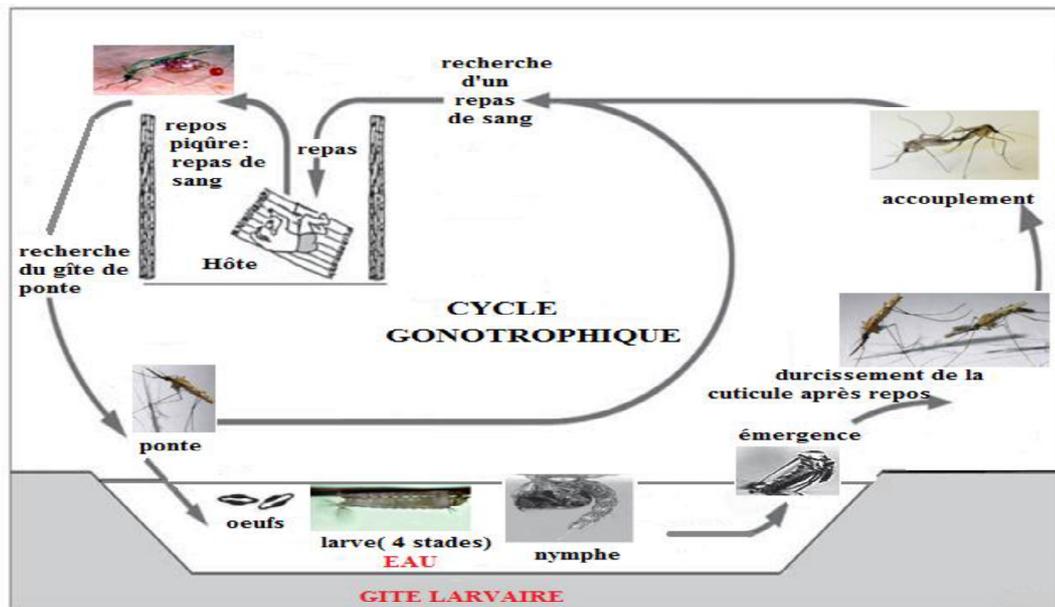


Figure 3 : Cycle de développement des anophèles (extrait de Mouchet *et al.*, 2004).

I.6.1 Phase aquatique

Cette phase débute avec la ponte des œufs par la femelle à la surface de l'eau ; une ponte comprend 80 à 300 œufs maintenus en surface jusqu'à l'éclosion par des flotteurs latéraux. Sous les tropiques, les œufs éclosent habituellement 2 à 3 jours après la ponte (Rodhain & Perez, 1985), libérant chacun une larve dite de premier stade. A la suite de trois mues consécutives, la larve évolue successivement en stades II, III et IV, et se transforme en nymphe à partir de laquelle émerge un moustique adulte un à deux jours plus tard.

I.6.2 Phase aérienne

L'adulte ou imago est un insecte au corps long et grêle, doté de longues pattes et de pièces buccales en forme d'aiguilles ; après l'émergence, il se repose quelques heures au bord du gîte afin de permettre la maturation rapide des organes locomoteurs et leur adaptation au milieu aérien. Le développement des autres organes survient dans les 2 à 3 jours qui suivent l'éclosion. Les mâles s'accouplent avec les femelles au cours de l'essaimage, à l'aube ou au crépuscule, et les spermatozoïdes sont stockés dans une spermathèque où ils conservent leur pouvoir fécondant jusqu'à la mort de la femelle (Bruce-Chwatt & Zulueta, 1985). Le cycle gonotrophique constitue l'ensemble des étapes qui se déroulent de la recherche de l'hôte à la piqûre, la prise et la digestion du repas de sang et la recherche d'un gîte de ponte (Carnevale & Robert, 2009). En général, les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois au cours de leur vie, mais elles pondent périodiquement pendant toute leur existence.

I.7 Complexe *Anopheles gambiae*

Par définition, un complexe d'espèces est un groupe d'espèces morphologiquement semblables qui se distinguent tant par leur éthologie que par leur structure génétique (Davidson, 1962).

Le complexe *Anopheles gambiae* est constitué de 8 espèces anophéliennes parmi lesquelles cinq sont inféodées aux eaux douces (*A. gambiae* s.s., *A. coluzzii*, *A. arabiensis*, *A. quadrianulatus* A Theobald, 1911 et *A. amharicus* Coetzee & Wilkerson, 2013), une espèce dans les eaux minérales (*A. bwambae* White, 1973) et les deux autres espèces (*A. merus* Dönitz, 1902 et *A. melas* Theobald, 1903) dans les eaux saumâtres (Mouchet *et al.*, 2004).

I.7.1 *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902

Cette espèce est largement répandue dans la région intertropicale, avec une restriction dans les montagnes où elle est rare à plus de 1500 m d'altitude (Pages *et al.*, 2007 ; Tchuinkam *et al.*, 2010). En zone de forêt où on la retrouve dans les clairières, les rivières et les plantations, sa présence a été toujours associée à l'activité anthropique qui favorise son installation ; toutefois, il existe des gîtes naturels à cette espèce : sources, mares résiduelles, étangs.... Sur la base des inversions paracentriques des chromosomes, cette espèce présente cinq formes ou cytotypes partiellement panmictiques (Coluzzi *et al.*, 1985 & 2002) dénommées « Forêt, Bissau, Bamako, Savane et Mopti ». Toutefois, Favia *et al.* (1997) ont différencié le cytotype Mopti des cytotypes Bamako et Savane par la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR) au niveau des espaces inter-géniques (IGS) de l'ADNr. Plus tard, les études des inversions chromosomiques ont permis d'établir les liens entre les différents cytotypes et le concept des formes moléculaires M et S (Della Torre *et al.* 2001). Ainsi, la forme M regroupe les cytotypes Forêt, Savane, Bissau et Mopti, et la forme S les cytotypes Forêt, Savane et Bamako ; ces formes moléculaires peuvent aussi être identifiées par la technique de PCR (Favia *et al.*, 2001 ; Fanello *et al.*, 2002 ; Santolamazza *et al.*, 2008).

Plusieurs travaux font état d'un isolement reproductif précopulatoire entre les formes moléculaires M et S, bien que cela ne soit pas absolu (Diabaté *et al.*, 2009 ; Pennetier *et al.*, 2010).

Ces formes moléculaires sont des groupes taxinomiques cohésifs et exclusifs (De Queiroz, 2007) dont les variations ont permis leur érection en espèces. La forme moléculaire M est donc devenue *A. coluzzii* (Coetzee *et al.*, 2013) et la forme moléculaire S a conservé le nom d'*A. gambiae* s.s. Giles. *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902 dont les formes moléculaires

ont été érigées en espèces (*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s.) était très anthropophile et présentait des indices sporozoïtiques très élevés, quelquefois supérieurs à 5% (White et Rosen, 1973).

I.7.2 *Anopheles arabiensis* Patton, 1905

C'est une espèce largement répandue en Afrique, dans les savanes sèches et sur les plateaux d'Afrique méridionale (Gillies et Coetzee, 1987) ; elle colonise préférentiellement les milieux arides où elle se trouve quelquefois en sympatrie avec *A. gambiae* s.s. et *A. coluzzii*. L'espèce *A. arabiensis* est absente en zone forestière, à l'exception des zones urbaines comme la ville de Benin City au Nigeria (Coluzzi *et al.*, 1979), mais elle s'étend sur toute la corne de l'Afrique et au Sud-Ouest de la péninsule arabique (Coluzzi *et al.*, 1979). Cette espèce est originellement décrite comme étant moins anthropophile qu'*A. gambiae* s.s.. En son sein il existe une forte hétérogénéité génétique ; sur le plan cytogénétique, *A. arabiensis* est caractérisé par un important polymorphisme marqué par cinq inversions chromosomiques (Touré *et al.*, 1998). Au Cameroun, il n'est signalé que dans les régions de l'Adamaoua, du Nord et de l'Extrême-Nord (Simard *et al.*, 2009).

I.7.3 *Anopheles melas* Theobald, 1903

Cette espèce d'eau saumâtre est présente sur la côte Ouest de l'Afrique ; anthropophile, elle est très souvent rencontrée dans les lagunes et les mangroves et son implication dans la transmission du paludisme est moindre que celle d'*A. gambiae* s.s. Giles, 1902 (*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s), avec des indices sporozoïtiques inférieurs à 1% (Bryan, 1983). Au Cameroun, quelques spécimens ont été retrouvés à Ipono dans la région du Sud (Nwane *et al.*, 2013).

I.7.4 *Anopheles merus* Dönitz, 1902

Cette espèce d'eau saumâtre est présente sur la côte Est de l'Afrique ; elle pique les hommes et est vecteur des filarioses et du paludisme, avec des indices sporozoïtiques de 3,3% (Mosha & Petrarca, 1983). Cet indice sporozoïtique supérieur à celui obtenu par Bushrod (1981), qui était de 1%, confirme le rôle important de cette espèce dans la transmission du paludisme.

I.7.5 *Anopheles bwambae* White, 1973

Elle n'est connue que dans les sources thermales géothermiques (eau minérale) de la forêt de Semliki dans la région de Bwamba en Ouganda (White, 1973), où elle se nourrit sur

les hommes et sur les animaux. Bon vecteur, mais d'importance très locale, *A. bwambae* présente des indices sporozoïtiques de 0,7% (White, 1973).

I.7.6 *Anopheles quadriannulatus* A Theobald, 1911

Espèce décrite à partir d'un spécimen unique provenant d'Onderstepoort en Afrique du Sud, *A. quadriannulatus* A a été retrouvé et considéré comme une espèce des hautes terres en raison de sa distribution en Ethiopie (White, 1985) ; il peut s'alimenter aussi bien sur du bétail que sur des sujets humains en fonction des conditions d'accessibilité aux hôtes. Toutefois, il est considéré comme très zoophile et son rôle dans la transmission du *Plasmodium* reste nul.

I.7.7 *Anopheles quadriannulatus* B Hunt, 1998

Cette espèce a été décrite en Ethiopie à partir des techniques classiques de croisements en l'absence de différences cytogénétiques avec l'espèce A (Hunt *et al.*, 1998) ; elle est zoophile et est distinguée d'*A. quadriannulatus* A par la technique de PCR (Fettene *et al.*, 2002 ; Fettene & Temu, 2003). Ainsi, les membres du complexe *A. gambiae* de l'Ethiopie ont été nommés *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013 (Coetzee *et al.*, 2013).

I.8 Fondements de la lutte contre les vecteurs du paludisme

Afin d'accélérer les progrès vers l'élimination du paludisme, l'OMS exhorte les pays touchés par cette maladie et les acteurs mondiaux de la lutte antipaludique à maximiser l'impact des outils et des stratégies qui sauvent des vies aujourd'hui (WHO, 2015). La stratégie s'articule autour de trois piliers :

- garantir l'accès universel à la prévention, au diagnostic et au traitement du paludisme ;
- accélérer les efforts vers l'élimination et vers l'obtention du statut exempt de paludisme ;
- faire de la surveillance du paludisme une intervention de base.

Malgré cette stratégie, le paludisme continue à faire de nombreuses victimes au sein de la population mondiale. La chimioprophylaxie incluse dans le premier objectif de la stratégie adoptée ne donne non plus des résultats efficaces du fait de l'apparition et l'expansion des souches de *Plasmodium* résistantes aux antipaludéens (Benoît-Vical *et al.*, 2016). La lutte antivectorielle apparaît donc comme le seul moyen efficace de prévention contre le paludisme (Guillet *et al.*, 1997) ; elle vise à limiter le contact homme-vecteur pour prévenir l'infection à *Plasmodium*, et permet la réduction de la densité des populations de vecteurs à-travers ses

diverses méthodes de lutte. Les méthodes de lutte utilisées sont multiples et disponibles, mais le choix de l'une ou de l'autre doit tenir compte de la biologie et du comportement des espèces ciblées, ainsi que du contexte épidémiologique (Mouchet *et al.*, 2004) ; ces méthodes peuvent être chimiques, physiques, physico-chimiques, biologiques ou génétiques. Suivant leur utilisation en milieu communautaire, elles peuvent être individuelles (application des répulsifs sur la peau par exemple) ou collectives (utilisation généralisée des moustiquaires imprégnées d'insecticides, par exemple, avec un taux de couverture supérieur à 80%).

I.8.1 Méthodes de lutte chimique

Elles sont les plus utilisées dans les programmes de lutte contre les insectes vecteurs de maladies, notamment contre les stades larvaires ou les adultes des vecteurs du paludisme. Les composés initialement utilisés à cet effet étaient des insecticides naturels à base de fluor, de soufre... Avec le progrès de la recherche, ces insecticides ont été remplacés par des composés synthétiques regroupés en 6 principales familles selon les principes actifs dont (1) les organochlorés, (2) les organophosphorés, (3) les carbamates, (4) les pyréthrinoïdes et (5) les régulateurs de croissance (Philogene, 1991).

I.8.1.1 Organochlorés

Ils regroupent le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) et ses analogues, les cyclodiènes (dieldrine, endosulfan) et les hexachlorocyclohexanes ou HCHs (lindane). Le DDT est le plus connu et le plus utilisé de cette famille d'insecticides. Toutefois, de par son caractère toxique pour les organismes vivants parmi lesquels l'homme, l'OMS (WHO, 2004) ne recommande actuellement son usage que pour des pulvérisations intra-domiciliaires à effet rémanent. Le DDT agit en perturbant principalement la fermeture des canaux sodiques le long de l'axone chez l'insecte, ce qui entraîne un déséquilibre ionique entre le milieu intérieur et le milieu extérieur de la cellule nerveuse ; il en résulte une perturbation de la transmission de l'influx nerveux le long du nerf, provoquant un effet de choc (effet « *knockdown* »), des convulsions, puis la mort de l'insecte (Ware & Whitacre, 2004).

Le lindane et les cyclodiènes, par contre, agissent sur les récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA_R) dont le blocage réduit l'entrée des ions chlorures qui régulent la transmission de l'influx nerveux dans le sens de l'arrêt de l'excitation (Cole & Casida, 1986).

I.8.1.2 Organophosphorés

Ces insecticides sont des dérivés de l'acide phosphorique et des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Eldefrawi, 1976), enzyme responsable du métabolisme de l'acétylcholine, neuromédiateur des synapses cholinergiques du système nerveux central des insectes. La phosphorylation de l'acétylcholinestérase entraîne une accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique ; lorsque sa concentration devient trop élevée, les récepteurs de l'acétylcholine restent ouverts induisant la paralysie et la mort de l'insecte.

I.8.1.3 Carbamates

Les carbamates, dérivés de l'acide carbamique, comprennent un grand nombre de produits, parmi lesquels les plus utilisés en santé publique ont été le propoxur et le bendiocarb (Carnevale & Mouchet, 1990). Comme les organophosphorés, ces insecticides agissent sur l'acétylcholinestérase ; cependant, le degré d'inhibition de l'enzyme est atténué en fonction de sa vitesse de régénération, la formation du complexe « Enzyme-Carbamates » étant quelque peu réversible (Champ, 1985).

I.8.1.4 Pyréthriinoïdes

Les pyréthriinoïdes sont des dérivés synthétiques des pyréthrines, insecticides naturels extraits des fleurs de chrysantème, *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Depuis les années 1980, les pyréthriinoïdes occupent une place importante sur le marché des insecticides ; leur photostabilité, leur toxicité sélective et leur innocuité pour les vertébrés à sang chaud en ont fait des candidats de choix en santé publique, notamment pour l'imprégnation des moustiquaires (Zaim *et al.*, 2000).

Comme le DDT, les pyréthriinoïdes agissent sur le système nerveux central et périphérique (Elliot et Janes, 1978) en modifiant la cinétique d'activation-inactivation du canal sodium le long de l'axone (Lund & Narahashi, 1983). On distingue les pyréthriinoïdes de type I ne présentant pas de radical cyané en position α (perméthrine, bifenthrine...), et les pyréthriinoïdes de type II présentant, quant à eux, un radical cyané en position α (deltaméthrine, lambdacyalothrine...). Les pyréthriinoïdes de type I et le DDT exercent une action similaire sur les canaux sodium, en les maintenant ouverts de façon transitoire, créant ainsi des décharges successives de potentiels d'action qui entraînent des incoordinations de mouvements, un effet « knockdown » et la mort de l'insecte (Salgado *et al.*, 1983). Les pyréthriinoïdes de type II, quant à eux, maintiennent les canaux sodium ouverts plus longtemps, bloquant de façon

prolongée la transmission neuromusculaire (Lund & Narahashi, 1983), ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane sans décharges répétitives.

I.8.1.5 Régulateurs de croissance

Ils regroupent les agonistes qui provoquent des mues anticipées ou des défaillances dans les mécanismes de reproduction. Les juvénoïdes et les ecdystéroïdes inhibent la nymphose et la synthèse de la chitine chez les insectes ; leur action ciblée sur le système endocrinien, responsable de la synthèse de l'hormone juvénile et de l'ecdysone, entraîne l'arrêt des métamorphoses lors de leur inhibition chez les insectes.

I.8.1.6 Synergistes

Ce sont des composés chimiques sans effet létal par eux-mêmes mais qui, combinés à certains insecticides, augmentent leur activité toxique en bloquant les mécanismes de détoxification de l'arthropode (Mouchet, 1980). Ainsi, leur utilisation en combinaison avec les insecticides permet de surmonter les résistances dues aux enzymes de détoxification (Brindley & Selim, 1984). Trois synergistes sont communément utilisés pour mettre en évidence l'effet des enzymes responsables de la dégradation des insecticides chez les insectes : le piperonyl butoxide (PBO) qui inhibe l'activité des oxydases, le S,S,S-tributylphosphotrithioate (DEF) qui inhibe l'activité des estérases, le diéthyl maléate (DEM) qui inhibe l'activité des glutathion-S-tranférases.

I.8.2 Méthodes de lutte physique

Cette méthode de lutte vise, par des modifications volontaires de l'environnement, à réduire ou à faire disparaître les gîtes artificiels de moustiques. Pour les stades larvaires, la lutte physique préconise l'aménagement de l'environnement par des grands travaux de drainage et d'hygiène péri-domestique. Bien qu'efficace, la lutte physique est de plus en plus difficilement envisageable dans la plupart des pays tropicaux, avec la multiplicité des gîtes larvaires créés par les grands travaux d'urbanisation. Pour les stades adultes, elle préconise la pose des barrières physiques telles les moustiquaires de lit, les grillages à mailles fines sur les ouvertures de maisons.

I.8.3 Méthodes de lutte physico-chimique

La lutte physico-chimique résulte de la combinaison des méthodes physiques et chimiques dont le but est de renforcer l'efficacité des outils de la lutte physique. Ce

renforcement se fait généralement par des imprégnations ou des aspersion d'insecticides à effet rémanent sur les matériaux utilisés. Actuellement, la lutte contre les vecteurs du paludisme dans plusieurs pays repose sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées et la pratiques des aspersion intra-domiciliaires.

I.8.4 Méthodes de lutte biologique

Elles utilisent les molécules provenant d'agents biologiques qui agissent efficacement sur certaines espèces de vecteurs. Les plus utilisées sont obtenues de certains bacilles à Gram positif, aérobies et sporulés, comme *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus sphaericus* retrouvés dans le sol, l'eau, l'air et le feuillage des végétaux ; ces derniers se distinguent des autres bacilles par leur capacité à synthétiser et à excréter des cristaux protéiques toxiques pour certains insectes (Lépidoptères, Coléoptères et Diptères). La découverte du sérotype *israelensis* (*Bti*), très actif contre les larves de certains moustiques, a révolutionné la lutte contre certains vecteurs. Il y a également les spores des champignons (*Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*) qui sont des ennemis naturels des stades larvaires et adultes des moustiques (Lacey & Orr, 1994).

I.8.5 Méthodes de lutte génétique

Elles sont basées sur le remplacement de populations naturelles par des populations de moustiques génétiquement modifiées. Jusqu'ici, la lutte génétique envisagée chez les moustiques reposait sur la libération des mâles stériles, mais les essais n'ont jamais dépassé le stade de laboratoire. En effet, plusieurs questions relatives à la production de masse, à l'adaptation et à la compétition, notamment le succès reproductif, sont restées très ambiguës (Benedict & Robinson, 2003). Aujourd'hui, d'autres approches semblent se focaliser davantage sur l'introduction, chez les vecteurs, des gènes délétères (transgènes) au *Plasmodium* (Christophides, 2005) et le développement de techniques révolutionnaires de génie génétique permettent à un gène d'être transmis avec quasi-certitude par reproduction sexuée (*gene drive*) (Oye *et al.*, 2014).

I.8.6 Lutte contre les vecteurs du paludisme au Cameroun

En dehors de la lutte antilarvaire et des aspersion intra-domiciliaires pratiquées par les services d'hygiène dans les villes de Douala et Yaoundé pendant les années 50 (Lividas *et al.*, 1958), l'essentiel de la lutte contre les vecteurs du paludisme au Cameroun a été basé sur les

méthodes physiques utilisées à l'échelle familiale et sur les méthodes chimiques et physico-chimiques (Carnevale & Mouchet, 2001).

De nos jours, la prévention du paludisme au Cameroun repose principalement sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA), par exemple de marques PermaNet, Olyset et Interceptor (PLNP, 2017). Depuis l'introduction de ces MILDA, une réduction significative des indicateurs entomologiques et épidémiologiques du paludisme a été documentée à travers le pays par différentes études (Antonio-Nkondjio *et al.* 2019), soulignant ainsi l'importance de cet outil pour la lutte antipaludique dans le pays.

I.9 Résistance des moustiques aux insecticides

I.9.1 Définition

Selon L'OMS, la résistance aux insecticides est la capacité d'une population d'insectes à tolérer des doses d'insecticides qui seraient létales pour la majorité des individus dans une population normale de la même espèce (WHO, 2012) ; elle résulte de la sélection, par un insecticide, de mutants qui possèdent un système enzymatique ou physiologique leur permettant de survivre à des doses létales de cet insecticide. Le développement de la résistance dépend de la pression exercée sur les populations de moustiques par les insecticides utilisés en santé publique, en agriculture ou en exploitation forestière (Diabaté *et al.*, 2002 ; Nwane *et al.*, 2009). Cette pression est d'autant plus forte qu'on utilise des insecticides rémanents et que la proportion de la population exposée à l'insecticide est grande.

Lorsque la résistance concerne les insecticides d'une même famille ou des familles différentes ayant la même cible et le même mode d'action, on parle alors de résistance croisée ; lorsqu'elle concerne plusieurs insecticides différant par leurs cibles et leurs modes d'action, on parle de multirésistance (Hemingway & Karunaratne, 1998 ; Hemingway & Ranson, 2000).

I.9.2 Mécanisme de résistance

Pour agir, une molécule insecticide doit entrer en contact avec un insecte, pénétrer dans son organisme où elle sera transformée en métabolite actif, puis être transportée jusqu'à sa cible ; tout mécanisme qui bloque l'une de ces étapes constitue un mécanisme de résistance (Soderlund & Bloomquist, 1989). En effet, la résistance peut impliquer une modification (1) du comportement de l'insecte qui évite le contact avec l'insecticide, (2) de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, (3) des voies métaboliques permettant la dégradation de l'insecticide ou (4) de la cible de l'insecticide (IRAC, 2006).

Les résistances aux différentes familles d'insecticides utilisées dans la lutte antivectorielle sont principalement de deux types : la résistance par modification de cible et la résistance métabolique (Etang *et al.*, 2003 ; 2007). Toutefois, l'allèle responsable de la résistance peut également induire une modification du comportement de l'insecte à éviter le contact avec l'insecticide, traduisant une résistance comportementale et une modification du taux d'absorption ou d'excrétion de l'insecticide.

I.9.2.1 Résistance métabolique

La résistance métabolique est due à l'accroissement de l'activité des enzymes responsables de la dégradation des insecticides ; ces enzymes sont essentiellement des estérases, des oxydases à cytochrome P450 et des glutathion-S-transférases (Oppenoorth, 1985). L'activité accrue de ces enzymes résulte soit d'une modification de leurs configurations les rendant plus actifs, soit de leur surproduction (Vaughan & Hemingway, 1995). La surproduction d'une enzyme peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de cette enzyme ou à une augmentation du nombre de copies du gène qui code pour cette enzyme (Mouches *et al.*, 1987).

I.9.2.1.1 Monooxygénases à cytochrome P450

Les cytochromes P450s interviennent surtout dans la résistance aux pyréthrinoïdes ; 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 de 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 *A. funestus* (Hargreaves *et al.*, 2000). Ce complexe enzymatique est codé par 70 familles de gènes, subdivisées en 130 sous-familles (Scott, 1996). Plusieurs de ces gènes ont été séquencés chez différentes espèces d'insectes et certains sont directement impliqués dans la résistance aux insecticides (Tene Fossog *et al.*, 2013a ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2016).

En effet, elles sont appelées mono-oxygénases car elles incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire. Aussi, plusieurs CYPs peuvent métaboliser le même substrat témoignant d'une redondance fonctionnelle. L'étude du rôle des CYPs dans la biodégradation des xénobiotiques est ainsi d'autant plus difficile, surtout que le changement d'un acide-aminé dans leur séquence peut modifier la spécificité de substrat (Lindberg & Negishi, 1989). Ce phénomène est aussi observé chez *A. funestus* chez qui une variation allélique des gènes

CYP6P9a et *CYP6P9b* impacte grandement le métabolisme des pyréthrinoides (Ibrahim *et al.*, 2015).

A cause du grand nombre de CYPs répertoriés, une classification claire et fonctionnelle a été faite. Les gènes codants pour des CYPs sont désignés par le préfixe CYP suivi d'un numéro pour la famille, d'une lettre pour la sous-famille et enfin d'un numéro pour le gène. Les différentes versions alléliques d'un même gène sont différenciées par un indice v1, v2... (ex : CYP6B1v2) (Feyereisen, 1999). Les CYPs sont classés en fonction de leur séquence protéique. Plus précisément, le pourcentage d'acides aminés identiques ainsi que les relations phylogénétiques sont utilisés. Chez *A. funestus*, deux gènes du cytochrome P450 dupliqués CYP6P9 et CYP6P4 sont associés à la résistance aux pyréthrinoides principalement au Mozambique et au Malawi (Wondji *et al.*, 2009, Riveron *et al.*, 2013) tandis que les gènes CYP6P3 et CYP6M2 sont les plus impliqués à la résistance aux pyréthrinoides chez *A. gambiae* (Djouaka *et al.*, 2008, Mitchell *et al.*, 2012).

Dans une étude très récente, les principaux gènes de la famille des cytochromes P450 conférant la résistance aux insecticides chez *A. funestus* en Afrique ont été détecté indiquant une grande variation de ces gènes selon les régions du continent (Weedall *et al.*, 2019). Suite à ces travaux, le premier marqueur moléculaire de la résistance métabolique causée par les cytochromes P450 a été mis sur pied. Ce marqueur est situé au niveau de la région promotrice contrôlant l'expression du gène CYP6P9a. Par la même occasion, un test diagnostique simple permettant de suivre cette résistance sur le terrain a été conçue. Utilisant ce marqueur, il a été montré à l'issue d'une étude en case expérimentale réalisée au Cameroun que les moustiques porteurs de l'allèle résistant à ce gène ont plus de chance de survivre en présence de la moustiquaire imprégnée aux insecticides et même de prendre un repas de sang comparés à leur homologues sensibles (Weedall *et al.*, 2019). De plus, les études de génotypage du locus CYP6P9a à travers le continent ont montré que l'allèle résistant CYP6P9a_R était presque fixé chez les moustiques d'Afrique australe mais présent à une fréquence intermédiaire (55,7%) chez les moustiques provenant de la Tanzanie (Afrique de l'Est). Cependant, l'allèle CYP6P9a_R a été absent chez les moustiques d'Afrique centrale et occidentale.

I.9.2.1.2 Glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases catalysent la détoxification d'un grand nombre de xénobiotiques avec le groupement thiol du glutathion sous forme réduite. Ceci aboutit à la formation de métabolites moins toxiques, plus hydrophiles et donc facilement excrétables (Enayati *et al.*, 2005). Les GSTs sont groupés en deux formes : cytosolique et microsomale.

Seulement quatre GSTs microsomaux ont été répertoriés chez les insectes : une chez *Drosophila melanogaster* et trois chez *A. gambiae*. Les GSTs cytosoliques sont les plus importants car impliqués dans la résistance aux insecticides (Hemingway *et al.*, 2004). On distingue actuellement six classes : Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta et Zeta (Enayati *et al.*, 2005). Les GSTs sont naturellement présentes chez les insectes, généralement localisées dans le cytoplasme des cellules des corps gras et dans les muscles alaires (Franciosa & Bergé, 1995), jouant différents rôles tels la détoxification de xénobiotiques, le transport intracellulaire de composés lipophiles, la biosynthèse des hormones, etc. (Enayati *et al.*, 2005). Une augmentation du niveau d'expression des GSTs peut être responsable de la résistance aux organophosphorés (Huang *et al.*, 1998), aux organochlorés (Riveron *et al.*, 2014) et aux pyréthrinoïdes (Vontas *et al.*, 2001; Riveron *et al.*, 2014). La détoxification peut aussi se faire indirectement, comme avec les pyréthrinoïdes où les GSTs contribuent à la résistance en séquestrant les métabolites secondaires issus des réactions d'oxydation par les cytochromes P450 (Kostaropoulos *et al.*, 2001). Leurs concentrations augmentent avec l'évolution des stades larvaires, atteignent un maximum au stade nymphal et déclinent durant le stade adulte. De plus, l'expression tissulaire est également fortement variable.

Chez *A. funestus*, une importante découverte a été faite en 2014 où une mutation (C/T) sur le gène GSTe2 a été retrouvée impliquée dans la résistance au DDT et aux pyrethrinoides chez ce vecteur du paludisme (Riveron *et al.*, 2014). Cette découverte a permis de concevoir le premier marqueur de la résistance métabolique basé sur l'ADN chez les moustiques. En effet, l'étude avait démontré que le changement d'un seul codon (L119F) sur le gène GSTe2 (enzyme de détoxification) chez *A. funestus* confère une résistance croisée au DDT et à la perméthrine (Tchouakui *et al.*, 2019).

I.9.2.1.3 Estérases

Les estérases constituent un groupe important d'enzymes qui catalysent l'introduction d'une molécule d'eau au niveau d'une liaison ester ou amide spécifique du substrat. Les estérases jouent un rôle important dans le métabolisme des carbamates, des organophosphorés et des pyréthrinoïdes dont elles dégradent rapidement les isomères trans ; elles sont classées en 2 catégories :

- les carboxylestérases à activité accrue à l'égard de l'ester de naphthyl. Il a été montré que le gène codant pour ces estérases est présent sous forme de copies multiples et qu'il est dérégulé dans les populations résistantes (Rooker *et al.*, 1996). Chez les souches du moustique

Culex pipiens résistantes aux organophosphorés, une quantité d'estérases 250 fois plus élevée que chez les souches sensibles a été révélée (Mouches *et al.*, 1987) ;

- les carboxylestérases ne présentant pas d'activité accrue vis-à-vis de l'ester de naphtyl ; elles n'engendrent pas une augmentation de la production des enzymes, mais plutôt cette activité est quelquefois en diminution. Ce type de résistance est spécifique au malathion chez *A. arabiensis* et *A. culicifacies* (Hemingway, 1985) et est dû à une protéine, la malathion carboxylestérase, qui hydrolyse spécifiquement les deux liaisons esters carboxyliques du malathion.

I.9.2.2 Résistance par modification de la cible

Les cibles principales d'insecticides sont des protéines (canaux ioniques ou enzymes) jouant un rôle dans la transmission de l'influx nerveux ; il s'agit du canal sodium « voltage dépendant » (CvSD), de l'acétylcholinestérase (AChE) et du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA_R). Des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour ces protéines cibles entraînent des modifications structurales ayant pour conséquence de diminuer leur affinité avec les insecticides.

Le canal sodium « voltage dépendant » est une protéine transmembranaire de 1800 acides aminés environ ; il est la cible du DDT et des pyréthrinoïdes. Des études ont montré que certaines résistances au DDT et aux pyréthrinoïdes sont sous la dépendance de la mutation dite « kdr » ou « *knockdown resistance* » au niveau du canal sodium (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000).

La résistance de type « kdr » se caractérise par une diminution de l'affinité entre les canaux sodiques et les insecticides. Chez *A. gambiae* s.l., la résistance de type « kdr » est associée à des mutations ponctuelles dans la partie du gène codant pour le domaine II du segment 6 du canal sodium « voltage dépendant » (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000). La mutation « kdr » se traduit par la substitution d'un acide aminé, notamment la leucine par la phénylalanine (Leu-Phe) ; cette mutation a été décrite en premier chez les ravageurs de cultures tels que le puceron *Myzus persicae*, le papillon *Plutella xylostella*, ensuite chez la blatte germanique *Blattella germanica* et chez différentes espèces d'importance médicale. Pour *A. gambiae* s.l., la mutation « kdr » Leu-Phe (Martinez-Torres *et al.*, 1998) présente une large distribution en Afrique Occidentale et Centrale (Chandre *et al.*, 1999 a,b ; Awolola *et al.*, 2003 ; Etang *et al.*, 2006 ; Pinto *et al.*, 2006). Une autre mutation « kdr » du même acide aminé, leucine-sérine (Leu-Ser), a été trouvée parmi les populations d'*A. gambiae* d'Afrique Orientale (Ranson *et al.*, 2000).

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acétylcholine (ACh), le principal neurotransmetteur chez les insectes (Pitman, 1971) ; elle est la cible principale des insecticides organophosphorés (OPs) et des carbamates. L'insensibilité de l'AChE aux insecticides résulte soit de sa surproduction (Fournier *et al.*, 1992), soit d'une diminution de son affinité avec les insecticides (Soderlund & Bloomquist, 1989). Chez *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica*, quatre points de mutation situés sur le gène *Ace 2* rendent l'acétylcholinestérase moins sensible aux insecticides (Mutero *et al.*, 1994). Chez *Culex quinquefasciatus* et *A. gambiae* s.l., la même mutation (substitution de la glycine par la sérine) se retrouve en position 119 sur le gène *Ace 1* et confère une résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates (Weill *et al.*, 2003).

Les Récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA_r) sont les cibles de nombreux insecticides organohalogénés dont la dieldrine et le lindane ; ils sont situés dans le système nerveux central des insectes. Une substitution de l'alanine (Ala) par la sérine (Ser) sur la séquence codante du GABA_r entraîne une résistance croisée aux cyclodiènes et au lindane (Ffrench-Constant *et al.*, 1993). Cette mutation est très connue chez les insectes résistants à la dieldrine comme *Drosophila melanogaster* ; elle a été décrite pour la première fois chez *Musca domestica* (Georghiou, 1980) et sa diffusion au sein des populations de moustiques a été également observée chez *A. funestus* (Wondji *et al.*, 2011).

I.9.3 Facteurs conditionnant l'évolution de la résistance

L'évolution de la résistance des anophèles aux insecticides est un processus complexe qui dépend d'un certain nombre de facteurs biologiques, génétiques et opérationnels (Georghiou, 1980).

Les facteurs biologiques concernent l'écologie de l'insecte et son cycle de reproduction ; l'expansion des gènes de résistance est plus rapide chez les espèces ayant une durée de vie élevée, une descendance élevée et un cycle de reproduction très court.

Les facteurs génétiques font intervenir la fréquence, le nombre et la dominance des gènes de résistance, l'expression et l'interaction de ces gènes, la sélection antérieure par d'autres matières actives, le degré d'intégration du gène résistant et de la valeur adaptative....

Les facteurs opérationnels, quant à eux, englobent tous les paramètres relatifs aux traitements phytosanitaires tels que la structure chimique de l'insecticide, le dosage, la rémanence et le mode d'application des insecticides.

Les facteurs génétiques et biologiques sont inhérents à chaque espèce d'insectes ; par conséquent, ils ne peuvent être -à priori- modifiés par l'homme qui ne pourra intervenir qu'au

niveau des facteurs opérationnels. Ainsi, l'évolution des gènes de résistance est influencée par la pression de sélection exercée par l'utilisation des insecticides en agriculture et en santé publique (Guillet, 1995).

I.9.4 Gestion de la résistance

Il a longtemps été admis que la résistance était le niveau à partir duquel on commençait à observer des échecs de traitements sur le terrain (WHO, 2003). En pratique, les stratégies développées pour contrôler la résistance ont pour but de prévenir la résistance ou de ralentir son développement afin d'éviter qu'elle soit à l'origine d'échecs opérationnels. L'augmentation de la dose d'insecticide appliquée ne fait qu'accroître la pression de sélection ; de même, la multiplication des traitements ne conduit qu'à éliminer les migrants sensibles susceptibles de diluer les gènes de résistance. Il faut donc jouer sur les facteurs opérationnels en cherchant à limiter au maximum la pression de sélection ; c'est pourquoi il est recommandé de :

- choisir un insecticide suffisamment différent de ceux utilisés auparavant ;
- respecter la dose d'application ;
- localiser les traitements insecticides dans le temps et dans l'espace ;
- utiliser des produits synergiques ;
- diversifier les méthodes de lutte.

On distingue trois méthodes de gestion de la résistance chez les insectes :

- la gestion par modération, qui consiste à minimiser la pression de sélection exercée sur un gène de résistance en diminuant la fréquence des applications et les doses d'insecticides, ou encore en utilisant des produits peu rémanents qui se dégradent rapidement dans l'environnement (Leeper *et al.*, 1986) ;

- la gestion par saturation, qui consiste à utiliser des doses d'insecticides suffisamment fortes pour éliminer les individus hétérozygotes résistants de manière à maintenir le gène de résistance fonctionnellement récessif, c'est-à-dire que les hétérozygotes se comportent comme les homozygotes sensibles en présence d'insecticide (Tabashnik & Croft, 1982 ; Roush, 1989) ;

- la gestion par combinaison d'insecticides, qui repose sur l'utilisation combinée d'insecticides ayant des modes d'action différents. Les insecticides peuvent être utilisés de façon simultanée (mélange) ou alternée dans le temps (séquences, rotation) et dans l'espace (mosaïque) (Tabashnik, 1989).

I.10 Apport de la spatialisation dans la lutte antivectorielle

L'approche basée sur l'exploitation des données environnementales recueillies suivant une échelle par les stations météorologiques et par satellite, dite de spatialisation, est développée depuis plus d'une vingtaine d'années (Carnevale & Robert, 2009) ; elle aide à la prise de décision sur les actions de lutte mieux ciblées dans le temps comme dans l'espace.

La répartition et l'évolution des maladies infectieuses dépendent en grande partie des facteurs environnementaux conditionnant la présence ou l'absence des parasites et de leurs hôtes et/ou vecteurs ; une bonne connaissance de ces facteurs permet de prévoir les périodes propices à la transmission.

Le principe de cette approche est d'identifier dans un premier temps les facteurs susceptibles d'influencer la présence et l'abondance des agents pathogènes et des vecteurs ; ils relèvent par exemple de l'altitude, de la température de l'air ou du sol, de la pluviométrie, de l'humidité relative, des types de sols et de végétation (Moffett *et al.*, 2007 ; Sogoba *et al.*, 2007). Les rôles respectifs de ces facteurs sont ensuite évalués en confrontant les données épidémiologiques (présence des hôtes et/ou des vecteurs, prévalence ou incidence des cas) avec les données environnementales. Les données recueillies par satellite permettent de calculer des indices de végétation, dont celui de différence normalisée (normalized difference vegetation index, NDVI) qui renseigne sur l'activité chlorophyllienne du lieu, ainsi que les températures du sol et de l'air. Les satellites météorologiques permettent aussi d'évaluer la pluviométrie à partir de la durée pendant laquelle un pixel est couvert par des nuages à sommet froid (cold-cloud duration ou CCD) et donc porteurs de pluie. Toutes ces données géoréférencées sont ensuite introduites dans un système d'information géographique (SIG) qui en permet l'analyse. L'interprétation de ces résultats doit tenir compte de la variabilité des faciès épidémiologiques du paludisme et nécessite la validation régulière des données de télédétection en les confrontant à celles du terrain.

I.11 Situation du paludisme au Cameroun

Le paludisme demeure l'une des principales causes de morbidité et de mortalité au Cameroun ; les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans constituent les sous-catégories de la population les plus vulnérables. D'importantes ressources ont été mobilisées par l'Etat camerounais avec le déploiement des services préventifs et curatifs et ses partenaires en vue de réduire le poids du paludisme. Ainsi, la morbidité est passée de 27,6% en 2012 à

23,6% en 2016. La mortalité palustre est passée de 17,6% en 2012 à 12,4% en 2016, soit une réduction de 5,2% (PNLP, 2017).

La stratégie de lutte antipaludique au Cameroun repose actuellement sur les trois principales composantes techniques (PNLP, 2017) suivantes :

- la distribution à grande échelle des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) dans la population ;
- le traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte ;
- la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) pour les enfants de 3 à 59 mois dans les régions de l'Extrême-Nord et du Nord.

I.11.1 Faciès épidémiologiques du paludisme au Cameroun

En fonction des variations géo-climatiques, il existe trois principaux faciès épidémiologiques de paludisme au Cameroun :

- le faciès soudano-sahélien dans le Nord et de l'Extrême-Nord du Cameroun, avec une transmission saisonnière de 3 à 6 mois par an ; la prévalence du paludisme dans cette zone est d'environ 25% (PNLP, 2017). Les flambées épidémiques surviennent pendant la saison pluvieuse qui s'étend d'avril à octobre quand pullulent les anophèles ; c'est la période de transmission intense ;

- le faciès des plateaux intérieurs de savanes dans l'Adamaoua, avec une période de transmission longue de 6 à 9 mois par an ; les prévalences plasmodiales dans ce faciès peuvent atteindre 50% pendant les périodes de transmission active ;

- le faciès équatorial forestier du Sud-Cameroun, avec une transmission permanente toute l'année. Les prévalences plasmodiales chez les enfants âgés de moins de 10 ans sont généralement très élevées et peuvent dépasser 50% ; toutefois, le développement d'une forte prémunition dans cette zone maintient l'incidence palustre à un niveau relativement faible (PNLP, 2017).

I.11.2 Vecteurs et transmission du paludisme

Les principaux vecteurs du paludisme en Afrique (*Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus*, *Anopheles moucheti* et *Anopheles nili*) se retrouvent au Cameroun. Les espèces *A. gambiae* s.s. et *A. coluzzii* sont majoritairement rencontrées en zone forestière, *A. arabiensis* en zone aride du Nord du pays et *A. funestus* en zones de forêt et de savane (Chouaïbou *et al.*, 2006 ; Simard *et al.*, 2009). Outre ces quatre espèces, *A. moucheti* et *A. nili* assurent de façon pérenne la transmission locale du paludisme

dans les zones forestières et péri-forestières au sud du pays (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 ; Bamou *et al.*, 2018) ; ces deux espèces sont associées aux biotopes situés le long des rivières et des grands fleuves tels que le Nyong, Ntem, Sanaga... (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2002 ; Awono-Ambene *et al.*, 2004). De plus, d'autres espèces telles que *A. ovengensis* Awono-ambene, 2004, *A. pharoensis* Theobald, 1901, *A. paludis* Theobald, 1900, *A. ziemanni* Grünberg, 1902, *A. marshalli* (Theobald, 1903), *A. rufipes* (Gough, 1910) montrent une importance locale (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 ; Awono-Ambene *et al.*, 2009 ; Tabue *et al.* 2017 ; Bamou *et al.*, 2018).

I.11.3 Traitements antipaludiques

Pendant longtemps en Afrique, l'usage de la chloroquine était le traitement de première intention pour un accès palustre simple (Ringwald *et al.*, 2000). Au Cameroun, la résistance de *P. falciparum* à ce médicament avait été mise en évidence par Sansonetti *et al.* (1985) à Limbé et Hengy *et al.* (1989) à Yaoundé ; ce problème de résistance a conduit au changement de politique de traitement du paludisme de la monothérapie à la bithérapie, avec les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) depuis 2004. Actuellement, le plan stratégique de lutte contre le paludisme du Cameroun préconise la prise en charge des cas au niveau communautaire et des formations sanitaires. Depuis 2016, le traitement du paludisme est gratuit pour les enfants de moins de 5 ans et pour les femmes enceintes dans les formations sanitaires publiques (PNLP, 2017).

CHAPITRE II : CADRE GÉOGRAPHIQUE, MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Cadre géographique

La collecte des échantillons d'*A. gambiae* s.l. a été effectuée en fin de saison des pluies, entre octobre et novembre, durant cinq années consécutives (2011-2015). Les études de taxinomie et les analyses moléculaires des échantillons de moustiques ont été réalisées entre avril 2013 et juillet 2017.

Les échantillons de moustiques ont été collectés dans 38 sites répartis dans les trois districts de santé sélectionnés en raison de la résistance métabolique qui y avait été rapportée antérieurement (Etang *et al.*, 2007 ; Chouaïbou *et al.*, 2008). Ces districts de santé sont présentés à la figure 4, et situés à Garoua (9°18'N ; 13°24'E, Chef-lieu de la Région du Nord), Mayo Oulo (9°46'N ; 13°44'E, 90 km au Nord de Garoua), et Pitoa (9°24'N ; 13°31'E, 18 km au Nord-Est de Garoua). Le tableau I présente leurs coordonnées géographiques, leurs caractéristiques écologiques ainsi que leurs degrés d'occupation par les populations humaines.

II.1.1 Sites d'étude

Dans le district de Garoua, les prospections ont été menées en zone urbaine dans 11 sites (Kanadi I et II, Ouro Housso I et II, Lainde I et II, Djamboutou I et II, Kollere, Mboum Aviation et Plateau), en zone péri-urbaine dans quatre sites (Bocki, Nassarao, Ouro Lawane et Mbilga), et en zone rurale dans deux sites (Lounderou et Ourogarga). Les échantillons d'anophèles ont été collectés dans les gîtes permanents situés autour des habitations et dans des gîtes temporaires constitués des empreintes de sabots de bœufs.

Dans le district de Pitoa, l'échantillonnage a été effectué dans un site en zone péri-urbaine (Guizigare) et dans 11 sites en zone rurale (Mayo Lebri, Kirambo, Boussa, Lombou, Be-Centre, Mbolom, Boula Ibib, Boulgou, Pene, Nassarao-Be et Banaye). Les collectes de larves ont été effectuées dans des flaques d'eau, les ornières et les trous d'emprunt de terre.

Dans le district de Mayo Oulo, les prospections ont été faites dans neuf sites en zone rurale : Mayo Oulo, Dourbeye, Bossoum, Bala, Maboni, Batoum, Boyoum, Doumou et Matra. Les larves ont été collectées dans les gîtes temporaires constitués d'empreintes de sabots de bœufs et de flaques d'eau autour des habitations.

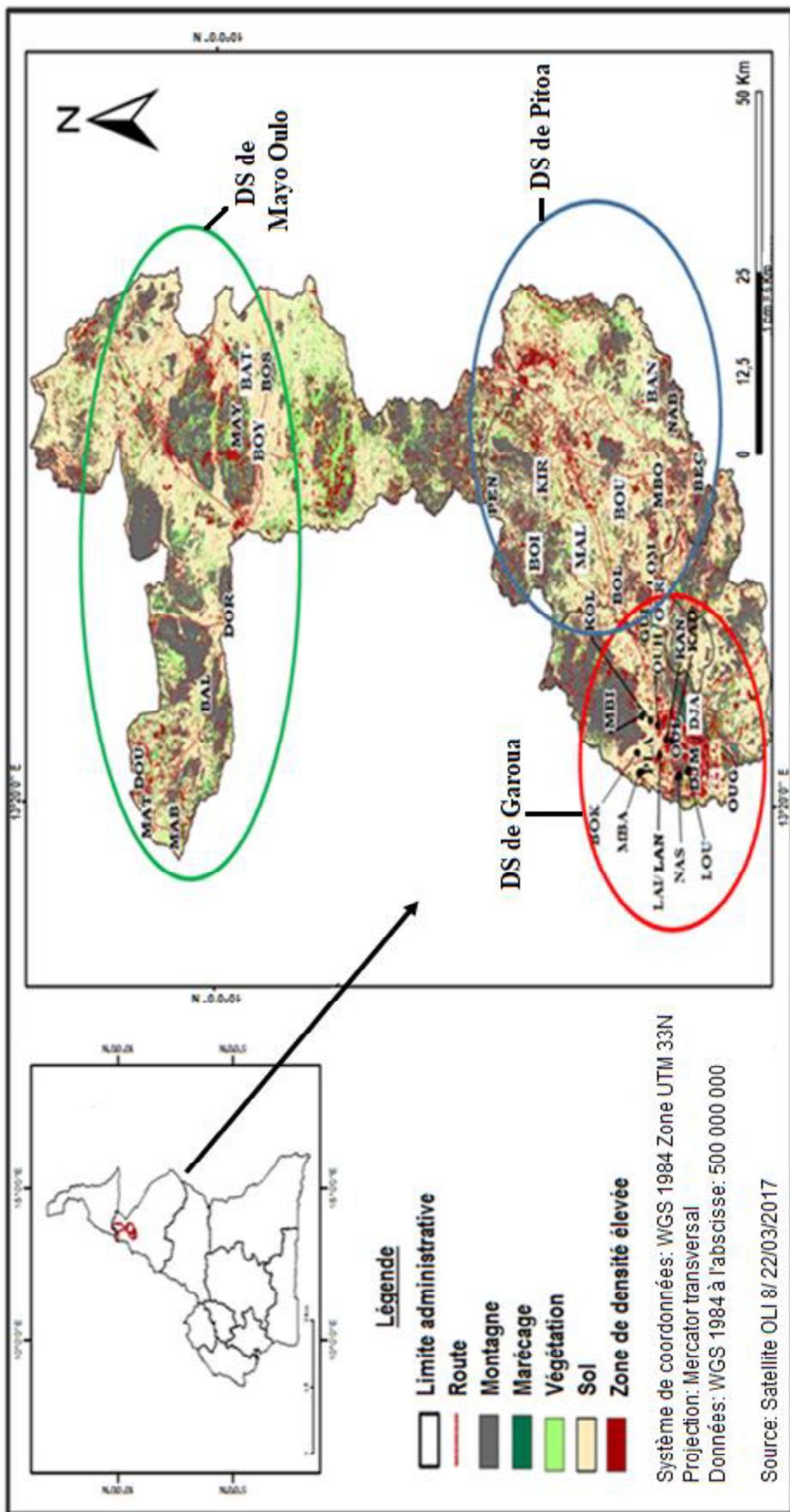


Figure 4 : Carte du Nord-Cameroun montrant les districts de santé étudiés et les sites de collecte des anophèles. Le cercle en rouge entoure les sites du district de santé de Garoua (LAI/LAN: Lainde I et II; OUL: Ouro Lawane; PLA: Plateau; DJM/DJA: Djamboutou II et I; OUG: Oougarga; KAN: Kanadi I; KAD: Kanadi II; MBI: Mbilga; OUH/OUR: Ouro Houso II et I; KOL: Kollere; MBI: Mbilga; NAS: Nassarao; MBA: Mboum Aviation; BOK: Bocki). Le cercle en bleu entoure les sites du district de santé de Pitoa (PEN: Pene; BOL: Boulgou; LOM: Lombou; MBO: Mbolom; NAB: Nassarao-Be; BEC: Be-Centre; GUI: Guizigare; MAL: Mayo Lebri; KIR: Kirambo ; BOI : Boula Ibib ; BAN : Banaye ; BOU : Boussa). Le cercle en vert entoure les sites du district de santé de Mayo Oulo (DOU: Doumou; BOS: Bossoum; DOR: Dourbeyeye; MAY: Mayo Oulo; MAB: Maboni; MAT: Matra; BAL: Bala ; BOY : Boyoum ; BAT : Batoum).

Tableau I : Sites de collecte des larves de moustiques et faciès écologiques

Districts de Santé	Sites de collecte	Coordonnées géographiques	Faciès écologiques	Pourcentage de bâti (%)	
Garoua	Kanadi I	09°18'06''N-18°22'10''E	milieu urbain	80	
	Kanadi II	09°18'08''N-13°22'30''E	milieu urbain	85	
	Ouro Housso I	09°17'44''N-13°22'56''E	milieu urbain	80	
	Ouro Housso II	09°17'35''N-13°22'38''E	milieu urbain	82	
	Lainde I	09°20'30''N-13°25'14''E	milieu urbain	85	
	Lainde II	09°20'40''N-13°25'01''E	milieu urbain	87	
	Djamboutou I	09°19'07''N-13°21'09''E	milieu urbain	77	
	Djamboutou II	09°18'19''N-13°20'48''E	milieu urbain	79	
	Plateau	09°18'21''N-13°22'55''E	milieu urbain	83	
	Nassarao	09°21'40''N-13°26'24''E	milieu semi-urbain	44	
	Ouro Lawane	09°21'31''N-13°25'39''E	milieu semi-urbain	45	
	Mbilga	09°20'41''N-13°23'04''E	milieu semi-urbain	40	
	Louderou	09°19'59''N-13°19'32''E	milieu rural	22	
	Kollere	09°18'03''N-13°23'40''E	milieu urbain	78	
	Mboum Aviation	09°20'41''N-13°23'04''E	milieu urbain	77	
	Bocki	09°21'32''N-13°26'06''E	milieu semi-urbain	40	
	Ourogarga	09°16'30''N-13°17'56''E	milieu rural	20	
	Pitoa	Mayo Lebri	09°31'03''N-13°44'16''E	milieu rural	13
		Guizigare	09°24'25''N-13°31'02''E	milieu semi-urbain	47
		Kirambo	09°28'25''N-13°32'46''E	milieu rural	14
Boula Ibib		09°29'38''N-13°41'27''E	milieu rural	07	
Pene		09°34'47''N-13°37'13''E	milieu rural	15	
Boulgou		09°25'13''N-13°28'87''E	milieu rural	18	
Banaye		09°28'07''N-13°30'47''E	milieu rural	08	
Nassarao-Be		09°18'58''N-13°43'22''E	milieu rural	22	
Boussa		09°32'36''N-13°50'46''E	milieu rural	10	
Lombou		09°20'54''N-13°32'25''E	milieu rural	12	
Mayo Oulo	Be-centre	09°18'54''N-13°40'21''E	milieu rural	09	
	Mbolom	09°19'72''N-13°39'29''E	milieu rural	13	
	Mayo Oulo	09°58'02''N-13°36'82''E	milieu rural	25	
	Boyoum	09°56'37''N-13°38'91''E	milieu rural	12	
	Doumou	10°03'65''N-13°18'25''E	milieu rural	18	
	Matra	10°03'21''N-13°18'16''E	milieu rural	20	
	Maboni	10°02'75''N-13°19'91''E	milieu rural	13	
	Dourbeye	09°59'67''N-13°30'22''E	milieu rural	15	
	Bossoum	09°56'23''N-13°42'51''E	milieu rural	10	
	Batoum	09°56'46''N-13°40'91''E	milieu rural	08	
Bala	10°00'37''N-13°28'02''E	milieu rural	07		

II.1.2 Milieu naturel et population humaine de la Région du Nord

La Région du Nord a une superficie de 65 576 km² avec une population d'environ 1 687 859 habitants (INS, 2013) ; cette population est composée de plusieurs ethnies : les Bororos souvent éleveurs, les Haoussas essentiellement commerçants, et les immigrants (Laka, Toupouri, Massa, Matakam...) souvent cultivateurs. Les districts de santé concernés par notre étude sont situés dans la Cuvette de la Bénoué, entre les 8^e et 10^e degrés de latitudes Nord, en zone de climat soudanien de transition, entre le climat sahélien de l'Extrême-Nord et le climat tropical humide d'altitude du plateau de l'Adamaoua. Cette région est caractérisée par une pluviométrie de type unimodal marquée par une saison des pluies qui dure d'avril à septembre et une saison sèche qui dure d'octobre à mars. Les précipitations moyennes annuelles sont d'environ 1000 mm et la température moyenne annuelle est de 28,1°C (WMO, 2018).

La Région du Nord-Cameroun est arrosée par la Bénoué et ses affluents : le Faro et le Mayo Kébi. On y observe des surfaces résultant du dernier stade d'érosion caractérisées par des faibles dénivellations de terrains anciens du Crétacé, et de larges dépôts alluviaux quaternaires le long des axes hydrographiques ; le profil pédologique de la région est constitué des sols hydroxydes et ferrugineux sur une séquence d'argile sableuse recouverte de nappes de sables grossiers et de calloutis (Regnault, 1986). Les bassins inondables sont caractérisés par des sols argileux, des planosols halomorphes et des vertisols topomorphes (Eno Belinga, 1984).

La couverture végétale de la région est constituée de savanes boisées soudano-sahéliennes, de prairies périodiquement inondées, de galeries forestières soudano- et médio-soudaniennes (Letouzey, 1985).

II.1.3 Activités agricoles

Dans la région du Nord, la culture du coton constitue l'activité économique principale ; cependant, la culture des céréales (sorgho, maïs, riz, mil), de l'arachide et des oignons est aussi pratiquée par les populations locales. L'utilisation des insecticides contre les ravageurs du coton est courante ; les campagnes de traitement des cultures s'étendent chaque année sur une période de cinq mois entre juillet et novembre sous la supervision de la SODECOTON.

II.1.4 Indice de brillance (bâti) de la zone d'étude

A partir du site EARTH-EXPLORER, l'image landsat OLI8 couvrant le grand Nord du Cameroun a été téléchargée (figure 4, page 32). Après traitement nécessaire avec le logiciel ERDAS Imagine 2014, nous avons attribué les classes thématiques en identifiant les couches à

représenter (affleurements rocheux, montagnes, végétations et marécages). La caractérisation des trois grandes zones (urbaine, périurbaine et rurale) a été faite par le calcul du NEO-CANNAL IB (Indice de brillance) à partir de la formule suivante :

$$IB = \sqrt{PIR^2 + R^2} = ((\text{Bande1})^2 + (\text{Bande2})^2 + (\text{Bande3})^2 + \dots + (\text{Bande n})^2) = 1 \text{ ou } 100 ; \text{ où}$$

PIR représente le proche infrarouge et R le rouge.

Après calcul sur l'image de base, lorsque cet indice est de 100, cela indique qu'on est dans une zone à fortes concentrations humaine. Dans notre étude, il a ressorti trois faciès, nous avons distingué le faciès des zones urbaine (IB compris entre 77 et 85%), périurbaine (IB compris entre 40 et 47%) ou rurale (IB compris entre 7 et 25%) dans les trois clusters de recherche (Tableau I, page 33 ; figure 4, page 32).

La superposition de toutes les couches (affleurements rocheux, montagnes, végétations et marécages) obtenue par traitement d'images sur l'IB a favorisé la visualisation progressive du bâti dans les trois districts de santé où l'étude a été réalisée.

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Collecte des larves d'anophèles et élevage en insectarium

Les larves d'*A. gambiae* s.l. ont été collectées suivant la méthode du « dipping » (Silver, 2008) ; elle consiste à prélever de l'eau d'un gîte à l'aide d'une louche et à y rechercher les larves reconnaissables par leur position horizontale à la surface de l'eau. Les larves ainsi prélevées sont transférées dans des bidons contenant de l'eau du gîte et les bidons sont transportés à l'insectarium local où les larves sont mises en élevage dans des bacs ou dans des gobelets en fonction de la manipulation envisagée pour les stades adultes.

Les larves destinées aux tests de sensibilité ont été groupées dans des bacs et nourries avec de la farine pour alevins (TetraMinBaby®) ; leurs nymphes ont été quotidiennement triées puis placées dans des cages couvertes de tulle moustiquaire jusqu'à l'émergence des imagos. Dans les cages, les imagos ont été nourris avec une solution de glucose à 10% ; les femelles reconnaissables par leurs palpes lisses, âgées de 2 à 5 jours, ont été prélevées pour réaliser les tests de sensibilité aux insecticides.

Les larves de stade IV destinées aux études taxinomiques ont été élevées séparément dans des gobelets en plastique de couleur blanche de 50 ml de volume, afin de mieux observer leur développement, couverts de tulle moustiquaire et contenant 20 ml d'eau de source ; elles ont été nourries avec 0,3g de TetraMinBaby® (aliment pour alevins). Après la nymphose et

l'émergence des adultes, chaque spécimen a été conservé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant du gel de silice pour les analyses ultérieures.

II.2.2 Etudes taxinomiques d'*A. gambiae* s.l.

Le protocole des études taxinomiques comprend quatre étapes :

- l'identification des spécimens ;
- la dissection et le montage des organes cibles entre lame et lamelle ;
- les analyses morphologiques ;
- les analyses moléculaires.

II.2.2.1 Identification des spécimens

Les spécimens appartenant au complexe *A. gambiae* ont été identifiés au stade adulte, sous une loupe binoculaire, à l'aide des clés d'identification de Gillies & De Meillon (1968) et Gillies & Coetzee (1987).

II.2.2.2 Dissection et montage des organes

Les spécimens adultes, mâles et femelles, identifiés comme appartenant au complexe *A. gambiae* ont été conservés dans des tubes Eppendorf, ensuite disséqués. Les ailes, les pattes et les palpes maxillaires ont été délicatement détachés du corps et montés entre lame et lamelle sèches.

II.2.2.3 Analyses morphologiques

Les caractères morphologiques des ailes (figure 5), des palpes (figure 6) et des pattes (figure 7) ont été codifiés selon la nomenclature de Harbach & Knight (1980). Les résultats de ces trois organes ont été évalués en se référant aux caractéristiques de l'espèce type du complexe *A. gambiae* (figure 8). Le tableau II présente les terminologies employées pour distinguer les différentes nervures de l'aile.

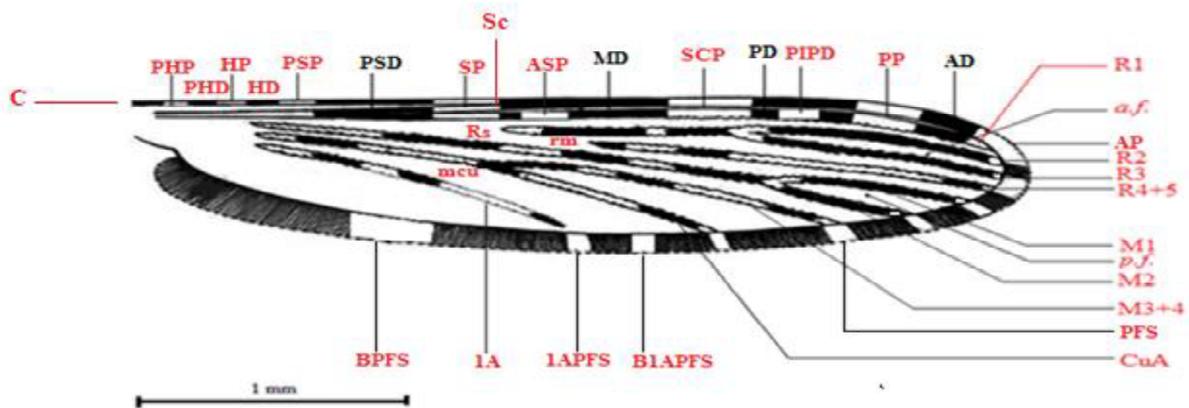


Figure 5 : Schéma d'une aile d'*A. gambiae* s.l. illustrant la nomenclature des caractères pigmentaires de l'aile et des nervures (Harbach & Knight, 1980). **Taches de l'aile :** AD tache apicale sombre, AP tache apicale pâle, ASP tache accessoire sectorielle pâle, BPFS tache pâle basale de la frange alaire, HD tache humérale sombre, HP tache humérale pâle, MD tache médiane sombre, PD tache pré-apicale sombre, PFS tache pâle de la frange alaire, PHD tache pré-humérale sombre, PHP tache pré-humérale pâle, PIPD interruption pâle de la tache pré-apicale sombre, PP tache pré-apicale pâle, PSD tache pré-sectorielle sombre, PSP tache pré-sectorielle pâle, SCP tache sous costale pâle, SP tache sectorielle pâle, 1APFS tache pâle de la frange alaire de la nervure 1A, B1APFS tache pâle de la frange alaire avant la nervure 1A. **Nervures principales :** C, Sc : nervures costale et sub-costale. R1, R2, R3 et R4+5 : nervures radiales. M1, M2 et M3+4 : nervures médianes. CuA : nervure cubitale antérieure. la nervure anale. **Nervures transversales :** mcu : médio-cubitale. rm radio-médiane. Rs : secteur radial. **Cellules :** a.f. cellule antérieure fourchue, p.f. cellule postérieure fourchue.

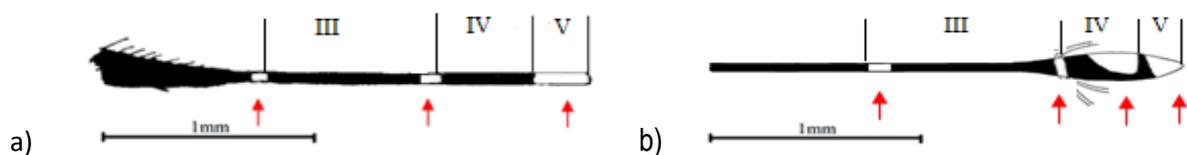


Figure 6 : Schéma des palpes maxillaires d'*A. gambiae* s.l. (Harbach & Knight, 1980). Les flèches indiquent les taches pâles ; a : palpe femelle ; b : palpe mâle ; I, II et III : segments des palpes



Figure 7 : Schéma de la patte postérieure d'*A. gambiae* s.l. (Harbach & Knight, 1980).

Tableau II : Terminologie comparative pour les nervures de l'aile

Gillies & De Meillon (1968)	Harbach & Knight (1980)
Costa	Costa
Subcosta	Subcosta
Nervure 1	Radius (proximale)
Nervure 2	R1 (distale)
Nervure 2.1	Secteur radial (RS)
Nervure 2.2	R2
Nervure 3	R3
Nervure 4	R4+5
Nervure 4.1	Mediane
Nervure 4.2	M1
Nervure 5	M2
Nervure 5.1	CuA
Nervure 5.2	M3+4
Nervure 6	CuA
	1A

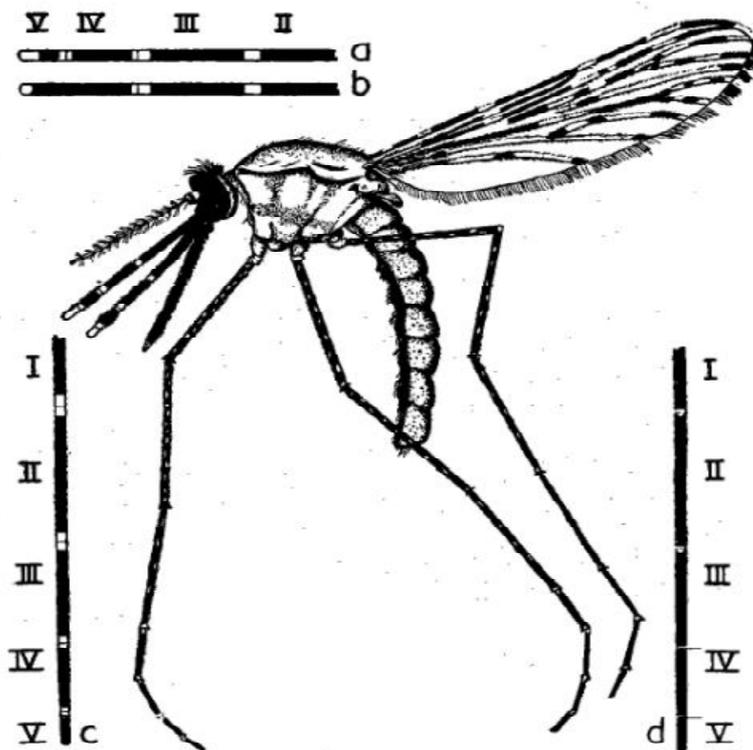


Figure 8 : Adulte femelle type d'*A. gambiae* d'après Holstein, 1949. a : palpe quadrimaculaire typique ; b : palpe à trois bandes typiques ; c : segments du tarse antérieur ; d : segments du tarse postérieur.

Dans l'ensemble, nous avons sélectionné 23 caractères à étudier. Nous avons exclu de notre analyse les caractères pour lesquels les observations étaient constantes chez tous les spécimens étudiés.

Au niveau de l'aile, nous avons étudié la disposition des caractères pigmentaires sur la nervure costale, sur les nervures radiales (R1, R2 et R3), sur les nervures médianes (M1 et M2), sur la nervure anale (1A) et sur la frange de l'aile. Nous avons mesuré, à l'aide d'un micromètre oculaire, la longueur du bout extrême de l'aile sans frange jusqu'à la tangente à la base de l'aile, au niveau de la séparation de l'alula et de l'aile proprement dite (Van Thiel, 1927). La largeur de l'aile a été prise dans sa plus grande dimension. De plus, la longueur des trois côtés du triangle formé par les segments de nervures R2-M2, R2-MCu et M2-Mcu (figure 9) a été mesurée.

Les longueurs du fémur, du tibia et des tarse des pattes prothoraciques, mésothoraciques et métathoraciques et celles des segments III, IV et V des palpes maxillaires ont été également mesurées à l'aide d'un micromètre fixé à des oculaires de 10X d'une loupe calibrée de marque *Leica* (objectif 2X). Le rapport des palpes a été utilisé pour le calcul de l'indice palpal tel que décrit par Coluzzi (1964) ; il est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Indice palpal} = \frac{\text{longueur segment IV du palpe} + \text{longueur segment V du palpe}}{\text{longueur segment III du palpe}}$$

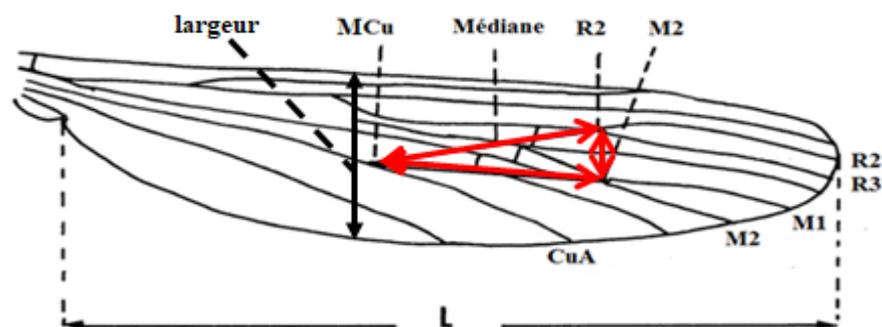


Figure 9 : Illustration des mesures évaluant la forme de l'aile d'anophèle. **Nervures principales :** R2 et R3 nervures radiales. M1 et M2 nervures médianes. CuA : nervure cubitale antérieure. **Nervures transversales :** mcu : médio-cubitale. L : longueur de l'aile.

II.2.2.4 Analyses moléculaires

Les parties restantes d'un spécimen disséqué ont été conservées dans de l'alcool à 70% et stockées à -20°C pour des analyses moléculaires, à l'aide du protocole décrit par Fanello *et al.* (2002). Le protocole détaillé est décrit à la section **II.2.4.4** (page 48).

II.2.3 Tests de sensibilité des anophèles aux insecticides

Les tests de sensibilité ont été réalisés sur des moustiques adultes issus des larves collectées dans les 38 sites sélectionnés dans les districts de santé de Garoua, Pitoa et Mayo Oulo. Le protocole utilisé pour les tests de sensibilité est celui proposé par l'OMS (WHO, 2013); il est basé sur l'exposition des moustiques adultes aux doses discriminatoires d'insecticides sur papiers imprégnés (figure 10). L'insecticide utilisé dans le cadre de cette étude est la deltaméthrine à la concentration de 0,05%. D'autres tests de sensibilité à la deltaméthrine ont été effectués sur des échantillons de moustiques préalablement mis en contact avec des synergistes (PBO à 4%, DEF à 0,25%), en vue d'évaluer l'implication des enzymes de détoxification dans la résistance des échantillons testés. Les papiers imprégnés d'insecticides utilisés ont été fournis par l'Unité de Recherche sur le Contrôle des Vecteurs de l'Université Sains de Malaisie. L'imprégnation des papiers avec synergistes a été réalisée au Laboratoire de Recherche sur le Paludisme de l'OCEAC.

II.2.3.1 Protocole

Le test de sensibilité consiste à prélever, à l'aide d'un aspirateur à bouche, 20 à 25 moustiques femelles (figure 10A et 10B), puis à les introduire dans un cylindre d'observation tapissé de papier non imprégné d'insecticide (figure 10C). Après une heure d'observation, les moustiques sont transférés dans un cylindre d'exposition tapissé de papier imprégné d'insecticide (figure 10D). Pendant le temps d'exposition à l'insecticide (une heure), les moustiques assommés « *knockdown* » sont dénombrés à intervalles de temps réguliers (exemple : 5 minutes) (figure 10E). A la fin de la période d'exposition, les moustiques sont de nouveau transférés dans le cylindre d'observation ; un tampon imbibé d'une solution de glucose à 10% est déposé au-dessus du tube pour nourrir les moustiques soumis aux tests de sensibilité (figure 10F). Ensuite, les moustiques testés sont mis en observation pendant 24 heures dans les conditions d'élevage, au bout de ce temps la mortalité est déterminée. Chaque test de sensibilité nécessite quatre lots de 20 à 25 moustiques exposés à l'insecticide et deux lots témoins de 20 à 25 moustiques non exposés à l'insecticide (WHO, 2013).

Pour les tests de sensibilité avec des synergistes, les moustiques ont été préalablement exposés aux synergistes pendant une heure avant d'être mis en contact pendant une heure avec l'insecticide. Les moustiques issus des tests de sensibilité ont été répartis en trois lots constitués des morts, des survivants et des témoins. Chaque moustique a été placé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant du gel de silice, puis stocké à -20°C pour des analyses moléculaires ultérieures (WHO, 2013).

Au bout des 24 heures, le test est validé si la mortalité du lot témoin est inférieure à 5%. Si elle est supérieure à 20%, le test n'est pas validé et doit être repris ; par contre, si elle est comprise entre 5% et 20%, la mortalité globale des moustiques exposés à l'insecticide est corrigée suivant la formule d'Abbott (1925) :

$$\% \text{ mortalité corrigée} = \frac{\% \text{ mortalité observée} - \% \text{ mortalité témoin}}{100 - \% \text{ mortalité témoin}} \times 100$$

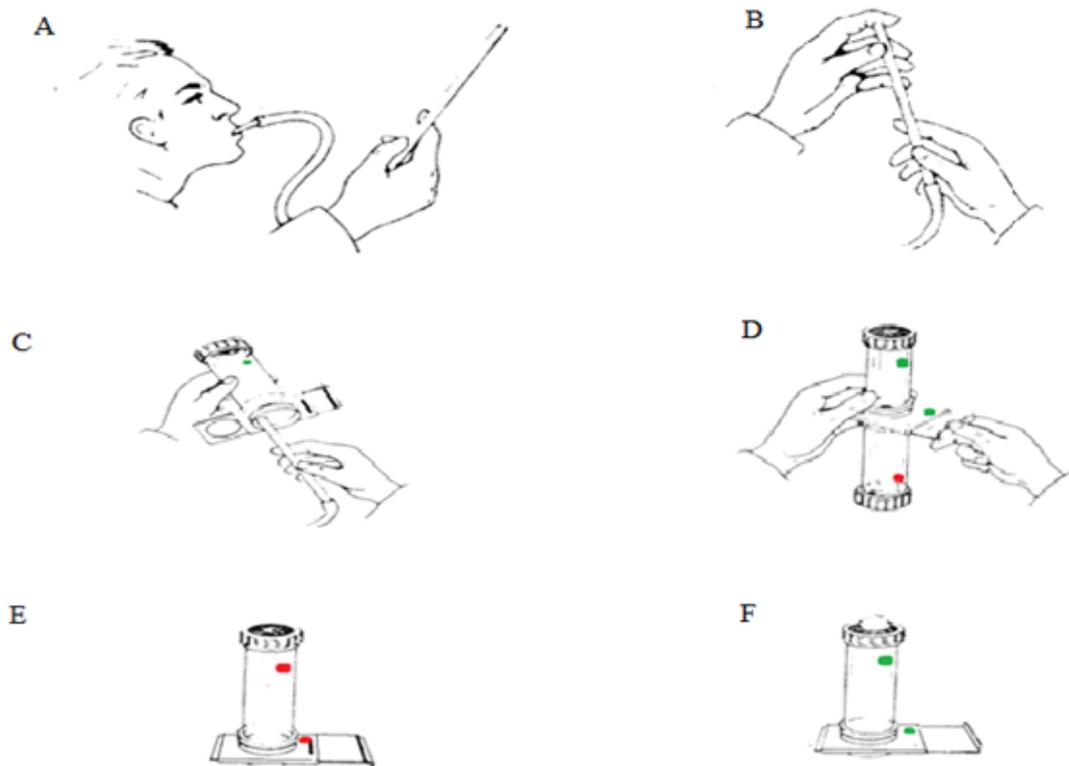


Figure 10 : Illustration des différentes étapes du test de sensibilité aux insecticides (WHO, 2013). (A) : aspirateur à bouche ; (B) : prélèvement des moustiques ; (C) : mise en tube des moustiques ; (D) : tube monté 2 à 2 lors du transfert ; (E) : tube d'exposition ; (F) : tube d'observation.

II.2.3.2 Interprétation des données

Les variables mesurées sont les taux de mortalité, les temps de « *knockdown* » (Tkd) nécessaires pour assommer 50% et 95% de moustiques, l'effet des synergistes et l'autocorrélation spatiale.

II.2.3.2.1 Mortalité

Le taux de mortalité a été interprété selon les critères de l'OMS (WHO, 2013) en vue de déterminer la sensibilité des populations testées, ainsi qu'il suit :

- taux de mortalité < 90% = population résistante ;
- 90% ≤ taux de mortalité < 98% = résistance probable ;
- taux de mortalité ≥ 98% = population sensible.

II.2.3.2.2 Temps de knock down (Tkd) 50% et 95%

Les temps de « *knockdown* » ont été analysés à l'aide du logiciel WIN DL (version 2.0, 1999) qui permet de déterminer les temps nécessaires pour obtenir 50% et 95% de moustiques assommés. A partir des transformations logarithmiques des temps de « *knockdown* » et probits de fréquences cumulées de « *knockdown* », ce logiciel ajuste les résultats à une droite de régression permettant d'estimer les temps de « *knockdown* » 50% (Tkd50) et 95% (Tkd95). A la suite de l'estimation des Tkd50, on peut calculer le rapport de la résistance (RTkd50) des spécimens d'*A. gambiae* s.l. testés par la formule suivante (Raymond *et al.*, 1993) :

$$RTkd50 = \frac{Tkd50_{\text{terrain}}}{Tkd50_{\text{Kisumu}}} ; \text{ où}$$

Tkd50_{terrain} est le temps pour que 50% de moustiques de terrain exposés à l'insecticide seulement soient assommés, et le Tkd50_{Kisumu} le temps pour que 50% de moustiques appartenant à la souche sensible d'*A. gambiae* s.l. (souche Kisumu) soient assommés.

II.2.3.2.3 Effets des synergistes

L'effet des synergistes sur la sensibilité d'*A. gambiae* s.l. a été évalué par la détermination des taux de réversion de l'effet « *knockdown* » (TrKd) formulé par Thomas *et al.* (1991) comme suit :

$$\text{Trkd} = \left[1 - \frac{\text{Tkd}_{50} \text{ synergiste+ insecticide}}{\text{Tkd}_{50} \text{ insecticide}} \right] \times 100 ; \text{ où}$$

$\text{Tkd}_{50} \text{ synergistes+insecticide}$ est le temps nécessaire pour que 50% de moustiques exposés préalablement au synergiste puis à l'insecticide soient assommés, et le $\text{Tkd}_{50} \text{ insecticide}$ le temps pour que 50% de moustiques exposés à l'insecticide seulement soient assommés.

II.2.3.2.4 Autocorrélation spatiale

L'association spatiale mesure l'intensité de la relation entre la proximité des lieux et leur degré de ressemblance (Pumain et Saint-Julien, 1997). Si la présence d'une valeur forte pour une variable X rend sa présence dans les lieux voisins plus au moins probable, on dira que la variable manifeste une autocorrélation spatiale. L'autocorrélation est positive si les lieux proches ont tendance à se ressembler davantage que les lieux éloignés ; elle est négative si les lieux proches ont tendance à être plus différents que les lieux éloignés ; elle est nulle quand aucune relation n'existe entre la proximité des lieux et leur degré de ressemblance (figure 11).

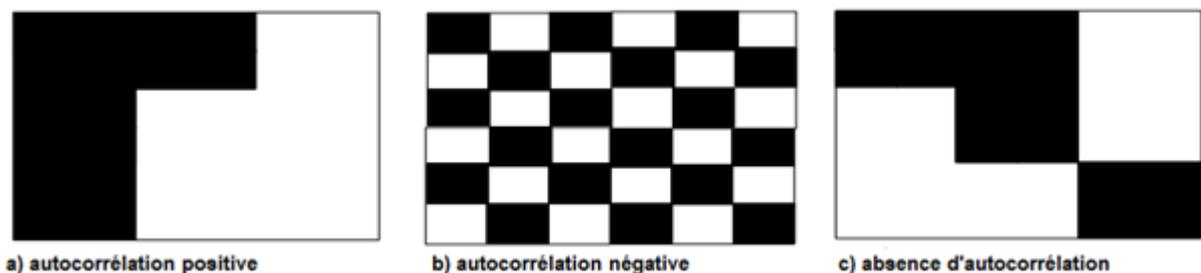


Figure 11 : Illustration de l'autocorrélation spatiale (Pumain & Saint-Julien, 1997).

Les coefficients de corrélation spatiale sont construits de telle manière qu'il soit possible de répondre à la question suivante : la variation de X entre unités géographiques proches est-elle plus ou moins grande que la moyenne des variations observées entre l'ensemble des unités de la zone étudiée prises deux à deux ? Ces coefficients sont exprimés sous la forme de rapports. Le dénominateur est, à une constante près, une mesure générale de la dispersion de X, le plus souvent sa variance σ^2_X . Le numérateur est, en général, soit une mesure de la dispersion statistique des valeurs prises par le caractère dans les unités voisines i et j, soit une mesure de la covariation des valeurs prises par le caractère dans les unités contiguës. Dans un contexte multivarié, ces écarts sont des mesures de distance entre profils ; plus exactement ce sont les distances entre les profils de deux unités voisines dans le premier cas, ou la distance de chaque profil au profil moyen dans le second.

Parmi toutes ces statistiques, l'indice de Moran (encore désigné le *I* de Moran) ne constitue donc qu'une possibilité, bien que jusqu'à présent il est l'indice le plus robuste (Cliff et Ord, 1981). Il constitue une extension du coefficient de corrélation produit-moment de Pearson pour une série univariée (Cliff et Ord, 1973 ; Moran, 1950). La corrélation de Pearson (désignée ρ) entre deux variables x et y, toutes deux de longueur n, est estimée par la formule suivante :

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \right]^{1/2}}, \quad (\text{Moran, 1950})$$

où \bar{x} et \bar{y} sont les moyennes des deux variables ; ρ est mesuré si, en moyenne, x_i et y_i sont associés.

Dans l'étude des modèles et processus spatiaux, on peut logiquement s'attendre à ce que les observations rapprochées soient plus susceptibles d'être similaires que les observations éloignées. Un poids a été associé à chaque paire d'observations (Cliff et Ord, 1981) ; ces poids, parfois appelés fonctions de voisinage, ont pris la valeur 1 pour les voisins proches ou la valeur 0 pour les voisins éloignés.

La formule de I est la suivante :

$$I = \frac{n}{S_0} \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n w_{ij} (x_i - \bar{x})(x_j - \bar{x})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2},$$

(Cheverud *et al.*, 1985)

où w_{ij} est le poids entre les observations i et j , et S_0 est la somme de tous les w_{ij} :

Si la valeur calculée de I (dénommé \hat{I}) est significativement supérieure à $I_0 [-1/(n-1)]$, alors les valeurs de x sont positivement autocorrélées, tandis que si $\hat{I} < I_0$, cela indique une autocorrélation négative ; nous pouvons aussi concevoir des tests unilatéraux ou bilatéraux de manière standard.

II.2.4 Caractérisation moléculaire des spécimens d'*A. gambiae* s.l.

La caractérisation moléculaire des spécimens des différentes populations de moustiques a été nécessaire du fait de la complexité du système vectoriel, notamment du complexe *A. gambiae* au sein duquel les espèces sont morphologiquement semblables ; cette caractérisation moléculaire a été réalisée pour identifier l'espèce à laquelle appartenait chaque spécimen. Pour cela nous avons procédé à une extraction de l'ADN génomique des spécimens et à une amplification génique de cet ADN par PCR.

II.2.4.1 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été faite au cétyl triméthyl ammonium bromide (CTAB) à 2% sur le moustique entier selon le protocole décrit par de Collins *et al.* (1987). Le moustique contenu dans un tube Eppendorf de 1,5ml est broyé dans 200 μ l de CTAB à 2% ; le tube est incubé au bain-marie (65°C) pendant 5 minutes. À ce broyat, 200 μ l de chloroforme sont ajoutés et le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 trs/min à température ambiante. La phase supérieure (surnageant) est prélevée et introduite dans un autre tube stérile dans lequel sont ajoutés 200 μ l d'isopropanol. Le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 trs/min et à température ambiante pour précipiter l'ADN au fond du tube sous forme d'un culot peu visible. L'isopropanol est vidé et le tube égoutté, puis 200 μ l d'éthanol à 70% sont ajoutés au culot ; le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 trs/min pour purifier l'ADN. L'éthanol est enlevé et le culot séché sous vide (Speed-Vac) pendant 5 minutes. L'ADN ainsi extrait est reconstitué dans 20 μ l d'eau stérile, puis incubé à 55°C pendant 5 minutes pour

suspendre le culot. La solution obtenue est mélangée au vortex puis laissée à 4°C pendant une nuit ; elle peut ensuite être stockée à - 20°C pour des analyses moléculaires ultérieures.

II.2.4.2 Principe de la PCR

La réaction de polymérisation en chaîne ou en anglais "polymerase chain reaction" (PCR) est une méthode d'amplification génique *in vitro* permettant de multiplier en grand nombre une séquence ciblée d'ADN ou d'ARN. Cette technique a été utilisée en vue de la discrimination des espèces du complexe *A. gambiae* à partir d'amorces spécifiques (Saïki *et al.*, 1985). Son principe est basé sur la réplication de l'ADN double brin ; cette réplication se fait en trois étapes (figure 12) :

- la dénaturation qui consiste à une séparation des 2 brins de l'ADN sous l'effet d'une température comprise entre 92°C et 95°C pendant 3 minutes ;
- l'hybridation au cours de laquelle les oligonucléotides se fixent en 30 secondes aux extrémités 3' et 5' de la séquence complémentaire de l'ADN cible. La température d'hybridation dépend de la séquence et du nombre de nucléotides des amorces ; elle varie entre 50°C et 65°C ;
- l'élongation au cours de laquelle chaque amorce fixée sur l'un des 2 brins d'ADN va s'étendre dans le sens 3' vers 5' par juxtaposition des nucléotides (dNTPs) sous l'action de l'ADN polymérase ; elle se déroule à une température de 72°C, qui permet à l'ADN polymérase thermostable (*Thermus aquaticus* ou Taq) de synthétiser les brins complémentaires à partir des amorces oligonucléotidiques, en présence des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) correspondant aux quatre bases et de doubler la séquence d'ADN cible. Cette étape dure entre 30 secondes et 2 minutes, puis un nouveau cycle recommence.

Ces trois étapes peuvent être répétées un grand nombre de fois selon la quantité d'ADN de départ, aboutissant à la multiplication exponentielle de l'ADN cible par 2^n : c'est l'amplification.

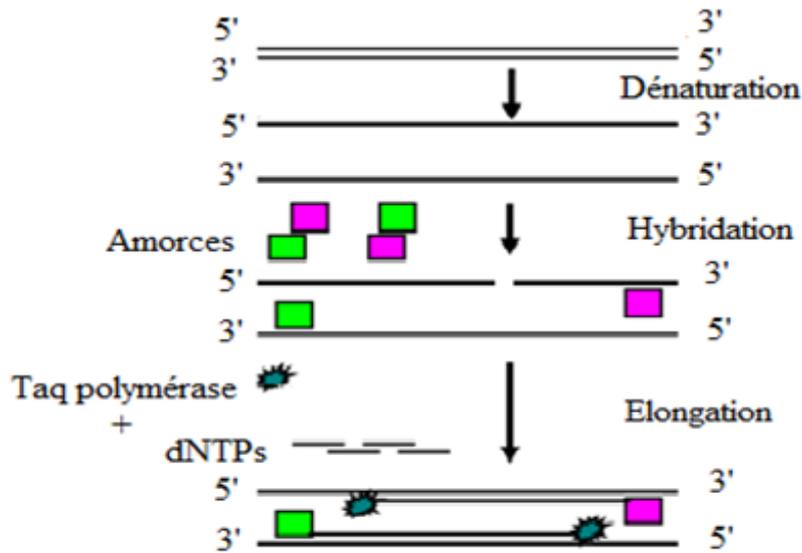


Figure 12 : Schéma illustrant le principe de la PCR (Saïki *et al.*, 1985).

II.2.4.3 Principe de l'identification des espèces du complexe *A. gambiae*

L'identification des espèces du complexe *A. gambiae* est faite sur la base d'une PCR ciblant l'acide désoxyribonucléique ribosomal (ADNr) mise au point par Scott *et al.* (1993). Lors de cette PCR la réaction fait intervenir quatre amorces dont une est dite « Universelle » (UN) et encore appelée amorce « sens », désignée sur une séquence du gène codant pour la sous-unité 28S de l'acide ribonucléique ribosomal (ARNr) qui est très conservée chez les diptères. L'hybridation a lieu du côté 5' de cette séquence. Les trois autres amorces appelées « antisens » sont spécifiques d'espèces et sont désignées dans les séquences polymorphes des espaces intergéniques (IGS) de l'ADNr. Les espèces du complexe *A. gambiae* possèdent un ADNr constitué d'une collection d'unités répétées à plus de 500 copies (figure 13).

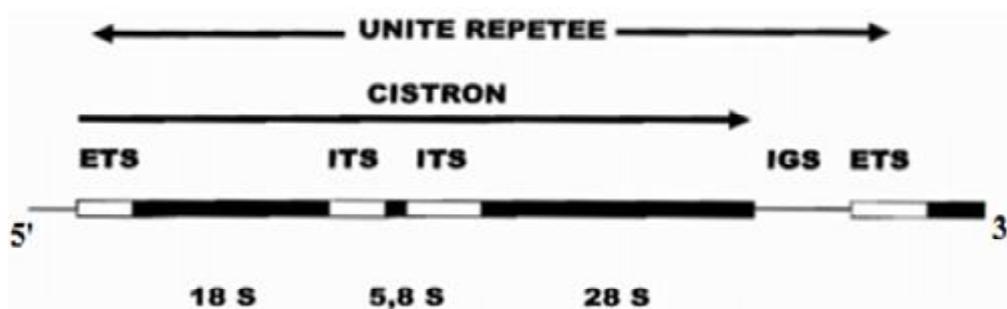


Figure 13 : Représentation schématique d'une copie de l'ADN ribosomal (Scott *et al.*, 1993). ETS : espace transcrit externe, ITS : espace transcrit interne, IGS : espace Intergénique.

II.2.4.4 Identification des espèces du complexe *A. gambiae*

Les espèces du complexe *A. gambiae* ont été identifiées par la technique de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) d'après le protocole de Fanello *et al.* (2002) ; cette technique comprend deux étapes : l'amplification génique et la digestion enzymatique.

II.2.4.4.1 Amplification génique

L'amplification de l'ADN extrait à partir des moustiques entiers a été réalisée dans un volume final de 25 µl de milieu réactionnel dont la composition est présentée dans le tableau III.

Tableau III : Composition du milieu réactionnel d'une PCR pour l'identification des espèces du complexe *A. gambiae*

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 réaction à 25µl
ddH ₂ O	-	17.4µl
Tampon de Taq 10X	1X	2.5µl
25mM MgCl ₂	0.5mM	0.5µl
10mMdNTP each	0.2 mM	0.5µl
Amorce UN (10µm)	5 pmoles	0.5µl
Amorce AG (10µm)	5 pmoles	0.5µl
Amorce AA (10µm)	5 pmoles	0.5µl
Amorce AM (10µm)	5 pmoles	0.5µl
Taq DNA Poly (5U/µl)	0.5 U	0.1µl
DNA Template (1 à 5ng µl)	-	2.0µl
Total	-	25,0µl

ddH₂O : eau bidistillée, dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates, MgCl₂ : chlorure de magnésium, UN : universelle ; AG : *Anopheles gambiae* ; AA : *Anopheles arabiensis* ; AM : *Anopheles melas* ; Taq : *Thermus aquaticus* ; DNA : acide désoxyribonucleique ; mM : millimolaire ; µl : microlitre ; U : unité.

Les séquences des amorces utilisées sont composées de la manière suivante :

- UN (universelle) : 5'GTGTGCCGCTTCCTCGATGT 3' ;
- AG (*Anopheles gambiae*): 5'CTGGTTTGGTCGGCACGTTT 3' ;
- AA (*Anopheles arabiensis*) : 5'AAGTGCCTTCTCCATCCTA 3' ;
- AM (*Anopheles melas*): 5'GTGACCAACCCACTCCTTGA 3'.

Toutes les réactions d'amplification se sont déroulées dans un thermocycleur de marque « 2720 Thermal Cycler » (Applied Biosystems) ; les cycles de températures sont présentés dans la figure 14.

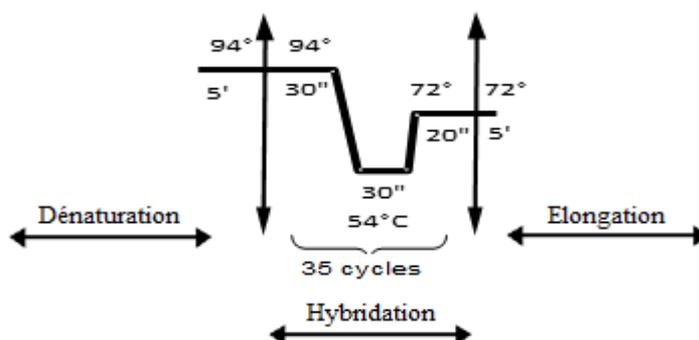
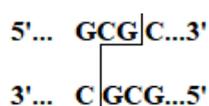


Figure 14 : Différentes étapes et cycles de températures d'une PCR pour l'identification des espèces du complexe *A. gambiae*.

II.2.4.4.2 Digestion enzymatique

Les fragments d'ADN amplifiés ont été digérés à l'aide de l'enzyme HhaI (*Haemophilus haemoliticus*) qui coupe les fragments au niveau de leurs sites de restriction tel que présenté ci-dessous :



Ainsi, la digestion de deux brins d'ADN, pour un locus donné, produit des fragments de longueurs inégales en fonction des différentes espèces et leur migration sur un gel d'agarose à 2%, permet ainsi de distinguer *A. coluzzii*, *A. gambiae* s.s., *A. arabiensis* et *A. melas*. La composition du milieu réactionnel préparé pour la digestion enzymatique est présentée dans le tableau IV.

Tableau IV : Composition du milieu réactionnel d'une digestion enzymatique spécifique d'*A. gambiae* s.s. et d'*A. coluzzii*

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 réaction à 25µl
Tampon d'enzyme 10X	1X	2.5µl
Enzyme HhaI	2.5 U	0.25µl
BSA	-	0.25µl
ddH ₂ O	-	12µl
Total	-	15µl

HhaI : *Haemophilus haemoliticus* ; BSA : bovine serum albumin ; ddH₂O : eau bidistillée ; U : unité ; µl : microlitre.

Les échantillons d'ADN amplifiés destinés à la digestion ont été incubés à 37°C pendant 3 heures ; ils ont par la suite été mélangés chacun avec 1µl de bleu de bromophénol (tampon de charge), transférés dans les puits d'un gel d'agarose à 2%, puis mis à migrer sous une tension de 140 volts (V) pendant 45 minutes. Le profil des bandes attendues pour chaque espèce après la digestion est présenté à la figure 15 et est détaillé de la manière suivante :

- *A. arabiensis* présente une bande à 292 paires de bases ;
- *A. coluzzii* présente une bande à 367 paires de bases ;
- *A. gambiae* s.s. présente une bande à 257 paires de bases;
- *A. melas* présente une bande à 435 paires de bases.

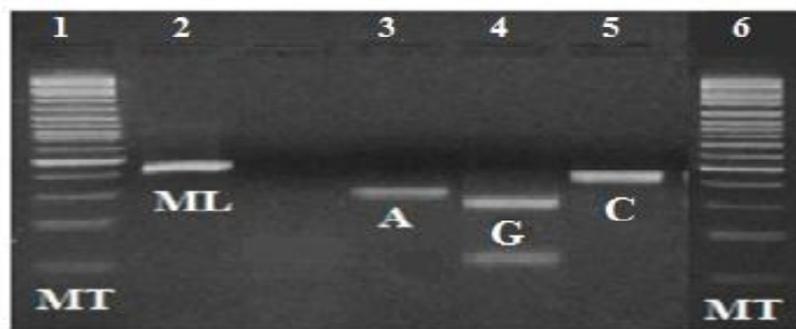


Figure 15 : Photographie d'un gel montrant l'identification simultanée des espèces du complexe *A. gambiae* (Fanello *et al.*, 2002). MT : marqueur de poids moléculaire de 100 paires de bases ; ML : *A. melas* ; A : *A. arabiensis* ; G : *A. gambiae* s.s. ; C : *A. coluzzii*.

II.2.5 Recherche des mutations « kdr » L995F et L995S chez *A. gambiae* s.l.

La recherche des mutations « kdr » au locus 995, qui était anciennement connu sous le nom de locus 1014 (Clarkson *et al.*, 2018) site d'action du DDT et des pyréthrinoïdes, a été faite par la technique HOLA (Heated Oligonucleotide Ligation Assay) décrite par Lynd *et al.* (2005).

II.2.5.1 Principe de la ligation à chaud (HOLA)

La technique HOLA comprend deux étapes : l'amplification de la région de l'ADN entourant le locus « kdr » et une réaction de ligation à chaud entre des oligonucléotides détecteurs (marqués à la biotine) à l'extrémité 5' et des oligonucléotides reporteurs (marqués à la fluorésceine) à l'extrémité 3', en présence de l'ampligase entre 58°C et 60°C (figure 16). Les oligonucléotides (détecteurs et reporteurs) utilisés dans la réaction de ligation sont spécifiques de chacune des deux mutations. Les produits de la ligation, capturés par la streptavidine adsorbée sur les parois d'une plaque de microtitration, développent une réaction colorée en

présence de l'antifluoresceine et de son substrat (tétraméthylbenzidine). La coloration ne se développe qu'en présence de l'allèle spécifique de la mutation recherchée par chaque couple d'oligonucléotides utilisés, permettant ainsi la détermination du génotype.

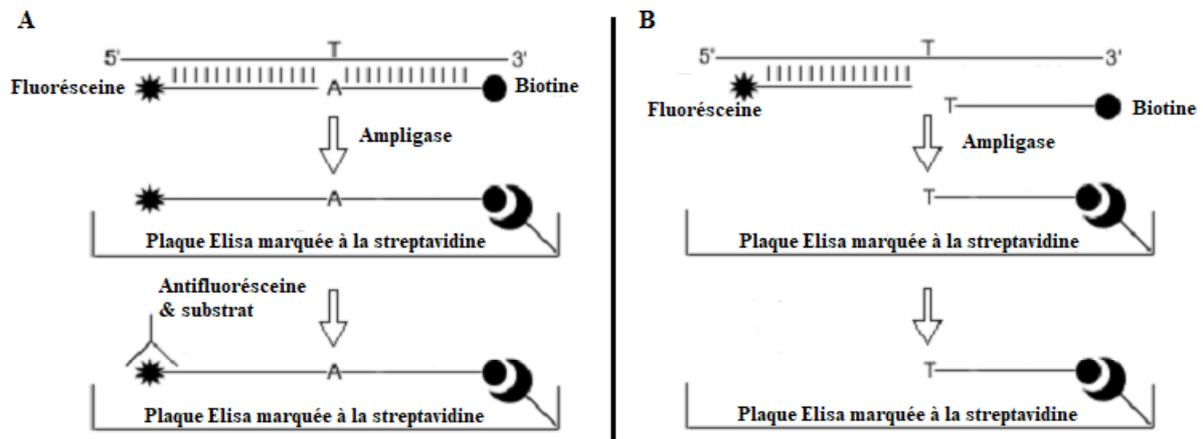


Figure 16 : Illustration du principe de la technique HOLA pour la détection de l'allèle résistant 995F du gène « kdr » (Lynd *et al.*, 2005). A : illustration d'un résultat positif ; B : illustration d'un résultat négatif.

II.2.5.2 Mode opératoire

II.2.5.2.1 Préparation des plaques

Ce préalable commence par la distribution de 100µl de la solution de streptavidine à 5µg/ml dans chacun des puits d'une plaque de microtitration qui sera ensuite incubée dans une étuve à 37°C pendant toute la nuit. Après séchage, la plaque est lavée quatre fois avec 250µl de PBS/Tween 20 (PBS 1X, 0.1% v/v Tween 20) ; les puits sont ensuite remplis de 200µl d'une solution de blocage (PBS 1X, 0.1% v/v Tween 20, 2% w/v BSA) et la plaque est incubée à la température ambiante pendant une heure. La plaque est à nouveau lavée quatre fois avec 250µl de PBS/Tween 20, pour éliminer le BSA (Bovine Serum Albumin) non adsorbé, puis conservée à 4°C. La plaque ainsi préparée peut être conservée à + 4°C pendant une semaine, délai après lequel elle n'est plus utilisable.

II.2.5.2.2 Amplification du fragment d'ADN au locus « kdr »

La région cible de l'ADN de 293 paires de bases renfermant le locus « kdr » a été amplifiée à partir de 4µl de suspension d'ADN génomique total. La réaction a été réalisée dans un volume final de 20µl contenant de la Taq DNA Polymérase (ADN polymérase thermostable) du tampon Taq, du MgCl₂, des dNTP (dinucléotides triphosphates), des amorces

oligonucléotides spécifiques (AgD1 et AgD2) et de l'eau bidistillée (ddH₂O). La composition du mélange réactionnel est présentée au tableau V.

Tableau V : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification PCR du fragment d'ADN renfermant le locus « kdr »

Réactifs	Concentration finale	Pour 1 réaction à 20µl
ddH ₂ O	-	11.04µl
Tampon de Taq 10X	1X	2.0µl
25 mM MgCl ₂	1 Mm	0.8µl
10 mM dNTP	0.1 Mm	0.4µl
Amorce AgD1	4 pmoles	0.8µl
Amorce AgD2	4 pmoles	0.8µl
Taq DNA polymerase	0.4 U	0.16µl
DNA template	-	4.0µl
Total	-	20,0µl

ddH₂O : eau bidistillée ; dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates ; MgCl₂ : chlorure de magnésium ; AgD1 : amorce sens commune à la souche homozygote ; AgD2 : amorce anti-sens commune à la souche hétérozygote ; Taq : *Thermus aquaticus* ; DNA : acide désoxyribonucléique ; mM : millimolaire ; µl : microlitre ; U : unité.

Les séquences des amorces utilisées sont composées de la manière suivante :

- AGD1 : 5' ATAGATTCCCCGACCATG 3'
- AGD2 : 5' AGACAAGGATGATGAACC 3'

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un thermocycleur de marque « 2720 Thermal Cycler » (Applied Biosystems) selon les cycles de températures présentés à la figure 17.

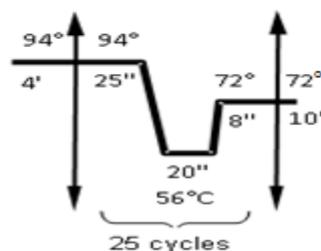


Figure 17 : Cycles des températures d'une PCR de la mutation « kdr ».

II.2.5.2.3 Ligation

L'ADN amplifié de chaque moustique est soumis à trois réactions de ligation à chaud :

- une réaction mettant en évidence l'allèle sensible 995L ;
- une réaction mettant en évidence l'allèle résistant 995F du gène « kdr » ;
- une réaction mettant en évidence l'allèle résistant 995S du gène « kdr ».

Les séquences des amorces utilisées pour la ligation sont consignées dans le tableau VI.

Tableau VI : Séquences des différentes amorces utilisées pour la ligation.

Description	Amorce	Oligo seq 5'-3' et marquage
Détecteur allèle résistant kdr/Est	Kdr995S-DTe	ATTTGCATTACTTACGACTG 5'biotin
Reporteur allèle kdr/Est	Kdr995-Rte	AATTTTCCTATCACTACAGTG 5'Phosph/3'Fluorescein
Détecteur allèle sensible kdr/Ouest	Kdr995L-DTw	AATTTGCATTACTTACGACT 5'biotin
Détecteur allèle résistant kdr/Ouest	Kdr995F-DTw	AATTTGCATTACTTACGACA 5'biotin
Reporteur allèle kdr/Ouest	Kdr995-RTw	AAATTTTCCTATCACTACAGT 5'Phosph/3'Fluorescein

Ces amorces sont constituées d'un oligonucléotide détecteur (DTe ou DTw) et d'un oligonucléotide reporteur (Rte ou RTw) dont les combinaisons permettent d'obtenir les géotypes suivants :

- Kdr 995S-DTe/ Kdr 995-RTe: allèle résistant « kdr » Est;
- Kdr 995L-DTw/ Kdr 995-RTw: allèle sensible « kdr »;
- Kdr 995F-DTw/ Kdr 995-RTw: allèle résistant « kdr » Ouest.

Trois milieux réactionnels différant par les amorces (sensible, résistant « kdr » Ouest ou résistant « kdr » Est) ont été préparés pour chaque réaction de ligation ; la composition de chacun des milieux est présentée au tableau VII.

Tableau VII : Composition du milieu réactionnel d'une ligation à chaud pour la détection de la mutation « kdr ».

Réactifs	Concentration finale	Pour une réaction de 15µl
ddH ₂ O	-	10,1µl
Tampon 10X	1X	1,5µl
Amorce (ES ou WL ou WF)	50Nm	0,75µl
Ampligase	0.75U	0,15µl
ADN amplifié		2,5µl
Total	-	15µl

ddH₂O : eau bidistillée ; ES : allèle résistant « kdr »-Afrique de l'Est ; WL : allèle sensible ; WF : allèle résistant « kdr »-Afrique de l'Ouest ; nM : nanomolaire ; µl : microlitre ; U : unité.

Les réactions de ligation se sont déroulées dans un thermocycleur de marque « 2720 Thermal Cycler » (Applied Biosystems) selon les cycles de température présentés dans la figure 18.

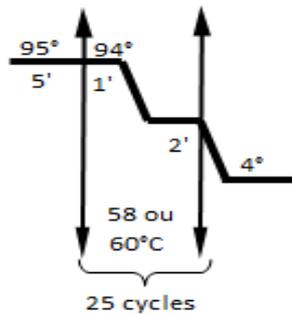


Figure 18 : Cycles de températures d'une réaction de ligation pour la détection de la mutation « kdr ».

d. Révélation

Le protocole de révélation des génotypes « kdr » consiste à ajouter 15 μ l de TNE (1M Tris-HCl PH 7.5 ; EDTA PH 8 ; 5M NaCl) au produit de ligation, ensuite à distribuer les 30 μ l du mélange ainsi obtenu dans les puits de la plaque préalablement marquée à la streptavidine ; par la suite la plaque est conservée à température ambiante à l'obscurité pendant 30 minutes. Le mélange est délicatement retiré à l'aide d'une pipette multicanale. La plaque est lavée deux fois avec 250 μ l du Wash buffer 1 (10Mm NaOH. 0.05% v/v Tween 20) fraîchement préparé, puis deux fois avec 250 μ l du Wash buffer 2 (0.1 Tris-HCl PH 7.5 ; 0.15M NaCl ; 0.05% v/v Tween 20). Ensuite, 30 μ l d'une solution d'anti-fluorescéine sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée à température ambiante pendant 30 minutes. L'anti-fluorescéine est délicatement évacuée et la plaque est à nouveau lavée trois fois avec 250 μ l du Wash buffer 2. Les traces de tampon sont éliminées en tapant la plaque contre un papier buvard, puis 100 μ l d'une solution Tétraméthyl benzidine (TMB, Roche BM blue, Pod substrate) sont ajoutés. Pour la recherche des différents allèles, trois répliques du produit de ligation de chaque individu ont été placées dans trois puits correspondant chacun à un allèle, soit WL pour l'allèle sensible 995L, WF pour l'allèle résistant 995F et ES pour l'allèle résistant 995S. Dans chaque puits, au bout de cinq minutes, une coloration bleue apparaît au fond des puits, matérialisant ainsi la dégradation du substrat et la révélation de l'allèle « kdr » correspondant (figure 19).

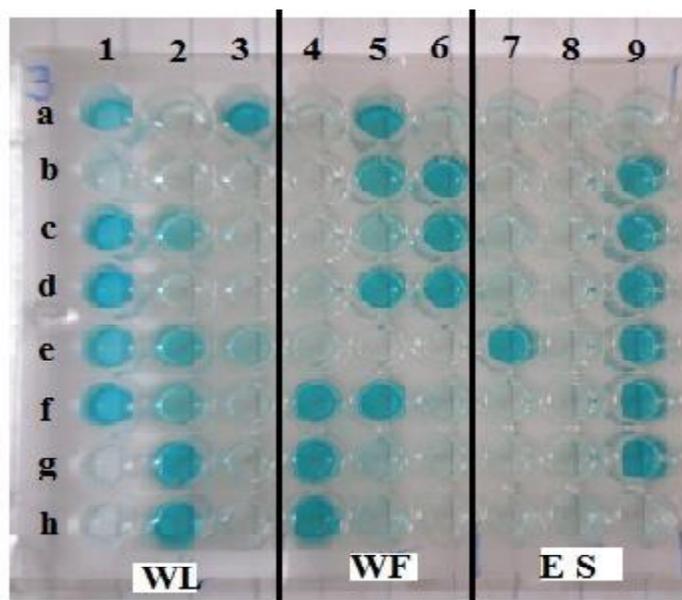


Figure 19 : Plaque de microtitration présentant la réaction des différents génotypes de la mutation « kdr » obtenue par la technique HOLA. **WL** : allèle sensible ; **WF** : allèle résistant kdr-Afrique de l'Ouest ; **ES** : allèle résistant kdr-Afrique de l'Est.

Sur la figure 19, les puits 1a à 3h représentent la première réplique pour la révélation de l'allèle 995L, ceux désignés 4a à 6h la deuxième réplique pour l'allèle 995F et ceux nommés 7a à 9h la troisième réplique pour l'allèle 995S. L'interprétation des résultats est faite ainsi qu'il suit :

- les puits 1a, 4a et 7a représentent un individu homozygote sensible (995L) ; étant donné que seul 1a est coloré, cet individu ne présente pas d'allèle de résistance (995F et 995S) ;
- les puits 1g, 4g et 7g représentent un individu homozygote « kdr » 995F ; parce que seul 4g est coloré, l'individu n'a donc pas d'allèle sensible ;
- la série des puits 3f, 6f et 9f, où seul 9f est coloré, représente un individu homozygote « kdr » 995S ;
- la série des puits 1f, 4f et 7f, où les 2 puits 1f et 4f sont colorés, représente un individu hétérozygote 995L-995F ;
- la série des puits 1e, 4e, 7e, où les puits 1e et 7e sont colorés, représente un individu hétérozygote 995L-995F.

II.2.6 Analyses des données

II.2.6.1 Test de conformité de l'équilibre de Hardy-Weinberg

Afin de tester la conformité à une rencontre aléatoire des gamètes dans les échantillons de moustiques collectés dans les trois DS prospectés entre 2011 et 2014, nous avons eu recours au modèle de Hardy-Weinberg.

Ce modèle décrit les relations entre les fréquences alléliques et génotypiques dans une population en équilibre. La notion d'équilibre (fréquences alléliques stables d'une génération à une autre c'est-à-dire plus rien ne bouge) dans le modèle de Hardy-Weinberg est soumise aux conditions suivantes :

- le modèle concerne les espèces diploïdes qui se reproduisent de façon sexuée ;
- la population est panmictique : les couples se forment au hasard (panmixie) et leurs gamètes se rencontrent au hasard (pangamie) ;
- la population est de taille infinie pour minimiser les variations d'échantillonnage ;
- il ne doit y avoir ni sélection, ni mutation, ni migration ; de ce fait, il n'y a ni perte, ni gain d'allèles ;
- les générations successives sont non chevauchantes : il n'y a pas de croisement entre individus de différentes générations (De Meeûs, 2012).

L'excès ou le déficit d'hétérozygotes a été estimé par l'indice F_{is} de Wright (1951) qui correspond à l'écart à la panmixie au sein de chaque population ; cet indice a été calculé selon la méthode de Weir et Cockerham (1984) :

$$F_{is} = (H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e) ; \text{ où}$$

H_o est l'hétérozygotie observée et H_e l'hétérozygotie attendue, calculées à partir des fréquences alléliques sous les hypothèses de Hardy-Weinberg. Cet indice reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations ainsi : F_{is} : exprime l'excès ($F_{is} < 0$) ou le déficit ($F_{is} > 0$) en hétérozygotes et exprime une population en équilibre de Hardy-Weinberg ($F_{is} = 0$) ou une fixation complète ($F_{is} = 1$).

II.2.6.2 Fréquences génotypiques et fréquences alléliques d'une population pour un locus donné

Pour un locus donné, on détermine les différents génotypes présents dans une population. Ceci permet de définir les fréquences génotypiques. Si les individus sont diploïdes, la présence de 2 allèles (identiques ou différents) sera notée pour chaque locus. Ainsi, les

fréquences alléliques sont déduites des fréquences génotypiques en utilisant le logiciel Genepop en ligne version 4.5.1 (Rousset, 2008).

En effet, au locus «kdr», les fréquences génotypiques et alléliques des populations ont été déterminées tel qu'indiqué dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Calcul des fréquences génotypiques et alléliques

Allèles	Effectifs	Fréquences alléliques
A1 : 995L	2N11+N12	$P1 = (2N11+N12)/2N$
A2 : 995F ou 995S	2N22+N12	$P2 = (2N22+N12)/2N$
Génotypes	Effectifs	Fréquences génotypiques
A1A1 : 995L995L	N11	$P11 = N11/N$
A1A2 : 995L995F ou 995L995S	N12	$P12 = N12/N$
A2A2 : 995F995F ou 995S995S	N22	$P22 = N22/N$

$P1+P2=1$; N11 : effectif des individus ayant l'allèle 995L à l'état homozygote ; N22 : effectif des individus ayant l'allèle 995F ou 995S à l'état homozygote ; N12 : effectif des individus ayant les deux allèles (hétérozygotes) ; N : effectif total des individus dans la population.

II.2.6.3 Analyses statistiques

La comparaison de la distribution d'abondances des trois espèces chez les moustiques et mâles et les moustiques femelles a été effectuée en utilisant le test du Khi deux (χ^2).

La comparaison des moyennes des mesures obtenues pour les ailes, les pattes et les palpes chez les trois espèces a été effectuée en utilisant l'analyse de variance à un seul facteur (one-way ANOVA).

La comparaison des moyennes des mesures obtenues entre les mâles et les femelles a été effectuée en utilisant un test "t" de student.

La comparaison des taux de mortalité entre les tests de sensibilité à la deltaméthrine avec ou sans synergistes a été effectuée en utilisant le test de chi-deux.

L'évaluation des tendances des mesures de la mortalité et des Tkd50 des zones rurales vers les zones urbaines en fonction du temps a été réalisée en utilisant le test de Jonckheere-Terpstra k-échantillon, dont l'hypothèse nulle stipule que tous les échantillons proviennent d'une même population et l'hypothèse alternative qu'il y a une dynamique.

L'analyse multifactorielle (MFA) en utilisant le package FactoMineR a permis d'évaluer la corrélation entre les taux de mortalité, la diversité biologique et la mutation L995F.

Les données ont été enregistrées sur Excel et analysées grâce aux logiciels R version 3.5.0 (R Development Core Team, 2018), MedCalc version 16.8.4 et Genepop version 4.5.1 (Rousset, 2008).

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III.1 Résultats

III.1.1 Données taxinomiques chez *Anopheles gambiae* s.l.

Les échantillons d'*A. gambiae* s.l. soumis à l'étude taxinomique ont été collectés en 2015, dans six des sites représentatifs des trois districts de santé ciblés, notamment Bocki et Kanadi II dans le district de santé de Garoua, Lombou et Guizigare dans le DS de Pitoa, Mayo oulo et Bala dans le district de santé de Mayo Oulo.

III.1.1.1 Distribution d'abondance des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

Le tableau IX présente la distribution des espèces au sein des échantillons de moustiques soumis aux études morphologiques et morphométriques. Sur les 229 spécimens analysés, 142 étaient des femelles et 87 des mâles, soit une sex-ratio de 1,5 en faveur des femelles. Au total, trois espèces du complexe *A. gambiae* ont été identifiées, à savoir *A. arabiensis* (51%) comme espèce majoritaire, suivie d'*A. coluzzii* (33%) et d'*A. gambiae* s.s. (16%).

Tableau IX : Distribution d'abondance des espèces du complexe *A. gambiae* soumis à l'étude taxinomique

Districts de Santé	Effectif (%)	Espèces du complexe <i>A. gambiae</i>			X ²	ddl	Valeur de p
		<i>A. arabiensis</i> (%)	<i>A. coluzzii</i> (%)	<i>A. gambiae</i> s.s. (%)			
Garoua	N	83 (36,2)	34 (14,8)	39 (17,0)	0,25	2	0,9
	Nm	34 (14,8)	13 (5,6)	18 (7,9)			
	Nf	49 (21,4)	21 (9,2)	21 (9,2)			
Mayo Oulo	N	55 (24,0)	36 (15,7)	2 (0,9)			
	Nm	27 (11,8)	17 (7,4)	1 (0,4)			
	Nf	28 (12,2)	19 (8,3)	1 (0,4)			
Pitoa	N	92 (40,2)	48 (21,0)	35 (15,2)			
	Nm	26 (11,3)	13 (5,6)	11 (4,8)			
	Nf	65 (28,4)	35 (15,3)	24 (10,5)			
Total	Nt	229 (100,0)	118 (51,0)	76 (33,0)			

N : taille des échantillons collectés dans chaque District de Santé ; Nm : taille des échantillons chez les mâles ; Nf : taille des échantillons collectés chez les femelles ; Nt : taille des échantillons collectés dans les trois districts de santé ; p : reflète la différence de distribution d'espèces entre les mâles et les femelles au sein des échantillons analysés ; ddl : degré de liberté ; X² : test du Khi deux.

Parmi les individus de chaque district de santé, la distribution d'abondance des trois espèces chez les moustiques femelles et les moustiques mâles n'était pas significativement différente ($X^2= 0,25$; $p > 0,05$) ; toutefois, cette distribution d'abondance des espèces a varié d'un district de santé à l'autre. Dans les districts de santé de Garoua et Pitoa, *A. arabiensis* et *A. coluzzii* étaient les espèces majoritaires aussi bien chez les femelles que chez les mâles. Chez *A. arabiensis* la fréquence des femelles a varié de 9% à 15% et a été de 6% chez les mâles. Chez *A. coluzzii* ces fréquences chez les femelles ont varié entre 9% et 10% et entre 5% et 8% chez les mâles. *Anopheles gambiae* s.s. quant à lui a été minoritaire à Garoua et Pitoa avec des fréquences de 3% chez les femelles et 1% chez les mâles. Dans le district de santé de Mayo Oulo, *A. arabiensis* et *A. gambiae* s.s. étaient majoritaires tant chez les femelles que chez les mâles avec des fréquences variant entre 3% et 8% chez les femelles et entre 4% et 7% chez les mâles. *A. coluzzii* quant à lui était minoritaire avec des fréquences inférieures à 1% tant chez les femelles que chez les mâles.

III.1.1.2 Variations morphologiques et morphométriques

III.1.1.2.1 Variations morphologiques

Les variations morphologiques observées ont concerné principalement la distribution des taches pâles/caractères pigmentaires sur les nervures des ailes de moustiques. Un total de neuf caractères pigmentaires nommés PHP, HP et PSP au niveau de la Costa, SP, ASP, SCP et PIPD sur la nervure radiale R1 et BPFS et 1APFS sur la frange de l'aile ont été observés. Pour les segments des nervures alaires non encore décrits, une nouvelle terminologie des taches pâles a été dressée. En effet, nous avons décrit 16 nouveaux caractères pigmentaires nommés :

- R2MA et R2MP sur la nervure radiale R2 ;
- R3MA, R3MP et R3MPP sur la nervure radiale R3 ;
- M1MA, M1MP et M1MPP sur la nervure médiane M1 ;
- M2FAMA, M2FAMP et M2FPMA sur la nervure médiane M2 ;
- 1ABP, 1AMA, 1AMP et 1AMPP sur la nervure anale 1A ;
- B1APFS sur la frange de l'aile.

Une terminologie pour les caractères pigmentaires restants n'a pas été donnée du fait d'un manque d'hétérogénéité dans leurs distributions sur les autres nervures des spécimens étudiés (tableau X).

Tableau X : Terminologie des taches pâles sur les nervures et la frange de l'aile

Terminologie des nervures Harbach et Knight (1980)	Terminologie des taches pâles Harbach et Knight (1980)	Nouvelle terminologie des taches pâles	Description des taches pâles
Costa	PHP	PHP	tache pré-humérale pâle
	HP	HP	tache humérale pâle
	PSP	PSP	tache pré-sectorielle pâle
Subcosta	ND	ND	
Radius (proximale) R1 (distale)	ND	ND	
	SP	SP	tache sectorielle pâle
	ASP	ASP	tache accessoire sectorielle pâle
	SCP	SCP	tache sous costale pâle
Secteur radial (RS)	PIPD	PIPD	interruption pâle de la tache pré-apicale sombre
	ND	ND	
R2	ND	R2MA	absence médiane de tache pâle sur la R2
R3	ND	R2MP	présence médiane d'une tache pâle sur la R2
	ND	R3MA	absence médiane de tache pâle sur la R3
	ND	R3MP	présence médiane d'une tache pâle sur la R3
R4+5	ND	R3MPP	double présence médiane de tache pâle sur la R3
	ND	ND	
Mediane	ND	ND	
M1	ND	M1MA	absence médiane de tache pâle sur la M1
	ND	M1MP	présence médiane d'une tache pâle sur la M1
	ND	M1MPP	double présence médiane de tache pâle sur la M1
M2	ND	M2FAMA	absence continue de tache pâle sur la fourche M1+2 et absence médiane sur la M2
	ND	M2FAMP	absence continue de tache pâle sur la fourche M1+2 et présence médiane d'une tache pâle sur la M2
	ND	M2FPMA	présence continue d'une tache pâle sur la fourche M1+2 et absence médiane de tache pâle sur la M2
CuA	ND	ND	
M3+4	ND	ND	
CuA	ND	ND	
1A	ND	1ABP	présence basale d'une tache pâle sur la 1A
	ND	1AMA	absence médiane de tache pâle sur la 1A
	ND	1AMP	présence médiane d'une tache pâle sur la 1A
	ND	1AMPP	double présence médiane de tache pâle sur la 1A
Frange de l'aile	BPFS	BPFS	tache pâle basale de la frange alaire
	1APFS	1APFS	tache pâle de la frange alaire de la nervure 1A
	ND	B1APFS	tache pâle basale de la frange alaire avant la nervure 1A

ND : non déterminée.

- **Description des caractères pigmentaires au niveau de l'aile**

La disposition des taches pâles a été examinée sur les nervures des ailes des femelles et des mâles des trois espèces du complexe *A. gambiae* identifiées. Chez les femelles, les ailes de 75 spécimens d'*A. arabiensis*, 46 d'*A. coluzzii* et 21 d'*A. gambiae* s.s. ont été examinées. Chez les mâles, 43 spécimens d'*A. arabiensis*, 30 d'*A. coluzzii* et 14 d'*A. gambiae* s.s. ont été considérés.

La description des différentes formes obtenues est présentée dans les tableaux XI, page 65 et 66 et XII, page 67 et 68.

- **Nervure costale**

Au niveau de la nervure costale, pour chacune des trois espèces, les combinaisons des différents caractères de l'aile, notamment PHP, HP et PSP, ont permis de générer des variants pigmentaires nommés Var₁, Var₂ et Var₃ tant chez les femelles que chez les mâles (figure 20). Les fréquences de ces variants par espèce ont été également calculées. La variation pigmentaire du segment de la nervure costale de l'holotype (FT_C) a été observée chez les trois espèces tant chez les femelles que chez les mâles, avec des fréquences comprises entre 16% et 37%. De même le variant Var₂ a été retrouvé chez les trois espèces, aussi bien chez les femelles que chez les mâles. Chez les femelles, sa fréquence a été comprise entre 54% et 81% (tableau XI), alors que chez les mâles elle a été comprise entre 43% et 63% (tableau XII).

- **Nervure radiale R1**

Au niveau de la nervure radiale R1, pour chacune des trois espèces, les combinaisons des différents caractères de l'aile, notamment SP, ASP, SCP et PIPD, ont permis de générer six variants pigmentaires nommés Var₄, Var₅, Var₆, Var₇, Var₈ et Var₉. Les variants Var₄, Var₅, Var₆, Var₇ et Var₈ ont été observés tant chez les femelles que chez les mâles et le variant Var₉ uniquement chez les mâles (figure 21, page 71). Les fréquences de ces variants par espèce ont été également calculées. La variation pigmentaire du segment de la nervure radiale de l'holotype (FT_{R1}) n'a pas été observée chez les trois espèces et dans les deux sexes. Par contre, le variant Var₄ était prédominant aussi bien chez les femelles (71%) que chez les mâles (82%). Chez les femelles, sa fréquence a été comprise entre 67% et 81% (tableau XI), alors que chez les mâles elle a été comprise entre 79% et 93% (tableau XII).

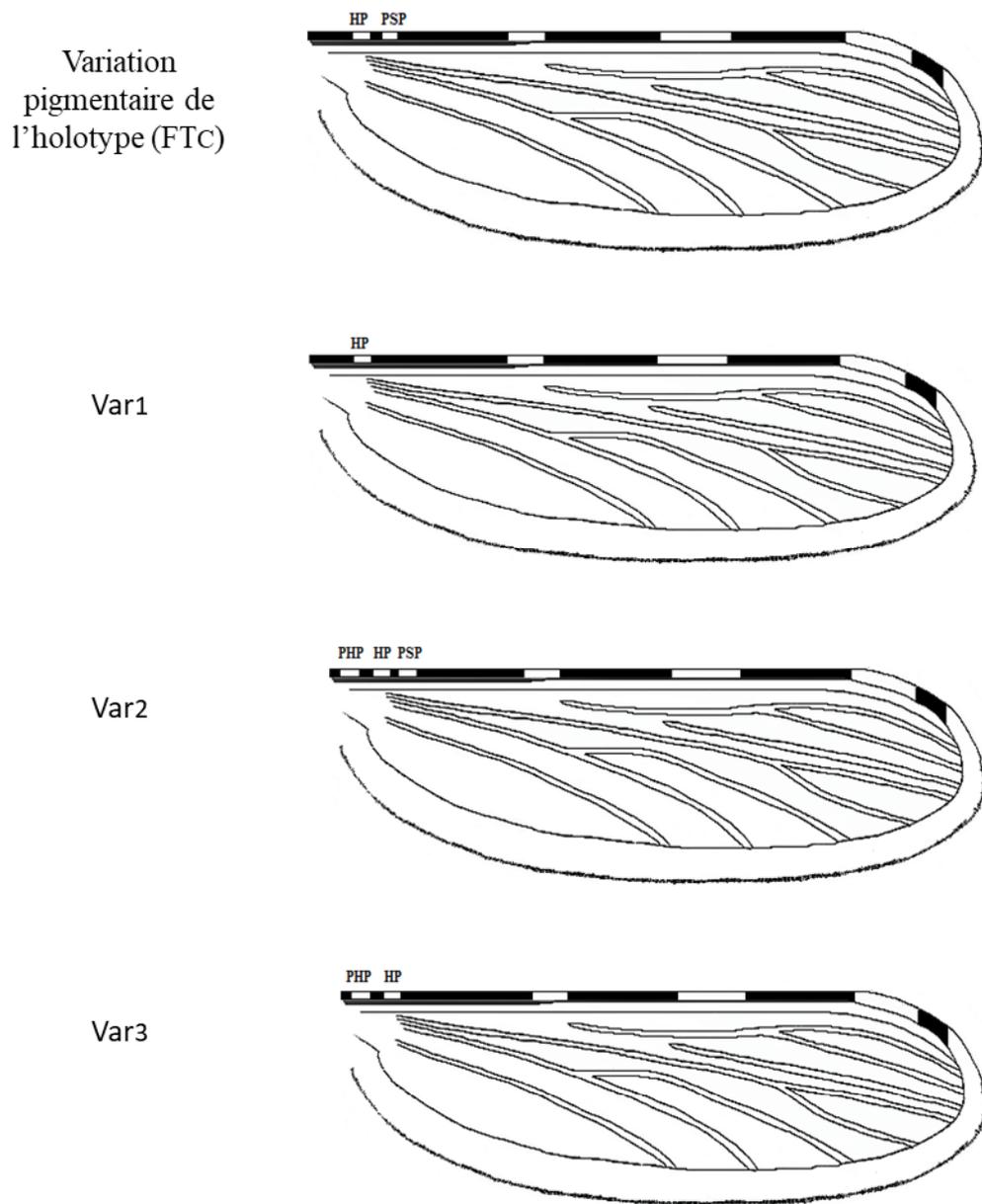


Figure 20 : Variations pigmentaires des segments de la nervure costale sur les ailes de moustiques examinés. PHP : tache pré-humérale pâle ; HP : tache humérale pâle ; PSP : tache pré-sectorielle pâle.

Tableau XI : Description et fréquences des caractères pigmentaires des segments de nervures des ailes chez les femelles d' *A. gambiae* s.l.

Nervures et Frange de l'aile	<i>A. arabiensis</i> (N=75)										<i>A. coluzzii</i> (N=46)										<i>A. gambiae</i> s.s. (N=21)										
	Présence/absence					Présence/absence					Présence/absence					Présence/absence					Présence/absence										
Costa	PHP	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+		
	HP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	PSP	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		
	Var	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃		
	%	17,3	1,3	81,3	0	37,0	4,3	54,3	4,3	37,0	4,3	54,3	4,3	37,0	4,3	54,3	4,3	24,0	0	76,0	0	24,0	0	76,0	0	24,0	0	76,0	0		
R1	SP	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	ASP	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	SCP	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	PIPD	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	SP+ASP	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	SCP+PIPD	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Var	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉
	%	70,6	16,0	1,3	9,3	2,6	0	67,4	19,6	0	10,8	2,2	0	67,4	19,6	0	10,8	2,2	0	80,9	4,7	0	14,3	0	0	80,9	4,7	0	14,3	0	0
R2 et R3	R2MA	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
	R2MP	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
	R3MA	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R3MP	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R3MPP	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	Var	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}
	%	50,7	5,3	37,3	0	1,3	5,3	32,6	19,6	21,7	6,5	4,3	15,2	32,6	19,6	21,7	6,5	4,3	15,2	38,1	9,5	47,6	0	0	4,7	38,1	9,5	47,6	0	0	4,7

Tableau XII : Description et fréquences des caractères pigmentaires des segments de nervures des ailes chez les mâles d'*A. gambiae* s.l.

Nervures et Frange de l'aile	<i>A. arabiensis</i> (N=43)										<i>A. coluzzii</i> (N=30)										<i>A. gambiae</i> s.s. (N=14)																		
	Présence/absence										Présence/absence										Présence/absence																		
Costa	PHP	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
	HP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PSP	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Var	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	FT _C	Var ₁	Var ₂	Var ₃	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}		
	%	16,3	0	62,8	20,9	0	10,0	46,7	13,3	0	0	30,0	10,0	46,7	13,3	0	10,0	42,8	21,4	0	0	35,7	0	42,8	21,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1	SP	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ASP	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SCP	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PIPD	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SP+ASP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SCP+PIPD	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Var	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₄	Var ₅	Var ₆	Var ₇	Var ₈	Var ₉	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}		
	%	79,1	13,9	2,3	0	4,6	0	80,0	10,0	0	6,7	0	3,3	0	10,0	0	6,7	0	3,3	92,9	7,1	0	0	0	0	92,9	7,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R2 et R3	R2MA	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2MP	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	R3MA	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R3MP	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R3MPP	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Var	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}	Var ₁₀	Var ₁₁	Var ₁₂	Var ₁₃	Var ₁₄	FT _{R23}		
	%	2,3	0	16,3	0	16,3	65,1	0	3,4	0	3,4	55,2	37,9	0	3,4	0	3,4	55,2	37,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tableau XII (suite) : Description et fréquences des caractères pigmentaires des segments de nervures des ailes chez les mâles d'*A. gambiae* s.l.

M1 et M2	M1MA	M1MP	M1MPP	M2FAMA	M2FAMP	M2FPMA	Var	Var ₁₅	Var ₁₆	Var ₁₇	Var ₁₈	FT _{M12}	Var ₁₉	Var ₂₀	Var ₂₀	Var ₁₅	Var ₁₆	Var ₁₇	Var ₁₈	FT _{M12}	Var ₁₉	Var ₂₀	Var ₂₀	Var ₁₅	Var ₁₆	Var ₁₇	Var ₁₈	FT _{M12}	Var ₁₉	Var ₂₀	Var ₂₀
%	0	11,6	2,3	0	13,9	25,6	46,5	0	33,3	3,3	0	16,7	3,3	43,3	0	0	21,4	0	0	14,3	28,6	35,7	0	0	21,4	0	0	14,3	28,6	35,7	
1A	IABP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1AMA	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1AMP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1AMPP	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Var	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	Var ₂₁	FT _{1A}	Var ₂₂	
%	2,3	88,4	9,3	0	90,0	10,0	0	90,0	10,0	0	78,6	21,4	0	78,6	21,4	0	78,6	21,4	0	78,6	21,4	0	78,6	21,4	0	78,6	21,4	0	78,6	21,4	
Frangé de l'aile	BPFS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1APFS	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BIAPFS	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Var	Var ₂₃	Var ₂₄	Var ₂₅	Var ₂₆	FT _{FA}	Var ₂₇	Var ₂₈	Var ₂₃	Var ₂₄	Var ₂₅	Var ₂₆	FT _{FA}	Var ₂₇	Var ₂₈	Var ₂₃	Var ₂₄	Var ₂₅	Var ₂₆	Var ₂₇	FT _{FA}	Var ₂₈	Var ₂₃	Var ₂₄	Var ₂₅	Var ₂₆	Var ₂₇	FT _{FA}	Var ₂₈	Var ₂₃	Var ₂₄	Var ₂₅
%	0	0	18,6	0	16,3	11,6	53,5	7,7	0	50,0	0	7,7	23,1	11,5	7,7	0	30,8	0	0	23,0	7,7	7,7	0	30,8	0	30,8	0	23,0	7,7	30,8	

(+) : présence de la tache pâle ; (-) : absence de tache pâle ; FT : variation du segment de la nervure observé chez l'holotype ; Var : variant.

- Nervures radiales R2 et R3

Au niveau de l'association des nervures radiales R2 et R3, pour chacune des trois espèces, les combinaisons des différents caractères de l'aile, notamment R2MA, R2MP, R3MA, R3MP et R3MPP, ont permis de générer des variants pigmentaires nommés Var₁₀, Var₁₁, Var₁₂, Var₁₃ et Var₁₄ tant chez les femelles que chez les mâles (figure 22). Les fréquences de ces variants par espèce ont été également calculées. La variation pigmentaire des segments des nervures R2 et R3 de l'holotype (FT_{R23}) a été observée chez les trois espèces tant chez les femelles que chez les mâles avec des fréquences allant de 5% à 71%. Chez les femelles, le variant Var₁₀ était prédominant chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii* avec des fréquences comprises entre 33% et 51% ; chez *A. gambiae* s.s. le variant Var₁₂ (48%) a été majoritaire (tableau XI, page 65 et 66). Chez les mâles, le variant Var₁₄ était prédominant chez les trois espèces avec des fréquences comprises entre 16% et 55% (tableau XII, page 67 et 68).

- Nervures médianes M1 et M2

Au niveau de l'association des nervures médianes M1 et M2, pour chacune des trois espèces, les combinaisons des différents caractères de l'aile, notamment M1MA, M1MP, M1MPP, M2FAMA, M2FAMP et M2FPMA, ont permis de générer six variants pigmentaires nommés Var₁₅, Var₁₆, Var₁₇, Var₁₈, Var₁₉ et Var₂₀. Les variants Var₁₆, Var₁₇, Var₁₉ et Var₂₀ ont été observés tant chez les femelles que chez les mâles, alors que les variants Var₁₅ et Var₁₈ ont été observés uniquement chez les femelles (figure 23). Les fréquences de ces variants par espèce ont été également calculées. Chez les femelles, La variation pigmentaire des segments des nervures M1 et M2 de l'holotype (FT_{M12}) n'a été observée que chez *A. gambiae* s.s. (5%) ; alors que chez les mâles, elle a été observée chez les trois espèces, avec des fréquences allant de 14% à 17%. Chez les trois espèces, le variant Var₂₀ était prédominant aussi bien chez les femelles (79%) que chez les mâles (44%). Chez les femelles, sa fréquence a été comprise entre 62% et 83% (tableau XI, page 65 et 66), alors que chez les mâles elle a été comprise entre 36% et 46% (tableau XII, page 67 et 68).

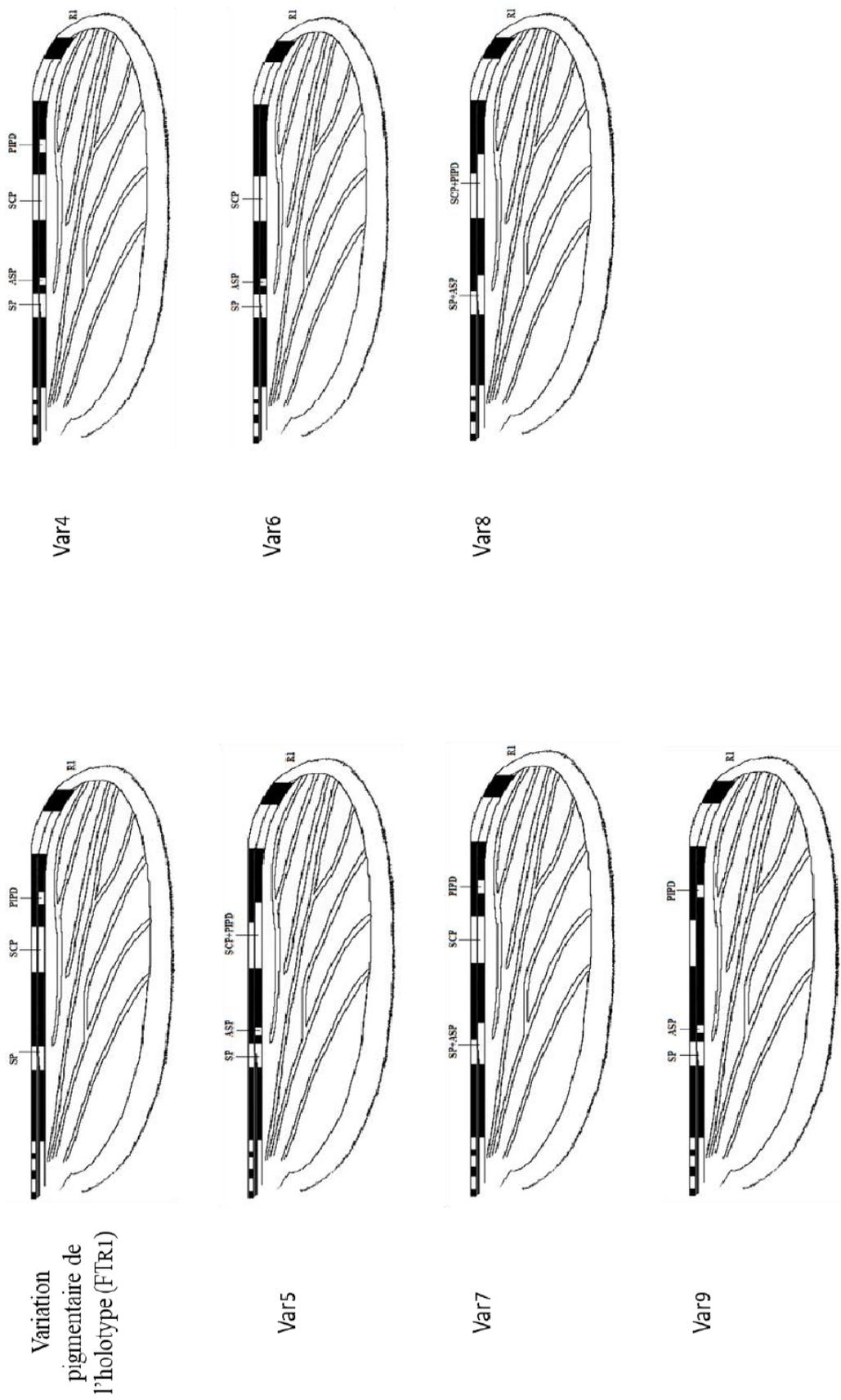
- Nervure anale 1A

Au niveau de la nervure anale 1A, pour chacune des trois espèces, les combinaisons des différents caractères pigmentaires de l'aile, notamment 1ABP, 1AMA, 1AMP et 1AMPP ont permis de générer deux variants nommés Var₂₁ et Var₂₂ tant chez les femelles que chez les mâles (figure 24). Cependant dans les deux sexes, le variant Var₂₁ a été absent chez *A. coluzzii*

et *A. gambiae* s.s. Les fréquences de ces variants par espèce ont été également calculées. La variation pigmentaire du segment de la nervure 1A de l'holotype (FT_{1A}) a été observée chez les trois espèces tant chez les femelles que chez les mâles avec des fréquences allant de 58 à 90%. Chez les femelles, le variant Var₂₂ était prédominant chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. avec des fréquences comprises entre 38% et 41% ; alors que, chez *A. arabiensis* le variant Var₂₁ (40%) a été majoritaire (tableau XI, page 65 et 66). Chez les mâles, le variant Var₂₂ était prédominant chez les trois espèces avec des fréquences comprises entre 9% et 21% (tableau XII, page 67 et 68).

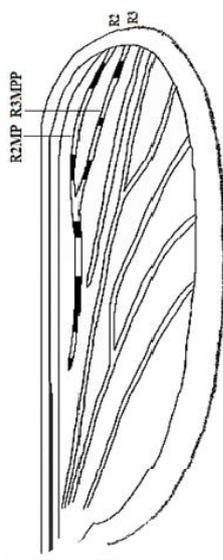
- Frange alaire

Au niveau de la frange de l'aile, pour chacune des trois espèces, les combinaisons des différents caractères (BPFS, 1APFS et B1APFS) ont permis de générer six variants pigmentaires nommés Var₂₃, Var₂₄, Var₂₅, Var₂₆, Var₂₇ et Var₂₈. Les variants Var₂₃, Var₂₅, Var₂₇ et Var₂₈ ont été observés tant chez les femelles que chez les mâles, tandis que les variants Var₂₄ et Var₂₆ ont été observés uniquement chez les femelles (figure 25). Les fréquences de ces variants par espèce ont été également calculées. La variation pigmentaire du segment de la frange alaire de l'holotype (FT_{FA}) a été observée chez les trois espèces et dans les deux sexes avec des fréquences allant de 4 à 23%. Chez les femelles, le variant Var₂₃ était prédominant chez *A. arabiensis* (37%), alors que Var₂₈ était majoritaire chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. avec des fréquences comprises entre 30% et 45% (tableau XI, page 65 et 66). Chez les mâles, le variant Var₂₈ était prédominant chez *A. arabiensis* (53%), Var₂₅ chez *A. coluzzii* (50%) et les deux (Var₂₅ et Var₂₈) étaient retrouvés dans les mêmes proportions (31%) chez *A. gambiae* s.s. (tableau XII, page 67 et 68).

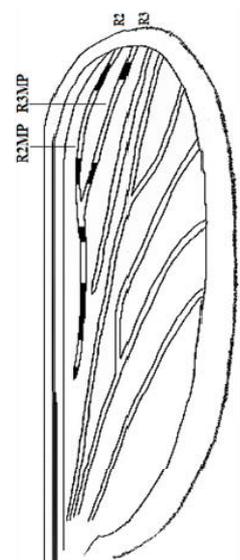


Variation pigmentaire de l'holotype (FTR1)

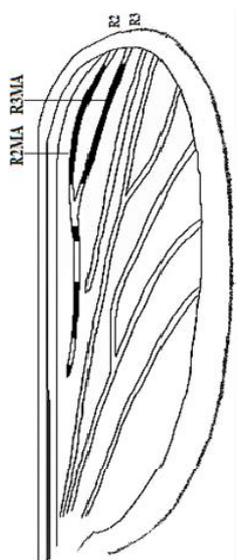
Figure 21 : Variations pigmentaires des segments de la nervure radiale R1 sur les ailes de moustiques examinés. SP : tache sectorielle pâle ; ASP : tache accessoire sectorielle pâle ; SCP : tache sous costale pâle ; PFPD : interruption pâle de la tache pré-apicale sombre.



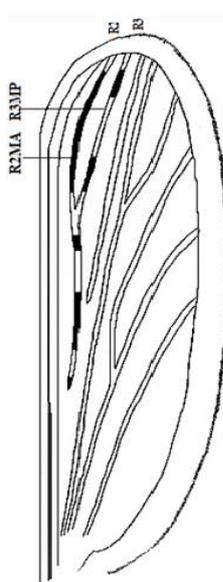
Var10



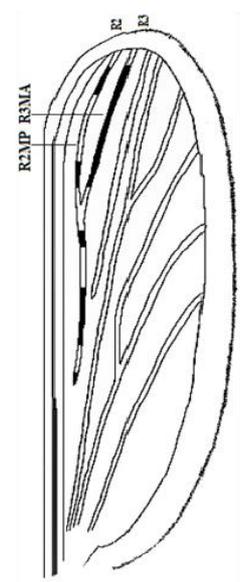
Var12



Var14



Var11



Var13

Variation pigmentaire de l'holotype (FTR23)

Figure 22 : Variations pigmentaires des segments des nervures radiales R2 et R3 sur les ailes de moustiques examinés. R2MA : absence médiane de tache pâle sur la R2 ; R2MP : présence médiane de tache pâle sur la R2 ; R3MA : absence médiane de tache pâle sur la R3 ; R3MP : présence médiane de tache pâle sur la R3 ; R3MPP : double présence médiane de tache pâle sur la R3.

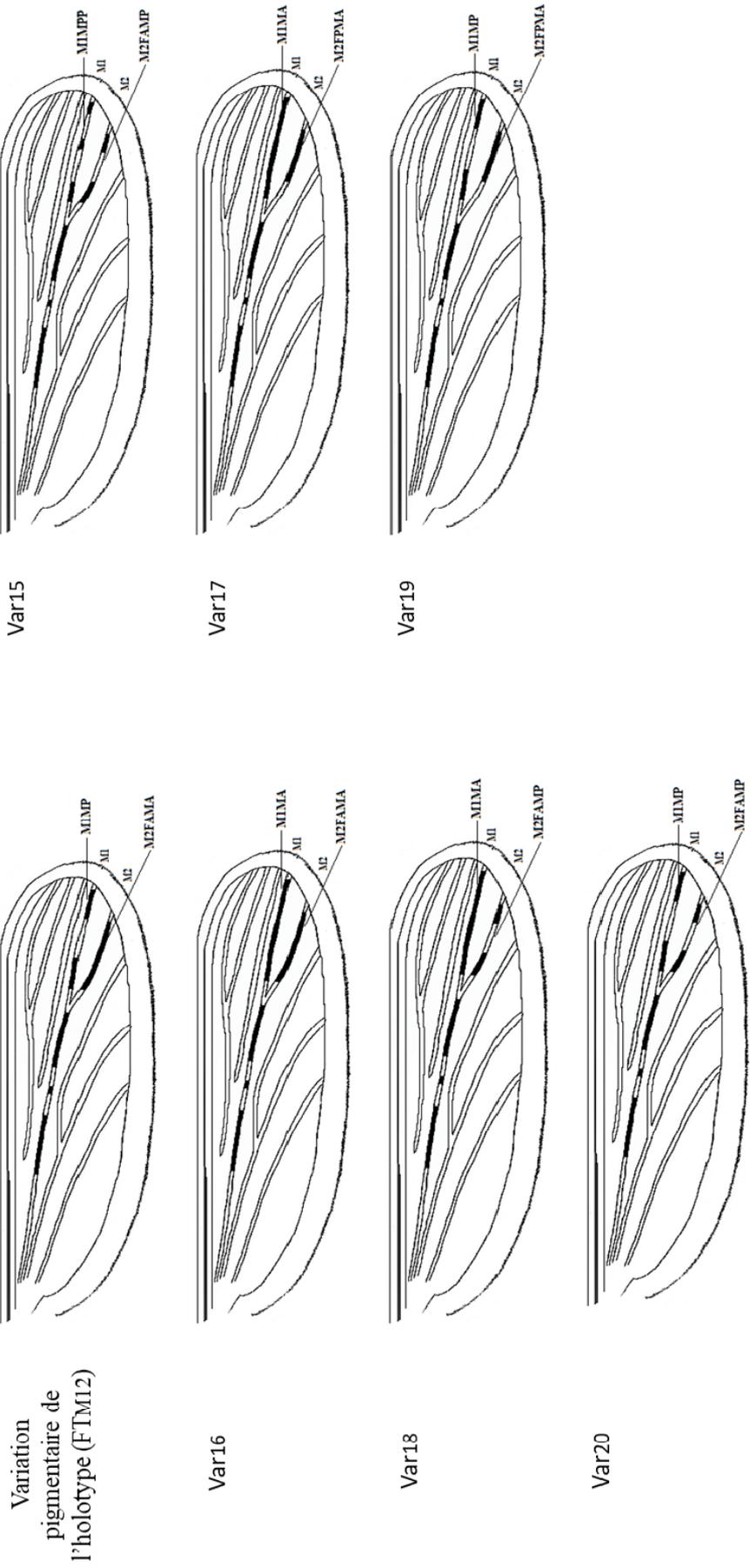
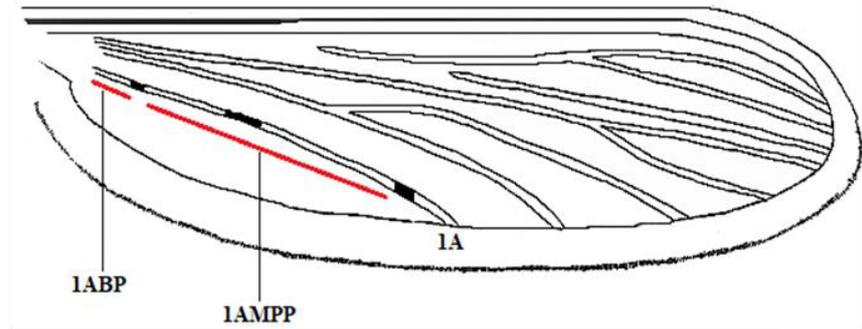
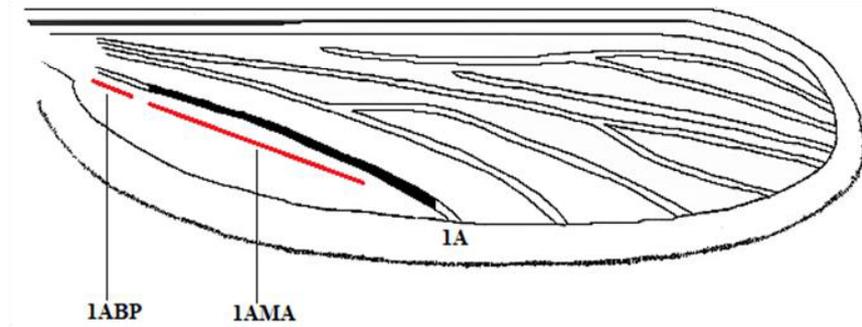


Figure 23 : Variations pigmentaires des segments des nervures médianes M1 et M2 sur les ailes de moustiques examinés. M1MA : absence médiane de tache pâle sur la M1 ; M1MPP : présence médiane de tache pâle sur la M1 ; M2FAMA : double présence médiane de tache pâle sur la M2 ; M2FAMP : absence médiane sur la M2 ; M2FPMA : absence continue d'une tache pâle sur la fourche M1+2 et absence médiane de tache pâle sur la M2.

Variation pigmentaire de l'holotype (FT1A)



Var21



Var22

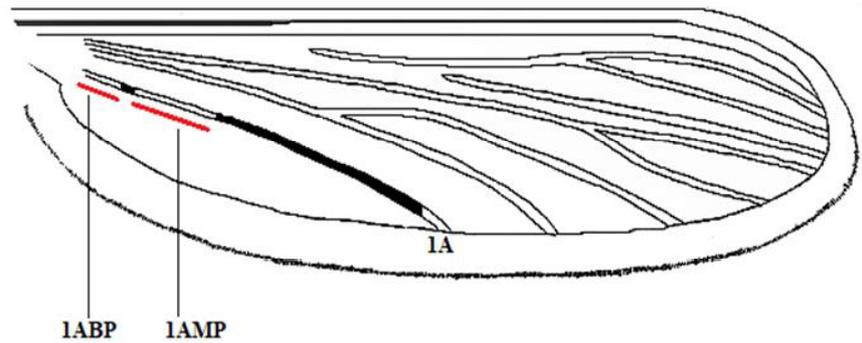
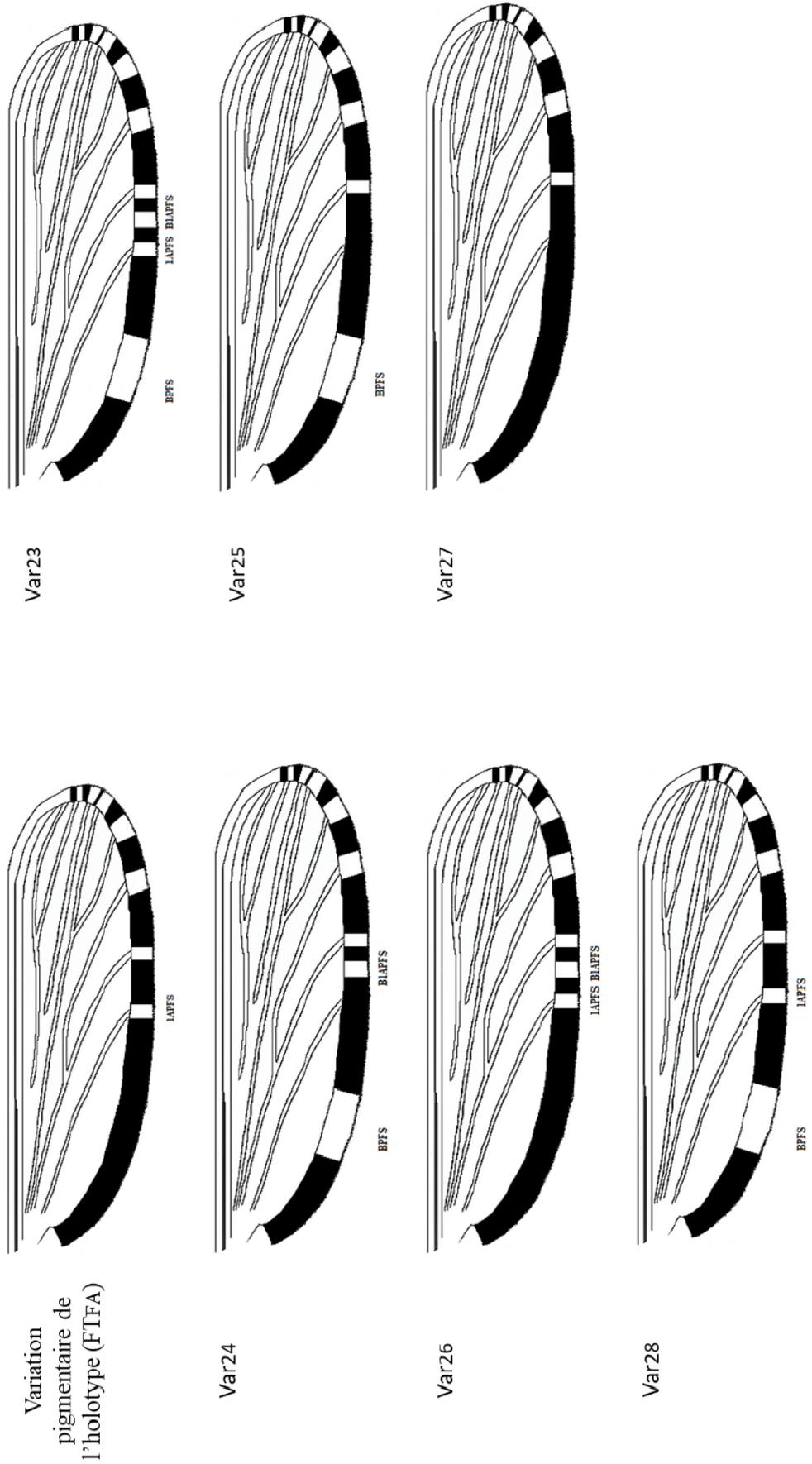


Figure 24 : Variations pigmentaires des segments de la vervure anale 1A sur les ailes de moustiques examinés. 1ABP : présence basale d'une tache pâle sur la 1A ; 1AMA : absence médiane d'une tache pâle sur la 1A ; 1AMP : présence médiane d'une tache pâle sur la 1A ; 1AMPP : double présence médiane de taches pâles sur la 1A.



Variation pigmentaire de l'holotype (FTFA)

Figure 25 : Variations pigmentaires des segments de la frange alaire sur les ailes de moustiques examinés. BPFS : tache pâle basale de la frange alaire ; IAPFS : tache pâle de la frange alaire de la nervure 1A ; BIAPFS : tache pâle de la frange alaire avant la nervure 1A.

○ Polymorphisme de l'aile

Dans le but de séparer nos populations d'espèces en groupes distincts, 13 caractères pigmentaires observés tant chez les femelles que chez les mâles ont été choisis sur la base des critères les plus utilisés pour l'identification des espèces du sous-genre *Anopheles* (*Cellia*) afin d'évaluer le polymorphisme des ailes examinées. Parmi ces caractères pigmentaires, deux ont été sélectionnés au niveau de la costa (PHP et PSP), trois au niveau de la nervure radiale R1 (SP+ASP, SP et ASP), deux au niveau de la nervure radiale R2 (R2MA et R2MP), trois au niveau de la nervure R3 (R3MA, R3MP et R3MPP), et trois au niveau de la nervure médiane M2 (M2FAMA, M2FAMP et M2FPMA).

Chez les femelles étudiées, les 13 caractères pigmentaires ont été présents chez les trois espèces identifiées ; ils ont permis de distinguer au total 31 morphotypes : Mor₁ à Mor₃₁ (Tableau XIII). Parmi ces trois espèces, *A. coluzzii* a réuni le plus de morphotypes (n=24), suivi d'*A. arabiensis* (n=18) et d'*A. gambiae* s.s. (n=9). Parmi ces morphotypes, Mor₁, Mor₂ et Mor₃ n'ont été retrouvés que chez *A. arabiensis*, Mor₁₄ à Mor₂₂ chez *A. coluzzii* et Mor₂₃ à Mor₂₆ chez *A. gambiae* s.s. Dix (10) morphotypes (Mor₄ à Mor₁₃) ont été retrouvés chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii* et cinq autres morphotypes (Mor₂₇ à Mor₃₁) chez les trois espèces. Cependant, aucun morphotype n'a été commun seulement à *A. arabiensis* et *A. gambiae* s.s. ni à *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s.. De manière globale, le morphotype Mor₃₀ a été majoritaire chez les trois espèces, avec des fréquences comprises entre 15% et 37%. Le morphotype Mor₂₉ a occupé le deuxième rang chez *A. arabiensis* (19%) et *A. gambiae* s.s. (24%) ; chez *A. coluzzii*, ce sont les morphotypes Mor₅, Mor₆ et Mor₁₀ qui ont été observés au deuxième rang avec des proportions similaires (9%).

Chez les mâles d'*A. gambiae* s.l., contrairement aux femelles, les treize caractères pigmentaires (PHP, PSP, SP+ASP, SP, ASP, R2MA, R2MP, R3MA, R3MP, R3MPP, M2FAMA, M2FAMP et M2FPMA) n'ont été présents que chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii*. La combinaison des différents caractères a permis de distinguer 28 morphotypes : Mor₃₂ à Mor₅₂, Mor₂₉, Mor₃₀, Mor₂₃, Mor₅, Mor₁₅ Mor₁₄ et Mor₄ (Tableau XIII). Parmi ces morphotypes, Mor₃₂ à Mor₃₇, Mor₂₉, Mor₃₀ et Mor₂₃ n'ont été observés que chez *A. arabiensis*, Mor₄₃ à Mor₅₀ chez *A. coluzzii* et Mor₅₂ chez *A. gambiae* s.s.. Les morphotypes Mor₅, Mor₃₈ et Mor₁₄ ont été observés chez *A. arabiensis* et *A. coluzzii*, Mor₃₉, Mor₄₀ et Mor₄ chez *A. arabiensis* et *A. gambiae* s.s., et les deux autres (Mor₅₁ et Mor₁₅) chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s.. Les morphotypes Mor₄₁ et Mor₄₂ ont été quant à eux observés chez les trois espèces. Le morphotype Mor₄₁ (16%) a été majoritaire chez *A. arabiensis* tout comme le morphotype Mor₄ (29%) chez

A. gambiae s.s. et le morphotype Mor₄₃ (21%) chez *A. coluzzii*. Les fréquences des autres morphotypes ont varié entre 1% et 21%. Entre les trois espèces, *A. arabiensis* a présenté plus de morphotypes (n=17), suivi d'*A. coluzzii* (n=15) et *A. gambiae* s.s. (n=8).

○ **Distribution des morphotypes d'*Anopheles gambiae* s.l. dans les Districts de Santé**

La distribution des morphotypes dans les trois districts de santé a été présentée en fonction du sexe des spécimens et des espèces identifiées.

Chez les femelles, le nombre de morphotypes a varié entre sept (7) à Garoua et 13 à Pitoa chez *A. arabiensis*, entre un (1) à Mayo Oulo et 16 à Pitoa chez *A. coluzzii* et entre quatre (4) à Garoua-Mayo Oulo et cinq (5) à Pitoa chez *A. gambiae* s.s. (tableau XIV, page 82). Pour les trois espèces, le district de santé de Pitoa a présenté le plus de morphotypes.

Chez *A. arabiensis*, les morphotypes Mor₆, Mor₂₈, Mor₂₉ et Mor₃₀ ont été retrouvés dans les trois districts de santé, tandis que Mor₅ et Mor₁₂ n'ont été retrouvés qu'à Pitoa et Mayo Oulo. Toujours pour *A. arabiensis*, les morphotypes Mor₁, Mor₃ et Mor₄ n'ont été observés qu'à Garoua, Mor₈ et Mor₃₁ qu'à Mayo Oulo et Mor₂, Mor₇, Mor₉, Mor₁₀, Mor₁₁, Mor₁₃ et Mor₂₇ qu'à Pitoa. Chez *A. coluzzii*, seul le morphotype Mor₆ a été commun aux spécimens des trois districts de santé, tandis que Mor₂₁, Mor₁₀, Mor₂₃ et Mor₃₀ n'ont été identifiés qu'à Garoua et Pitoa. La distribution des morphotypes Mor₁₄, Mor₁₅, Mor₁₇, Mor₁₈, Mor₂₂, Mor₁₂, Mor₄ et Mor₂₇ a été restreinte à Garoua, celle de Mor₁₆, Mor₁₉, Mor₂₀, Mor₅, Mor₇, Mor₈, Mor₉, Mor₁₁, Mor₁₃, Mor₂₉ et Mor₃₁ à Pitoa. Chez *A. gambiae* s.s., seul le morphotype Mor₂₉ a été à la fois répandu dans les trois DS et Mor₂₈ et Mor₃₀ à la fois à Garoua et Mayo Oulo. Le morphotype Mor₃₁ n'est apparu qu'à Garoua, Mor₂₃, Mor₂₄, Mor₂₅ et Mor₂₆ qu'à Pitoa, Mor₂₇ qu'à Mayo Oulo.

Chez les mâles, le nombre de morphotypes a varié entre six (6) à Garoua et 10 à Pitoa pour *A. arabiensis*, un (1) à Mayo Oulo et 11 à Garoua pour *A. coluzzii* et entre deux (2) Pitoa et quatre (4) à Mayo Oulo pour *A. gambiae* s.s. (tableau XV, page 84).

Tableau XIII : Description des morphotypes alaires chez les espèces femelles et mâles d'*A. gambiae* s.l.

Taxon	Caractères pigmentaires														Morphotypes		%
	PHP	PSP	SP+ASP	SP	ASP	R2MA	R2MP	R3MA	R3MP	R3MPP	M2FAMA	M2FAMP	M2FPMA	Femelle	Mâle		
<i>A. arabiensis</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	Mor1	1,3	ND	
	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	Mor2	1,3	ND	
	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	Mor3	1,3	ND	
	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	Mor4	1,3	7	
	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	Mor5	2,7	11,6	
	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	Mor6	8	ND	
	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	Mor7	2,7	ND	
	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	Mor8	1,3	ND	
	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Mor9	1,3	ND	
	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Mor10	2,7	ND	
	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	Mor11	1,3	ND	
	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	Mor12	2,7	ND	
	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Mor13	1,3	ND	
	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	Mor27	5,3	ND	
	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	Mor28	5,3	ND	
	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	Mor29	18,7	11,6	
	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Mor30	37,3	2,3	
	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Mor31	4	ND	
	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	Mor32	ND	2,3	
	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	Mor33	ND	7	
	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	Mor34	ND	2,3	
	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	Mor35	ND	2,3	
	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	Mor36	ND	2,3	
	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	Mor37	ND	2,3	
	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	Mor23	ND	4,7	
	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	Mor38	ND	4,7	

Tableau XIII (suite) : Description des morphotypes alaires chez les espèces femelles et mâles d'*A. gambiae* s.l.

-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Mor14	ND	2,3
+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor39	ND	4,7
+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor40	ND	4,7
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor41	ND	16,3
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor42	ND	11,6
<hr/>															
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor14	2,2	6,9
+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor15	2,2	6,9
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor16	2,2	ND
-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor17	4,3	ND
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor18	4,3	ND
+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor19	2,2	ND
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor20	2,2	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor21	4,3	ND
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor22	2,2	ND
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor4	4,3	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor5	8,7	10,3
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor6	8,6	ND
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor7	2,2	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor8	2,2	ND
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor9	2,2	ND
-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor10	8,7	ND
-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor11	2,2	ND
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor12	2,2	ND
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor13	2,2	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor27	2,2	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor28	6,5	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor29	4,3	ND
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Mor30	15,2	ND
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Mor31	2,2	ND

Tableau XIII (suite) : Description des morphotypes alaires chez les espèces femelles et mâles d'*A. gambiae* s.l.

-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Mor43	ND	20,7
+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Mor44	ND	3,4
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Mor45	ND	3,4
-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor46	ND	3,4
-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Mor47	ND	3,4
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Mor48	ND	3,4
-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor49	ND	3,4
+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor50	ND	3,4
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Mor38	ND	6,9
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Mor51	ND	10,3
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Mor41	ND	3,4
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor42	ND	10,3
-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	Mor23	4,8	ND
-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Mor24	4,8	ND
-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Mor25	4,8	ND
-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor26	9,5	ND
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Mor27	9,5	ND
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Mor28	9,5	ND
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor29	23,7	ND
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor30	28,6	ND
+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor31	4,8	ND
-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Mor52	ND	7,1
+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Mor39	ND	7,1
+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor40	ND	7,1
-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor4	ND	28,6
+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Mor51	ND	7,1
+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mor15	ND	7,1

Tableau XIV: Distribution des proportions des morphotypes alaires dans les populations femelles d'*A. gambiae* s.l. en fonction des districts de santé

		Morphotypes																															
Esp	Sites	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	T
<i>A. ara</i>	Gar	1	0	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	11	0	21
	Pit	0	1	0	0	1	2	2	0	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	9	8	0	35
	May	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	9	3	19
	T	1	1	1	1	2	6	2	1	1	2	1	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	14	28	3	75
<i>A. col</i>	Gar	0	0	0	2	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	2	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	5	0	21	
	Pit	0	0	0	0	4	2	1	1	2	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	2	0	0	0	2	2	1	24	
	May	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	T	0	0	0	2	4	4	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	3	0	0	1	0	2	7	1	46
<i>A. gb</i>	Gar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	1	7
	Pit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0	1	0	0	6
	May	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	4	0	8
	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	5	6	1	21

Esp : espèces ; *A. ara* : *A. arabiensis* ; *A. col* : *A. coluzzii* ; *A. gb* : *A. gambiae* s.s. ; T : Total ; Gar : Garoua ; Pit : Pitoa ; May : Mayo Oulo.

Chez *A. arabiensis*, les morphotypes Mor₂₉, Mor₅ et Mor₄₂ ont été retrouvés dans les trois districts de santé ; Mor₄ n'a été observé que chez les spécimens de Pitoa et Mayo Oulo, Mor₄₁ chez les spécimens de Garoua et Mayo Oulo. Les morphotypes Mor₂₃ et Mor₃₃ n'ont été mis en évidence qu'à Garoua, Mor₃₆, Mor₃₇, Mor₃₀, Mor₁₄, Mor₃₉ et Mor₄₀ qu'à Pitoa et Mor₃₂, Mor₃₄, Mor₃₅ et Mor₃₈ qu'à Mayo Oulo. Chez *A. coluzzii*, seul le morphotype Mor₄₂ a été représenté à la fois dans les trois districts de santé, tandis que Mor₄₃, Mor₅ et Mor₃₈ n'ont été retrouvés qu'à Garoua et Pitoa. Les morphotypes Mor₄₅, Mor₄₆, Mor₄₇, Mor₄₈, Mor₄₉, Mor₁₄ et Mor₅₁ n'ont été observés qu'à Garoua, Mor₄₄, Mor₅₀, Mor₁₅ et Mor₄₁ qu'à Pitoa. Chez *A. gambiae* s.s., aucun morphotype n'a été commun aux trois districts de santé ; cependant Mor₄ a été retrouvé à Garoua et Mayo Oulo. Les morphotypes Mor₁₅ et Mor₄₀ n'ont été observés qu'à Garoua, Mor₅₁ et Mor₃₉ qu'à Pitoa, Mor₄₁, Mor₄₂ et Mor₅₂ qu'à Mayo Oulo.

- **Description des caractères pigmentaires/ornementaux des pattes et des palpes maxillaires d'*A. gambiae* s.l.**

Pour ce volet du travail, notre attention a porté uniquement sur la présence des bandes pâles sur les palpes et aux ornements des taches pâles des pattes des moustiques (figure 8, page 38). De manière globale, aucune différence sur ces deux paramètres n'a été observée dans les populations mâles et femelles de moustiques. En effet, tous les spécimens étudiés ont présenté trois bandes pâles au niveau des palpes et de nombreuses taches pâles sur les pattes.

Tableau XV: Distribution des proportions des morphotypes alaires dans les populations mâles d'*A. gambiae* s.l. en fonction des districts de santé

Esp	Sites	Morphotypes																										T			
		32	33	34	35	36	37	29	30	23	5	38	14	39	40	4	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51		15	52	
<i>A. ara</i>	Gar	0	3	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	
	Pit	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	2	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	
	May	1	0	1	1	0	0	3	0	0	2	2	0	0	2	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	
	T	1	3	1	1	1	1	5	1	2	5	2	1	2	2	3	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43	
<i>A. col</i>	Gar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	4	0	1	1	1	1	1	1	1	0	3	0	17	
	Pit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	11	
	May	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	0	0	1	3	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	29	
<i>A. gb</i>	Gar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	
	Pit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	
	May	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9
	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	14

Esp : espèces ; *A. ara* : *A. arabiensis* ; *A. col* : *A. coluzzii* ; *A. gb* : *A. gambiae* s.s. ; T : Total ; Gar : Garoua ; Pit : Pitoa ; May : Mayo Oulo.

III.1.1.2.2 Analyses morphométriques chez *A. gambiae* s.l.

Pour les études morphométriques, nous avons analysé la taille des ailes, des pattes et des palpes. La longueur, la largeur et les segments de droite des points d'intersections des trois nervures (Mcu-M2-R2) évaluant la forme des ailes des spécimens des trois espèces identifiées du complexe *A. gambiae* ont été mesurés ; les mesures de la longueur des segments des pattes ont été également effectuées. Pour les palpes maxillaires, les longueurs des segments des palpes ont été considérées afin de calculer l'indice palpal.

- **Description des caractères morphométriques au niveau de l'aile**

Les différentes mesures sur l'aile ont été effectuées sur 229 spécimens, soit 142 femelles et 87 mâles ; le tableau XVI en présente les longueurs et les largeurs moyennes des ailes et les longueurs moyennes des trois côtés des triangles formés par les points d'intersection des trois nervures : R2 - M2 - Mcu.

- **Longueur et largeur de l'aile**

Chez les trois espèces, que ce soit chez les mâles ou les femelles, la longueur et la largeur des ailes n'ont pas été significativement différentes ($p > 0,05$), avec des valeurs (en mm) variant entre 2,8 et 3,1 pour la longueur et entre 0,6 et 0,9 pour la largeur. Entre les mâles et les femelles, la largeur obtenue a été quasi-similaires ($t = 0,90$; $p > 0,05$) ; cependant, une différence significative ($t = 4,58$; $p < 0,05$) a été observée concernant la longueur des ailes. Les écarts-type des moyennes des longueurs et des largeurs ont été faibles et ont varié entre 0,0 et 0,2.

- **Longueurs MCuM2, MCuR2 et R2M2 (forme de l'aile).**

De manière globale, chez les trois espèces, les dimensions des segments de droite (mm) contribuant à l'évaluation de la forme de l'aile n'ont pas été significativement différentes tant chez les femelles que chez les mâles ($p > 0,05$) et entre les deux sexes ($t = 0,84$; $p = 0,42$, $t = -0,20$; $p > 0,05$, $t = -0,56$; $p > 0,05$) ; celles séparant Mcu et M2 (Cu-M2) étaient de 0,9 mm, MCu et R2 (Cu-R2) se situaient entre 0,9 mm et 1,0 mm et R2 et M2 (R2-M2) entre 0,2 mm et 0,5 mm.

Tableau XVI : Mensurations en millimètres des ailes d'*A. gambiae* s.l.

Sexe	Parties du corps	caractères	Espèces	Districts de Santé										Moyenne générale	Ecart-type	F test	Valeur de p		
				Garoua					Pitoea									Mayo Oulo	
				N	Moyenne 1	N	Moyenne 2	N	Moyenne 3	N	Moyenne 2	N	Moyenne 3					Moyenne 2	Moyenne 3
Femelles	Aile	Longueur	<i>A. ara</i>	21	3,2	35	3,1	19	2,8	3,0	0,2	0,8	0,5						
			<i>A. col</i>	21	3,1	24	3,1	1	3,1	3,1	0,1								
			<i>A. gb</i>	7	3,1	6	3,0	8	2,8	3,0	0,1								
		Largeur	<i>A. ara</i>	21	0,9	35	0,8	19	0,8	0,8	0,0	2,9	0,1						
		<i>A. col</i>	21	0,8	24	0,8	1	0,9	0,9	0,0									
		<i>A. gb</i>	7	0,8	6	0,8	8	0,8	0,8	0,0									
		Longueur Mcu-M2	<i>A. ara</i>	21	0,9	35	0,9	19	0,9	0,9	0,0	2,6	0,1						
		<i>A. col</i>	21	0,9	24	0,9	1	0,9	0,9	0,0									
		<i>A. gb</i>	7	0,9	6	0,8	8	0,8	0,8	0,0									
		Longueur Mcu-R2	<i>A. ara</i>	21	1,0	35	1,0	19	0,9	1,0	0,0	0,9	0,4						
		<i>A. col</i>	21	1,0	24	1,0	1	0,9	1,0	0,0									
		<i>A. gb</i>	7	1,0	6	0,9	8	0,9	0,9	0,0									
		Longueur M2-R2	<i>A. ara</i>	21	0,2	35	0,2	19	0,2	0,2	0,0	ND	ND						
		<i>A. col</i>	21	0,2	24	0,2	1	0,2	0,2	0,0									
		<i>A. gb</i>	7	0,2	6	0,2	8	0,2	0,2	0,0									
Mâles	Longueur	<i>A. ara</i>	13	3,1	13	2,9	17	2,8	2,9	0,1	1,1	0,4							
		<i>A. col</i>	18	2,9	11	2,9	1	2,8	2,9	0,0									
		<i>A. gb</i>	3	2,9	2	2,8	9	2,8	2,8	0,1									
	Largeur	<i>A. ara</i>	13	0,7	13	0,7	17	0,7	0,7	0,7	0,0	2,2	0,2						
		<i>A. col</i>	18	0,7	11	0,7	1	0,7	0,7	0,0									
		<i>A. gb</i>	3	0,7	2	0,6	9	0,7	0,7	0,0									
	Longueur Mcu-M2	<i>A. ara</i>	13	0,9	13	0,9	17	0,8	0,9	0,9	0,0	0,1	0,9						
		<i>A. col</i>	18	0,9	11	0,9	1	0,8	0,9	0,0									
		<i>A. gb</i>	3	0,9	2	0,9	9	0,8	0,9	0,0									
	Longueur Mcu-R2	<i>A. ara</i>	13	1,0	13	1,0	17	0,9	1,0	0,9	0,0	0,8	0,5						
		<i>A. col</i>	18	1,0	11	0,9	1	0,9	1,0	0,0									
		<i>A. gb</i>	3	1,0	2	0,9	9	0,9	0,9	0,0									
	Longueur M2-R2	<i>A. ara</i>	13	0,2	13	0,2	17	0,2	0,2	0,2	0,0	0,9	0,5						
		<i>A. col</i>	18	0,2	11	0,2	1	0,2	0,2	0,0									
		<i>A. gb</i>	3	1,0	2	0,2	9	0,2	0,2	0,4									

N : taille des échantillons collectés respectivement à Garoua, Pitoea et Mayo Oulo ; *A. ara* : *A. arabiensis* ; *A. col* : *A. coluzzii* ; *A. gb* : *A. gambiae* s.s. ; ND : non déterminé.

- **Description des caractères morphométriques des palpes maxillaires et des pattes**

Les différentes mesures ont été effectuées sur 229 spécimens, soit 142 femelles et 87 mâles. Au niveau des palpes maxillaires, les longueurs des segments III, IV et V permettant de calculer l'indice palpal (Coluzzi, 1964 – longueur des segments IV+V/III) ont été considérées. Concernant les pattes, les mesures de longueur ont été effectuées sur la patte métathoracique, parce que, de manière générale chez les anophèles du sous-genre *Anopheles (Cellia)*, elle présente de nombreuses variations. Le tableau XVII rend les valeurs de l'indice palpal, les longueurs moyennes du fémur, du tibia et des tarse de la patte métathoracique.

- **Palpes maxillaires**

Chez les trois espèces, que ce soit chez les mâles ou les femelles, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée pour concernant les valeurs du rapport des palpes. Ces valeurs ont varié entre 0,7 et 0,8 chez les femelles et ont été égales à 0,7 chez les mâles. Une différence significative des valeurs de l'indice palpal a été observée entre les femelles et les mâles ($t = 8,69$; $p < 0,05$). Les écarts-type des moyennes ont été très faibles et égale à zéro.

- **Patte métathoracique**

Chez les trois espèces, que ce soit chez les mâles ou les femelles, aucune différence ($p > 0,05$) n'a été observée pour les longueurs des différents segments de la patte, à savoir le fémur, le tibia et le tarse, et ont varié entre 1,6 et 1,8 pour le fémur, 1,7 et 2,0 pour le tibia et entre 3,9 et 4,5 pour le tarse. Entre les mâles et les femelles, une différence significative a été observée pour les valeurs obtenues sur le tibia ($t = 2,7$; $p < 0,05$) ; cependant, aucune différence pour celles du fémur ($t = 1,69$; $p > 0,05$) et du tarse ($t = 1,64$; $p > 0,05$). Les écarts-type des moyennes des différentes longueurs mesurées ont été faibles, variant entre 0 mm et 0,3 mm, suggérant une série homogène de données.

Tableau XVII : Longueurs des segments de la patte métathoracique et valeurs de l'indice palpal

Sexe	Parties du corps	caractères	Espèces	Districts de Santé						Moyenne générale	Ecart-type	F test	Valeur de p	
				Garoua			Pitoea							Mayo Oulo
				N	Moyenne 1	N	Moyenne 2	N	Moyenne 3					
Femelles	Palpe maxillaire	Indice palpal	<i>A. ara</i>	21	0,8	35	0,8	19	0,8	0,8	0,0	0,4	0,7	
			<i>A. col</i>	21	0,8	24	0,8	1	0,7	0,8	0,0			
			<i>A. gb</i>	7	0,8	6	0,8	8	0,8	0,8	0,0			
	Patte métathoracique	Fe	<i>A. ara</i>	21	1,8	35	1,8	19	1,7	1,7	0,1	1,6	0,3	
			<i>A. col</i>	21	1,8	24	1,8	1	1,7	1,8	0,0			
			<i>A. gb</i>	7	1,8	6	1,7	8	1,6	1,7	0,1			
	Patte métathoracique	Ti	<i>A. ara</i>	21	2,0	35	1,9	19	1,8	1,9	0,1	1,0	0,4	
			<i>A. col</i>	21	1,9	24	1,9	1	1,9	1,9	0,0			
			<i>A. gb</i>	7	1,9	6	1,9	8	1,7	1,8	0,1			
	Patte métathoracique	Tal-5	<i>A. ara</i>	21	4,5	35	4,3	19	4,2	4,3	0,2	0,7	0,5	
			<i>A. col</i>	21	4,4	24	4,4	1	4,4	4,4	0,0			
			<i>A. gb</i>	7	4,5	6	4,3	8	3,9	4,2	0,3			
Mâles	Palpe maxillaire	Indice palpal	<i>A. ara</i>	13	0,7	13	0,7	16	0,7	0,7	0,0	0,2	0,8	
			<i>A. col</i>	18	0,7	10	0,7	1	0,7	0,7	0,0			
			<i>A. gb</i>	3	0,7	2	0,7	6	0,7	0,7	0,0			
	Patte métathoracique	Fe	<i>A. ara</i>	13	1,8	13	1,7	17	1,7	1,7	0,1	0,6	0,6	
			<i>A. col</i>	18	1,8	11	1,7	1	1,7	1,7	0,0			
			<i>A. gb</i>	3	1,8	2	1,7	9	1,6	1,7	0,1			
	Patte métathoracique	Ti	<i>A. ara</i>	13	1,9	13	1,9	17	1,8	1,9	0,1	1,1	0,4	
			<i>A. col</i>	18	1,9	11	1,8	1	1,7	1,8	0,1			
			<i>A. gb</i>	3	1,8	2	1,7	9	1,7	1,8	0,1			
	Patte métathoracique	Tal-5	<i>A. ara</i>	13	4,5	13	4,3	17	4,1	4,3	0,2	0,7	0,5	
			<i>A. col</i>	18	4,4	11	4,3	1	4,0	4,2	0,2			
			<i>A. gb</i>	3	4,2	2	4,1	9	4,1	4,1	0,1			

Fe : fémur ; Ti : tibia ; Ta : tarse ; N : taille des échantillons collectés respectivement à Garoua, Pitoea et Mayo Oulo ; A. ara : *A. arabiensis* ; A. col : *A. coluzzii* ; A. gb : *A. gambiae* s.s. ; 1-5 : segments tarsaux.

III.1.2 Variations spatio-temporelles de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05%

III.1.2.1 Sensibilité d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05%

Les profils de la résistance des populations de moustiques de terrain à la deltaméthrine ont été analysés en rapport aux données obtenues sur la souche de référence d'*A. gambiae* reconnue sensible à tous les insecticides ; il s'agit de la souche Kisumu maintenue en élevage au laboratoire d'entomologie médicale de l'OCEAC.

III.1.2.1.1 Souche de référence

Au terme de 24 heures d'observation, la mortalité d'*A. gambiae* souche Kisumu en 2011 et 2015, enregistrée au contact avec la deltaméthrine seule ou combinée avec les synergistes (PBO à 4% et DEF à 0,25%), a été de 100% (tableau XVIII). Les temps nécessaires pour assommer 50% de moustiques (Tkd50) ont été inférieurs à 10 minutes, à l'exception des échantillons testés avec la deltaméthrine seule en 2011 dont les Tkd50 ont été de 10 minutes ; ceux correspondant à 95% de moustiques assommés (Tkd95) ont été inférieurs à 20 minutes. Les taux de réversion de l'effet « knockdown » (TrKd), suite à une exposition préalable aux synergistes, ont été inférieurs à 8% en 2011 et à 10% en 2015. En effet, la souche Kisumu d'*A. gambiae* s'est révélée sensible à la deltaméthrine 0,05%.

Tableau XVIII : Temps de « knockdown (Tkd50, Tkd95) » en minutes et statut de la sensibilité d'*A. gambiae* souche Kisumu exposée à la deltaméthrine seule ou associée aux synergistes en 2011 et 2015

Années	Insecticides	N	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	TrKd (%)	Statut
2011	Del 0,05%	86	10 (8-11)	17 (16-19)	-	S
	Del 0,05% + PBO 4%	88	9 (8-11)	18 (17-20)	3	S
	Del 0,05% + DEF 0,25%	82	9 (7-9)	17 (15-20)	7	S
2015	Del 0,05%	86	9 (7-12)	19 (15-20)	-	S
	Del 0,05% + PBO 4%	90	9 (7-10)	19 (16-21)	5	S
	Del 0,05% + DEF 0,25%	84	9 (7-9)	19 (16-21)	9	S

N : effectif testé ; IC : intervalle de confiance ; S : sensible ; Del : deltaméthrine ; PBO : Pipéronylbutoxide ; DEF : S,S,S-tributylphosphotrithioate. TrKd : taux de réversion de l'effet knockdown ; Tkd50 et Tkd95 : temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de la population de moustiques en minutes.

III.1.2.1.2 Populations de terrain

L'étude de la résistance des populations naturelles d'*A. gambiae* s.l. a été menée à travers 147 tests de sensibilité réalisés sur des échantillons de moustiques collectés dans 38 sites au cours de 5 années, de 2011 à 2015. Le nombre de tests de sensibilité effectués dans les trois districts de santé (Garoua, Pitoa et Mayo Oulo) et le statut de la sensibilité des populations d'*A. gambiae* s.l. testées sont présentés dans le tableau XIX. Sur les 38 sites d'étude, le suivi de la sensibilité a été effectué pendant les cinq années successives (2011 à 2015) dans 13 sites d'étude et durant quatre années dans 17 sites. Dans les huit autres sites, une à trois séries de tests ont été effectuées pendant les cinq années. Le nombre d'échantillons de moustiques testés chaque année a varié entre 28 et 36 en fonction de la densité des larves dans les gîtes naturels. Les données géospatiales de la résistance des moustiques à la deltaméthrine ont été représentées sous forme de cartes selon les critères d'interprétation de l'OMS (WHO, 2013).

De façon globale, le tableau XIX montre que la résistance à la deltaméthrine a été observée avec différents modèles de variations temporelles des taux de mortalité dans les sites de collecte. Dans le district de santé de Garoua, les échantillons se sont révélés en majorité résistants à la deltaméthrine entre 2011 et 2015, excepté celui d'Ourogarga qui a été sensible en 2011. Dans ce district de santé, nous avons observé une baisse graduelle des taux de mortalité allant de 22%-99% en 2011 à 29%-88% en 2015, suggérant une augmentation temporelle de la fréquence de la résistance à la deltaméthrine. Cependant, dans les districts de santé de Pitoa et de Mayo Oulo, d'importantes fluctuations de la fréquence de la résistance ont été observées, marquées soit par une hausse ou une baisse des taux de mortalité durant les cinq années consécutives, allant de 59%-94% en 2011 à 47%-93% en 2015. Dans ces deux districts de santé, la résistance a été également observée dans la majorité des sites, à l'exception des échantillons de Mayo Lebri et Boula Ibib en 2012, Boulgou en 2014 dans le district de santé de Pitoa et les échantillons de Bala et Dourbeye en 2012 et Bossoum en 2013 dans le district de santé de Mayo Oulo qui se sont révélés sensibles.

De plus, sur les 38 sites prospectés, 20 ont présenté le statut de résistant durant toute la période d'étude, alors que les 18 autres ont connu un changement de statut de la résistance. En effet, les sites dont les échantillons avaient le statut de sensible puis de résistant ont été collectés à Ourogarga en 2011, Bossoum en 2013 et Dourbeye en 2012 ; ceux dont les échantillons avaient le statut de résistance probable puis de résistant ont été collectés à Bocki, Mbilga et Lounderou en 2012 dans le district de santé de Garoua, Be-centre, Pene et Nassarao-Be en 2012, Kirambo, Boussa et Lombou en 2011 et Banaye en 2014 dans le district de santé de Pitoa, Mayo

Oulo en 2011 dans le district de santé de Mayo Oulo. Cependant, sur les 18 sites dont les changements de statut ont été observés, quatre ont présenté, durant les cinq années, les statuts de sensible, résistance probable et de résistant, à savoir Mayo Lebri, Boula Ibib et Boulgou à Pitoa, et Bala dans le district de santé de Mayo Oulo.

Tableau XIX: Suivi du niveau de sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% dans la Région du Nord de 2011 à 2015

District de santé	Sites de collecte	Taux de mortalité (statut de la sensibilité)					
		2011	2012	2013	2014	2015	
Garoua	Kolléré	22 (R)	55 (R)	43 (R)	45 (R)	39 (R)	
	Kanadi I	ND	86 (R)	86 (R)	47 (R)	62 (R)	
	Kanadi II	51 (R)	63 (R)	27 (R)	40 (R)	35 (R)	
	Djamboutou I	ND	57 (R)	51 (R)	50 (R)	44 (R)	
	Djamboutou II	89 (R)	70 (R)	55 (R)	69 (R)	61 (R)	
	Lainde I	86 (R)	57 (R)	ND	34 (R)	49 (R)	
	Lainde II	ND	75 (R)	73 (R)	48 (R)	25 (R)	
	Bocki	83 (R)	93 (RP)	76 (R)	80 (R)	32 (R)	
	Ourogarga	99 (S)	77 (R)	76 (R)	77 (R)	75 (R)	
	Plateau	ND	65 (R)	42 (R)	52 (R)	45 (R)	
	Mbilga	ND	96 (RP)	86 (R)	67 (R)	88 (R)	
	Ouro Lawane	ND	57 (R)	64 (R)	53 (R)	29 (R)	
	Louderou	ND	91 (RP)	59 (R)	80 (R)	62 (R)	
	Mboum Aviation	80 (R)	ND	80 (R)	59 (R)	79 (R)	
	Nassarao	ND	ND	ND	79 (R)	51 (R)	
	Ouro Housso I	58 (R)	44 (R)	ND	20 (R)	44 (R)	
Ouro Housso II	68 (R)	46 (R)	46 (R)	32 (R)	38 (R)		
Pitoa	Guizigare	59 (R)	63 (R)	74 (R)	64 (R)	60 (R)	
	Be-Centre	79 (R)	90 (RP)	86 (R)	74 (R)	83 (R)	
	Mayo Lebri	86 (R)	100 (S)	79 (R)	91 (RP)	63 (R)	
	Kirambo	94 (RP)	ND	ND	85 (R)	63 (R)	
	Boussa	94 (RP)	95 (RP)	ND	78 (R)	71 (R)	
	Lombou	91 (RP)	94 (RP)	70 (R)	94 (RP)	51 (R)	
	Boula Ibib	ND	100 (S)	92 (RP)	93 (RP)	65 (R)	
	Boulgou	ND	97 (RP)	88 (R)	98 (S)	93 (RP)	
	Pene	ND	91 (RP)	74 (R)	93 (RP)	39 (R)	
	Nassarao-Be	ND	95 (RP)	84 (R)	96 (RP)	76 (R)	
	Mbolom	82 (R)	89 (R)	65 (R)	ND	47 (R)	
	Banaye	ND	ND	ND	94 (RP)	75 (R)	
	Mayo Oulo	Bala	85 (R)	100 (S)	90 (RP)	86 (R)	82 (R)
Bossoum		79 (R)	ND	100 (S)	81 (R)	75 (R)	
Mayo Oulo		93 (RP)	93 (RP)	96 (RP)	69 (R)	84 (R)	
Dourbeye		83 (R)	98 (S)	86 (R)	75 (R)	80 (R)	
Doumou		ND	ND	82 (R)	49 (R)	65 (R)	
Batoum		ND	ND	ND	ND	78 (R)	
Boyoum		ND	ND	ND	ND	80 (R)	
Matra		ND	ND	ND	86 (R)	ND	
Maboni		ND	ND	80 (R)	61 (R)	ND	
Total	38	20	28	29	35	36	
Statut de la résistance		Sensible		Résistance probable		Résistance	
Taux de mortalité (TM 24)		TM 24 ≥ 98%		90% ≤ TM 24 < 98%		TM24 < 90%	

Résistance (R) ; résistance probable (RP) ; sensible (S) ; ND : non déterminé ; TM 24 : Taux de mortalité après 24 heures.

- **Variations temporelles de la sensibilité des moustiques à la deltaméthrine 0,05% dans les différents districts de santé**

Les données sur la variation temporelle du niveau de sensibilité d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine entre 2011 et 2015 ont été représentées sous forme de tableaux pour les temps de « *knockdown* » et sous forme de diagrammes à barres pour les taux de mortalité.

- **District de Santé de Garoua**

Au total, 72 tests de sensibilité ont été réalisés sur les échantillons d'*A. gambiae* s.l.. Les temps de « *knockdown* » des moustiques au contact avec la deltaméthrine sont présentés dans le tableau XX et les taux de mortalité sur la figure 26.

Le tableau XX a présenté différents modèles de variation des temps de « *knockdown* » dans les différents sites de collecte. À Kolléré, une baisse non linéaire des Tkd50 a été observée avec des valeurs au dessus de 50 minutes entre 2011 et 2015 ; ces Tkd50 ont été parfois 10 fois supérieurs à ceux observés chez la souche Kisumu sensible. Par contre, pour la majorité des sites, une augmentation des Tkd50 a été observée entre 2011 et 2015 ; elle a été linéaire dans les échantillons de moustiques collectés à Djamboutou I avec des Tkd50 allant de 41 minutes en 2012 à 93 minutes en 2015, et non linéaire dans le reste des échantillons, allant de 12 minutes en 2011 à 90 minutes en 2015. Les Tkd95 correspondants pour la majorité des échantillons ont aussi été supérieurs à 60 minutes, à l'exception de ceux de Mbilga en 2015 et de Louderou en 2014. Le ratio RTkd50 des échantillons de terrain a également augmenté, partant des valeurs inférieures à 6 entre 2011 et 2013 à des valeurs comprises entre 6 et 10 de 2014 à 2015. Cependant, dans les échantillons de moustiques de Kolléré, nous avons plutôt observé une diminution progressive des RTkd50.

De façon globale, nous avons observé une baisse linéaire de la mortalité, avec des taux allant de 71% en 2011 à 49% en 2015. Plus spécifiquement, hormis les échantillons d'Ourogarga trouvés sensibles en 2011 (99% de taux de mortalité), tous les autres lots de moustiques testés se sont révélés résistants à la deltaméthrine, avec des taux de mortalité variant entre 22% et 93% quelle que soit l'année de collecte (figure 26). Par ailleurs, la majorité des échantillons ont montré une diminution progressive du taux de mortalité des moustiques au fil des ans, suggérant une augmentation de fréquence de la résistance. Le nombre d'échantillons ayant rendu une mortalité inférieure à 50% a augmenté de 1 en 2011 à 7 en 2014. Entre 2014 et 2015, la fréquence des cas de résistance a continué à augmenter, avec des taux de mortalité

des moustiques toujours en baisse (< 40%), en particulier avec les moustiques de Kolléré, Kanadi II, Ouro Housso II, Bocki, Lainde II et Ouro Lawane.

Tableau XX: Temps de « *knockdown* (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% à Garoua

Sites de collecte	Années	N	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	RTkd50	Statut
Kolléré	2011	45	187 (23-1526)	2355 (0-1860000)	20	R
	2012	84	57 (50-68)	242 (167-438)	6	R
	2013	100	101 (77-204)	547 (248-5127)	11	R
	2014	103	139 (94-469)	887 (321-24600)	15	R
	2015	101	67 (60-79)	191 (144-297)	7	R
Kanadi II	2011	96	55 (49-63)	184 (131-343)	6	R
	2012	43	38 (32-46)	161 (110-341)	4	R
	2013	100	57 (50-66)	240 (169-413)	6	R
	2014	99	74 (61-105)	623 (302-3070)	8	R
	2015	100	90 (75-125)	265 (174-575)	10	R
Kanadi I	2012	86	23 (18-28)	75 (64-94)	3	R
	2013	90	26 (8-38)	128 (98-254)	3	R
	2014	102	114 (85-179)	997 (448-3090)	12	R
	2015	105	56 (52-62)	147 (119-199)	6	R
Djamboutou II	2011	76	12 (36-51)	60 (49-76)	1	R
	2012	71	24 (19-28)	103 (82-150)	3	R
	2013	123	38 (35-40)	114 (97-142)	4	R
	2014	113	33 (30-35)	116 (96-149)	3	R
	2015	101	43 (39-47)	150 (119-208)	4	R
Djamboutou I	2012	53	41 (33-49)	238 (146-680)	4	R
	2013	102	51 (46-58)	170 (131-248)	5	R
	2014	66	63 (55-78)	207 (145-371)	7	R
	2015	101	93 (75-133)	414 (246-1040)	10	R
Ouro Housso I	2011	83	35 (29-40)	121 (89-235)	4	R
	2012	110	54 (45- 63)	156 (136-176)	6	R
	2014	40	83 (65-180)	268 (141-2700)	9	R
	2015	59	78 (70-113)	335 (194-976)	8	R
Ouro Housso II	2011	82	37 (30-42)	128 (92-261)	4	R
	2012	93	52 (31-64)	134 (124-194)	6	R
	2013	68	79 (63-123)	392 (205-1801)	8	R
	2014	102	91 (74-136)	378 (218-1140)	10	R
	2015	69	89 (70-136)	388 (218-1200)	7	R
Lainde I	2011	120	15 (13-17)	49 (43-57)	2	R
	2012	21	43 (21-61)	210 (112-5057)	5	R
	2014	44	69 (57-102)	223 (135-794)	7	R
	2015	100	56 (48-69)	139 (100-265)	6	R
Bocki	2011	87	36 (32-40)	81 (70-101)	4	R
	2012	14	33 (18-41)	75 (58-178)	3	RP
	2013	71	27 (23-29)	76 (65-95)	3	R
	2014	20	37 (33-43)	76 (59-122)	4	R
	2015	95	70 (62-84)	174 (131-277)	7	R
Mboum Aviation	2011	15	33 (11-43)	82 (60-346)	4	R
	2013	98	29 (26-33)	169 (129-240)	3	R
	2014	83	50 (45-658)	75 (64-86)	5	R
	2015	48	76 (59-129)	448 (215-2730)	8	R
Ourogarga	2011	82	22 (16-27)	52 (40-84)	2	S
	2012	68	29 (24-33)	61 (55-73)	3	R
	2013	94	33 (31-36)	91 (78-111)	3	R

Tableau XX (suite) : Temps de « knockdown (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% à Garoua

	2014	91	29 (25-33)	76 (61-109)	3	R
	2015	100	40 (37-44)	146 (118-194)	4	R
Lainde II	2012	28	32 (19-43)	193 (112-1030)	3	R
	2013	92	34 (30-37)	117 (95-160)	4	R
	2014	102	42 (39-46)	127 (105-167)	4	R
	2015	16	88 (62-630)	248 (117-33700)	9	R
Plateau	2012	80	54 (49-60)	137 (105-223)	6	R
	2013	109	44 (41-46)	99 (86-120)	4	R
	2014	102	64 (56-78)	229 (155-473)	7	R
	2015	74	65 (56-81)	256 (171-505)	7	R
Mbilga	2012	89	19 (16-23)	49 (38-75)	2	RP
	2013	100	25 (21-28)	98 (81-129)	3	R
	2014	90	30 (27-32)	83 (72-102)	3	R
	2015	72	21 (17-25)	49 (39-74)	2	R
Ouro Lawane	2012	72	28 (25-30)	68 (60-81)	3	R
	2013	101	36 (30-40)	122 (98-179)	4	R
	2014	72	42 (38-48)	154 (117-231)	4	R
	2015	17	63 (53-103)	131 (88-565)	7	R
Louderou	2012	84	20 (15-24)	76 (64-98)	2	RP
	2013	81	35 (32-38)	83 (72-101)	4	R
	2014	41	25 (22-27)	51 (45-60)	3	R
	2015	79	57 (51-66)	170 (130-258)	6	R
Nassarao	2014	52	34 (29-40)	151 (108-275)	3	R
	2015	100	43 (41-46)	88 (78-104)	4	R

N : effectif testé ; IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance ; RP : résistance probable ; S : sensible ; Tkd50 et Tkd95 : temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de la population de moustiques en minutes ; RTkd50 : ratio des Tkd50 de l'insecticide sur celui de la souche kisumu.

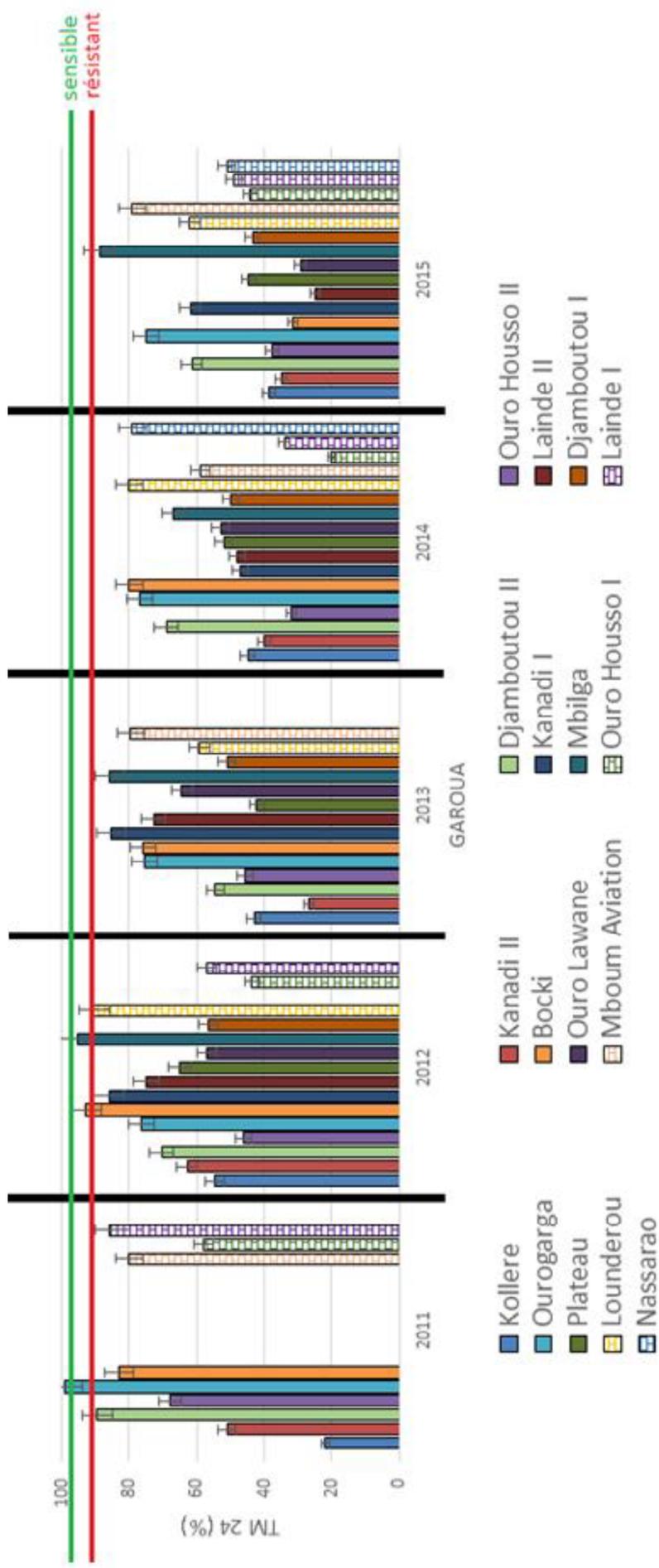


Figure 26 : Taux de mortalité causée par la deltaméthrine 0,05% dans les échantillons d'*A. gambiae* s.l. du district de santé de Garoua au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015. TM 24 : taux de mortalité après 24 heures.

○ **District de Santé de Pitoa**

Au total, 49 tests de sensibilité ont été réalisés sur les échantillons d'*A. gambiae* s.l. collectés dans 12 sites. Les temps de « *knockdown* » des moustiques au contact avec la delataméthrine sont consignés dans le tableau XXI et les taux de mortalité présentés sur la figure 27.

De manière globale, une augmentation non linéaire des temps de « *knockdown* » a été observée dans tous les sites de collecte entre 2011 et 2015 ; les Tkd50 oscillaient entre 11 minutes en 2011 à 85 minutes en 2015, suggérant une baisse de l'effet « *knockdown* » de la delataméthrine sur les échantillons de moustiques collectés. Les Tkd95 correspondants ont été également marqués par des variations en dents de scie allant de 27 minutes en 2011 à 364 minutes en 2015 ; les RTkd50 ont été généralement inférieurs à 3 pour les échantillons collectés entre 2011 et 2014 et compris entre 3 et 9 pour ceux collectés uniquement en 2015.

De façon globale, contrairement au district de santé de Garoua, nous avons observé une baisse non linéaire de la mortalité, avec des taux allant de 84% en 2011 à 66% en 2015. Plus spécifiquement, les fréquences les plus faibles de la résistance ont été obtenues entre 2011 et 2014, avec des taux de mortalité compris entre 59% et 98%. Les échantillons de Mayo Lebri, Boula Ibib et Boulgou se sont révélés sensibles en 2012 et 2014. Toutefois, en 2015, tous les échantillons ayant présenté le statut de sensible/résistance probable ont confirmé leur résistance, marquée par des taux de mortalité inférieurs à 50% particulièrement à Pene et Mbolom.

Tableau XXI: Temps de « *knockdown* (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% à Pitoa

Sites de collecte	Années	N	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	Rtkd50	Statut
Guizigare	2011	110	20 (18-22)	53 (47-61)	2	R
	2012	100	45 (41-51)	173 (135-246)	5	R
	2013	105	21 (14-27)	53 (44-72)	2	R
	2014	81	34 (31-38)	137 (109-186)	3	R
	2015	88	29 (25-33)	97 (80-131)	3	R
Be-Centre	2011	109	17 (15-19)	41 (37-47)	2	R
	2012	82	24 (21-26)	79 (67-99)	2	RP
	2013	87	22 (20-24)	54 (48-62)	2	R
	2014	77	16 (5-28)	182 (122-402)	2	R
	2015	95	37 (32-44)	104 (78-175)	4	R
Mayo Lebri	2011	65	15 (14-17)	46 (40-55)	2	R
	2012	96	18 (16-19)	43 (38-49)	2	S
	2013	66	17 (14-19)	39 (32-53)	2	R
	2014	81	10 (9-11)	40 (34-48)	1	RP
	2015	62	26 (25-28)	52 (47-60)	3	R
Kirambo	2011	72	12 (10-13)	33 (29-39)	1	RP
	2014	39	12 (5-17)	52 (40-75)	1	RP
	2015	62	36 (33-39)	79 (69-96)	4	R
Mbolom	2011	74	17 (15-19)	40 (35-47)	2	R
	2012	67	15 (6-22)	43 (34-52)	2	R
	2013	71	20 (5-28)	48 (36-100)	2	R
	2015	88	46 (44-48)	81 (73-93)	5	R
Boussa	2011	112	14 (13-16)	27 (24-31)	1	RP
	2012	90	22 (20-24)	58 (51-67)	2	RP
	2014	80	13 (3-24)	50 (34-114)	1	RP
	2015	91	29 (27-31)	73 (65-86)	3	R
Lombou	2011	62	11 (4-17)	31 (19-150)	1	RP
	2012	87	18 (16-20)	52 (46-62)	2	RP
	2013	111	17 (16-18)	32 (29-35)	2	R
	2014	80	24 (15-31)	95 (66-219)	2	RP
	2015	88	46 (38-61)	170 (105-544)	5	R
Boula Ibib	2012	58	22 (15-24)	47 (42-55)	2	S
	2013	96	26 (5-36)	52 (39-63)	3	RP
	2014	90	14 (8-18)	62 (52-78)	1	RP
	2015	92	25 (24-27)	60 (54-68)	3	R
Boulgou	2012	41	16 (14-19)	39 (34-49)	2	RP
	2013	62	16 (9-23)	33 (22-66)	2	R
	2014	79	11 (10-12)	29 (26-34)	1	S
	2015	100	36 (31-41)	185 (135-306)	4	RP
Pene	2012	87	18 (9-25)	74 (54-144)	2	RP
	2013	55	26 (11-35)	66 (56-87)	3	R
	2014	74	22 (20-24)	86 (71-110)	2	RP
	2015	83	85 (70-121)	364 (218-918)	9	R
Nassarao-Be	2012	86	20 (17-22)	58 (51-69)	2	RP
	2013	70	18 (2-30)	46 (23-58)	2	R
	2014	46	14 (11-17)	20 (80-204)	1	RP
	2015	90	37 (30-48)	119 (79-311)	4	R
Banaye	2014	48	14 (8-18)	51 (42-69)	1	RP
	2015	92	41 (38-44)	108 (92-133)	4	R

N : effectif testé ; IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance ; RP : résistance probable ; S : sensible ; Tkd50 et Tkd95 : temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de la population de moustiques en minutes ; RTkd50 : ratio des Tkd50 de l'insecticide sur celui de la souche kisumu.

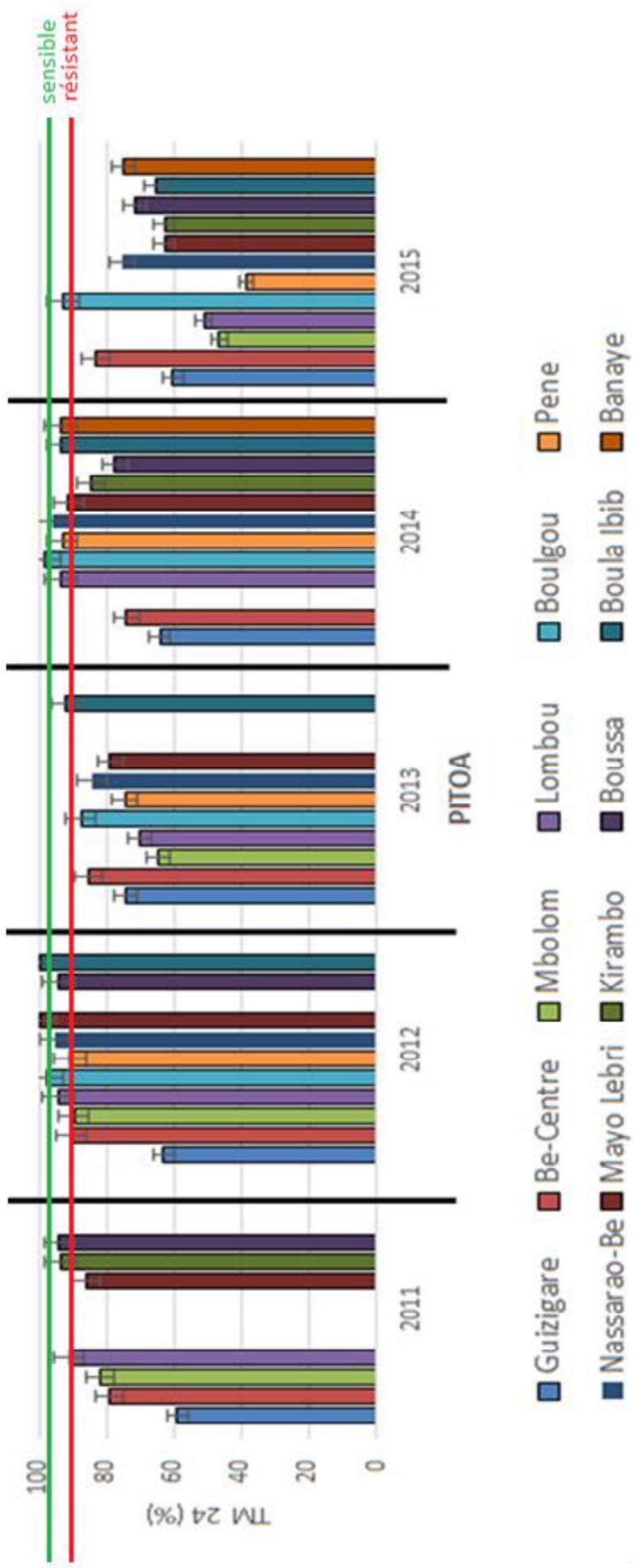


Figure 27 : Taux de mortalité causée par la deltaméthrine 0,05% dans les échantillons d'*A. gambiae* s.l. du district de santé de Pitoa au Nord-Cameroun entre 2011 et 2014. TM 24 : taux de mortalité après 24 heures.

- **District de santé de Mayo Oulo**

A total, 27 tests de sensibilité ont été réalisés sur les échantillons d'*A. gambiae* s.l. collectés dans neuf sites. Les temps de « *knockdown* » des moustiques au contact de la deltaméthrine sont consignés dans le tableau XXII et les taux de mortalité présentés dans la figure 28.

Comme dans le district de santé de Pitoa, des variations en dents de scie du niveau de sensibilité à la deltaméthrine ont été notées d'une année à l'autre, avec des fluctuations des temps de « *knockdown* ». Sur les six sites où au moins deux séries de tests ont été effectuées durant toute la période d'étude de 2011 à 2014, nous avons observé une diminution non linéaire sur cinq sites, des Tkd50 allant de 48 minutes à 25 minutes et suggérant une augmentation de l'effet « *knockdown* » de la deltaméthrine sur les échantillons de moustiques collectés dans ces sites. Cependant, nous avons observé, dans les échantillons collectés à Doumou, une augmentation non linéaire des Tkd50 allant de 30 minutes en 2013 à 45 minutes en 2015, suggérant une diminution de l'effet « *knockdown* » de la deltaméthrine sur les échantillons de moustiques collectés. Tkd95 correspondants pour la majorité des échantillons ont été généralement supérieurs à 60 minutes entre 2011 et 2015. Les RTkd50 étaient compris entre 2 et 5, sauf pour celui de l'échantillon de Bala en 2012 qui a été plus faible avec une valeur de 1.

De façon globale, comme dans le district de santé de Pitoa, nous avons observé une baisse non linéaire de la mortalité, avec des taux allant de 85% en 2011 à 77% en 2015. Plus spécifiquement, les fréquences de la résistance à la deltaméthrine les plus faibles ont été enregistrées entre 2011 et 2013, avec des taux de mortalité compris entre 79% et 98%. Les échantillons de Bala, Bossoum et Dourbeye se sont révélés sensibles à la deltaméthrine en 2012 et 2013 ; par contre, de 2014 à 2015, les fréquences de la résistance étaient élevées, avec des taux de mortalité inférieurs à 65% à Doumou et Maboni.

Tableau XXII: Temps de « *knockdown* » (Tkd50, Tkd95) en minutes et suivi du niveau de sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% à Mayo Oulo

Sites de collecte	Années	N	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	Rtkd50	Statut
Bala	2011	75	41 (37-45)	78 (68-99)	4	R
	2012	54	12 (6-16)	44 (36-56)	1	S
	2013	80	18 (16-19)	51 (45-60)	2	RP
	2014	72	28 (26-30)	60 (54-69)	3	R
	2015	87	28 (26-29)	61 (55-69)	3	R
Bossoum	2011	80	48 (38-53)	87 (75-139)	5	R
	2013	45	33 (30-37)	76 (64-98)	3	S
	2014	63	27 (25-29)	72 (62-88)	3	R
	2015	85	29 (28-31)	58 (53-65)	3	R
Mayo Oulo	2011	80	34 (12-43)	75 (57-368)	3	RP
	2012	48	19 (14-22)	41 (36-50)	2	RP
	2013	72	26 (23-29)	72 (62-89)	3	RP
	2014	98	35 (33-37)	78 (70-93)	4	R
	2015	103	25 (22-31)	62 (47-94)	3	R
Dourbeye	2011	80	36 (33-39)	69 (62-80)	4	R
	2012	71	21 (12-27)	46 (37-73)	2	S
	2013	71	21 (19-23)	56 (49-67)	2	R
	2014	72	35 (32-37)	83 (72-99)	4	R
	2015	95	35 (33-38)	109 (86-125)	4	R
Doumou	2013	60	30 (23-36)	155 (109-294)	3	R
	2014	86	47 (44-50)	90 (80-108)	5	R
	2015	76	45 (42-49)	103 (87-136)	5	R
Maboni	2013	40	28 (5-43)	89 (70-365)	3	R
	2014	80	34 (32-37)	86 (75-104)	3	R
Matra	2014	63	21 (18-24)	41 (34-55)	2	R
Batoum	2015	94	27 (26-29)	60 (54-67)	3	R
Boyoum	2015	70	29 (27-31)	57 (52-65)	3	R

N : effectif testé ; IC : intervalle de confiance à 95% ; R : résistance ; RP : résistance probable ; S : sensible ; Tkd50 et Tkd95 : temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de la population de moustiques en minutes ; RTkd50 : ratio des Tkd50 de l'insecticide sur celui de la souche kisumu.

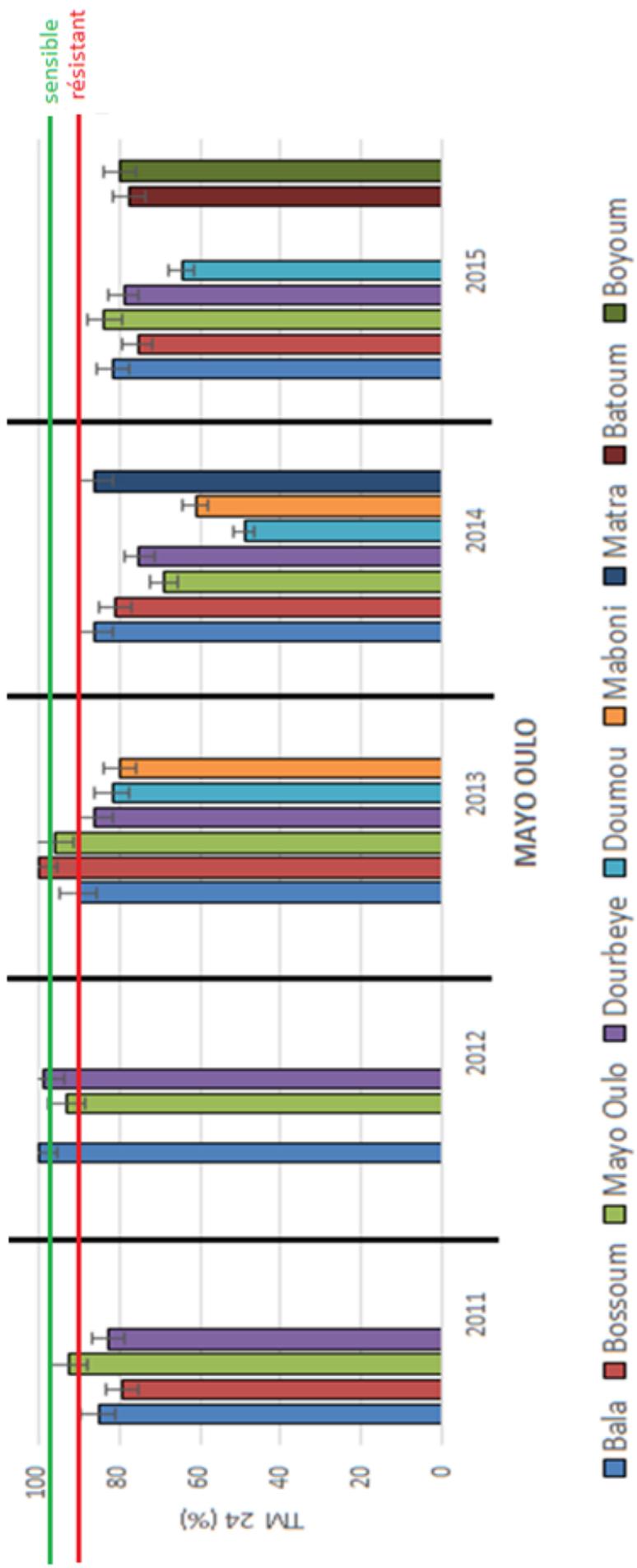


Figure 28 : Taux de mortalité causée par la deltaméthrine 0,05% dans les échantillons d'*A. gambiae* s.l. du district de santé de Mayo Oulo au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015. TM 24 : taux de mortalité après 24 heures.

- **Variations spatiales du niveau de sensibilité à la deltaméthrine 0,05%**

Le modèle géospatial de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine est présenté sur la figure 29 ; il tient compte des coordonnées géographiques (latitude, longitude) des sites de collecte des moustiques et des changements de statut de la sensibilité/résistance à la deltaméthrine des échantillons en fonction du temps.

En 2011, sur les 20 échantillons d'*A. gambiae* s.l. testés, un seul celui d'Ourogarga a été sensible, quatre autres (Kirambo, Boussa, Lombou et Mayo Oulo) ont présenté une résistance probable ; les 14 autres échantillons se sont révélés résistants. Entre 2012 et 2015, le niveau de sensibilité à la deltaméthrine a varié d'une année à l'autre dans 16 sites incluant ainsi trois sites du district de santé de Garoua (Bocki, Loundrou, Mbilga), neuf sites du district de santé de Pitoa (Be-Centre, Mayo Lebri, Boussa, Lombou, Boula Ibib, Boulgou, Pene, Banaye et Nassarao-Be) et quatre sites du district de santé de Mayo Oulo (Bala, Bossoum, Mayo Oulo et Dourbeye).

Dans le district de santé de Garoua, tous les échantillons testés se sont révélés résistants en 2013 ; cette résistance est apparue plus tôt, en 2011, et elle est restée constante à Kollere, Kanadi II et Djamboutou II jusqu'en 2015. À Ourogarga, les moustiques ont d'abord été sensibles en 2011, puis ils sont devenus résistants de 2012 à 2015 ; à Mbocki, Mbilga et Loundrou, c'est plutôt le statut de « résistance probable » en 2012 qui a été suivi d'une résistance entre 2013 et 2015. Dans le district de santé de Pitoa, la majorité des échantillons testés ont été résistants en 2015. Toutefois, parmi ces 12 lots testés, le statut de la sensibilité a été variable dans 10 d'entre eux, les deux autres (Guizigare et Mbolom) ont maintenu leur résistance de 2011 à 2015. En 2012, les moustiques ont été résistants dans deux sites seulement ; par contre, dans les autres sites, les anophèles soit ont été sensibles, soit ont présenté une résistance probable. À Boula Ibib et à Bala, les trois statuts de sensibilité/résistance (sensible, résistance probable et résistance) ont été successivement enregistrés d'année en année. Dans le DS de Mayo Oulo, la majorité des moustiques testés ont été résistants en 2014 et en 2015 ; ce statut a été d'ailleurs noté dès 2013 à Dourbeye, Doumou et Maboni.

Les valeurs de l'indice de l'autocorrélation spatiale de la mortalité des moustiques dans les trois districts de santé ont été présentées dans le tableau XXIII. Dès l'an 2011, une distribution aléatoire du taux de mortalité des anophèles dans nos sites d'étude a été notée, les sites proches les uns des autres ayant des statuts de sensibilité des moustiques différents (figure 29). La valeur de l'indice d'autocorrélation de Moran a été plus proche de zéro, suggérant une absence d'autocorrélation spatiale ($p > 0,05$). Par contre, entre 2012 et 2015, les sites qui étaient proches les uns des autres avaient des moustiques présentant le statut de résistant à la deltaméthrine

0,05%. Les valeurs de l'indice de Moran ont été significativement faibles ($< -0,1$), suggérant une autocorrélation spatiale positive ($p < 0,001$) ; en effet, de 2012 à 2013, la résistance étudiée a commencé à se répandre dans la majorité des sites du district de santé de Garoua, ensuite à ceux de Pitoa et Mayo Oulo. En 2014, tous les échantillons d'*A. gambiae* s.l. de Garoua et de Mayo Oulo ont été résistants, alors qu'à Pitoa la majorité des lots testés ont révélé une résistance probable. En 2015, la résistance s'est généralisée dans tous les sites, à l'exception d'une localité du district de santé de Pitoa qui a présenté le statut de résistance probable (figure 29).

Sur la base des résultats obtenus, deux directions de dispersion de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine apparaissent, l'une vers le Nord et l'autre vers le Sud de notre zone d'étude. Dans la partie Sud, le barycentre de la distribution de la résistance se situe dans le district de santé de Garoua à partir duquel cette résistance se disperse en direction Est du district de santé de Pitoa. Dans la partie Nord, le barycentre de la distribution de la résistance se situe hors de la zone d'étude et cette résistance se disperse en direction Ouest-Nord vers l'Est. En plus de l'orientation de la dispersion et du regroupement spatial, nous avons exploré l'influence des faciès écologiques vu le positionnement des barycentres dans la zone urbaine de Garoua et en dehors dans la zone rurale de Mayo Oulo.

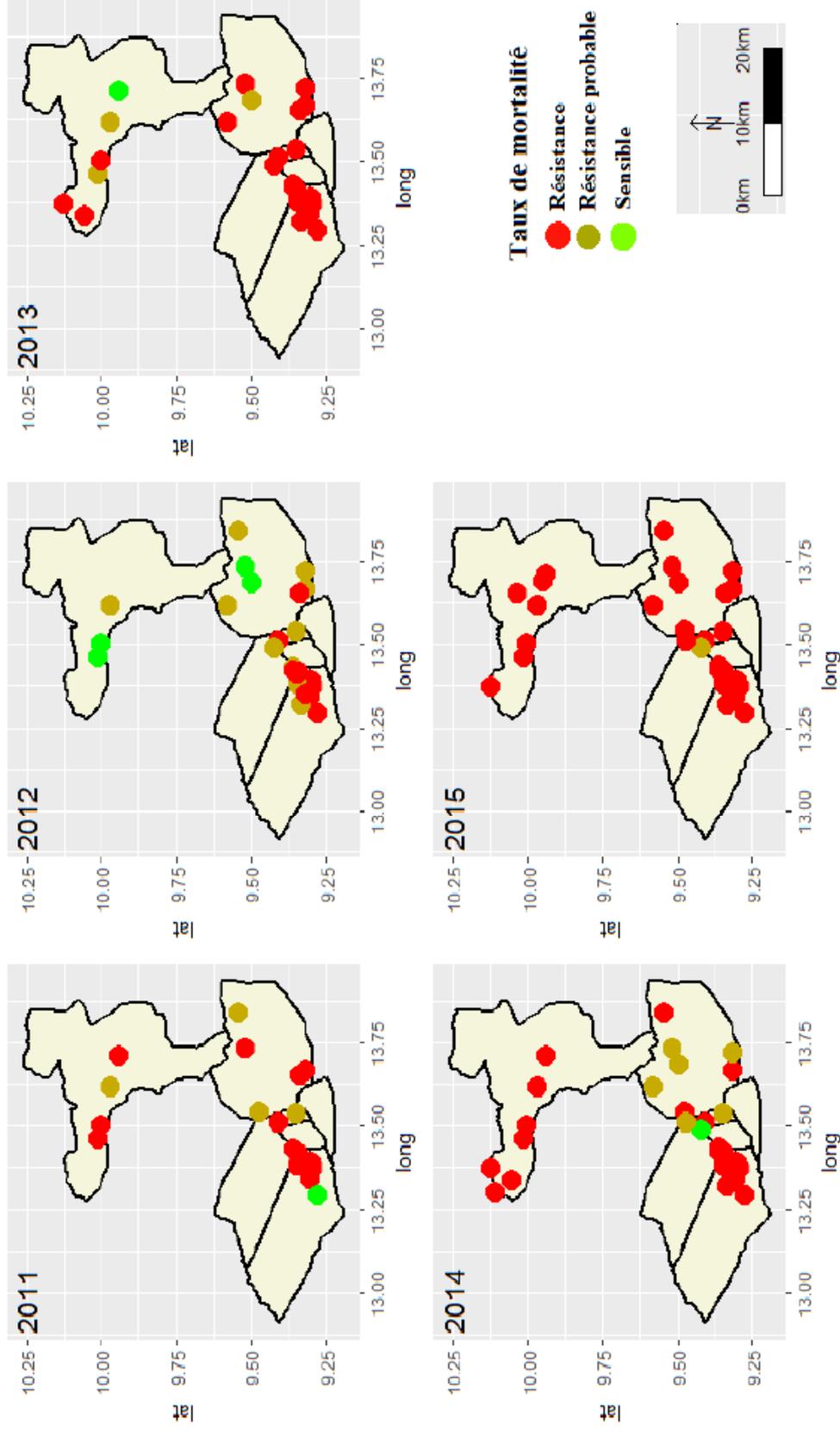


Figure 29 : Evolution spatio-temporelle du niveau de sensibilité des moustiques à la deltaméthrine 0,05% dans les sites d'étude des trois districts de santé de 2011 à 2015. GAR : Garoua ; PIT : Pitoa ; MAY : Mayo Oulo; lat : latitude; long : longitude.

Tableau XXIII: Evaluation de l'autocorrélation spatiale entre les sites d'étude en fonction des années

Variable	Année	Indice de Moran		Ecart-type	Valeur de p
		Attendu	Observé		
TM24	2011	-0,053	-0,046	0,036	0,2296
	2012	-0,037	-0,251	0,026	<0,0001
	2013	-0,036	-0,225	0,027	<0,0001
	2014	-0,029	-0,149	0,022	<0,0001
	2015	-0,028	-0,165	0,021	<0,0001

TM24 : taux de mortalité après 24 heures d'exposition à l'insecticide.

- **Evolution de la résistance en fonction des faciès urbain, péri-urbain et rural**

La figure 30 montre l'évolution spatio-temporelle du taux de mortalité (TM24) et du temps de « *knockdown* » (Tkd50) d'*A. gambiae* s.l. dans 24 des 38 sites où les moustiques ont été collectés.

Durant les cinq années d'étude de 2011 à 2015, une augmentation de la résistance des moustiques à la deltaméthrine 0,05% a été mise en évidence ; en effet, les taux de mortalité (TM24) ont diminué des zones rurales (70-93%) vers les zones urbaines (44-64%) en passant par les zones peri-urbaines (52-77%) ($JT = 5282$, $p < 0,0001$). Parallèlement, une régression significative ($JT = 5230$, $p < 0,0001$) des temps de « *knockdown* » (Tkd50) a été notée des zones urbaines (38-78 minutes) vers les zones rurales (24-38 minutes) en passant par les zones peri-urbaines (27-45 minutes) comme l'illustre la figure 30.

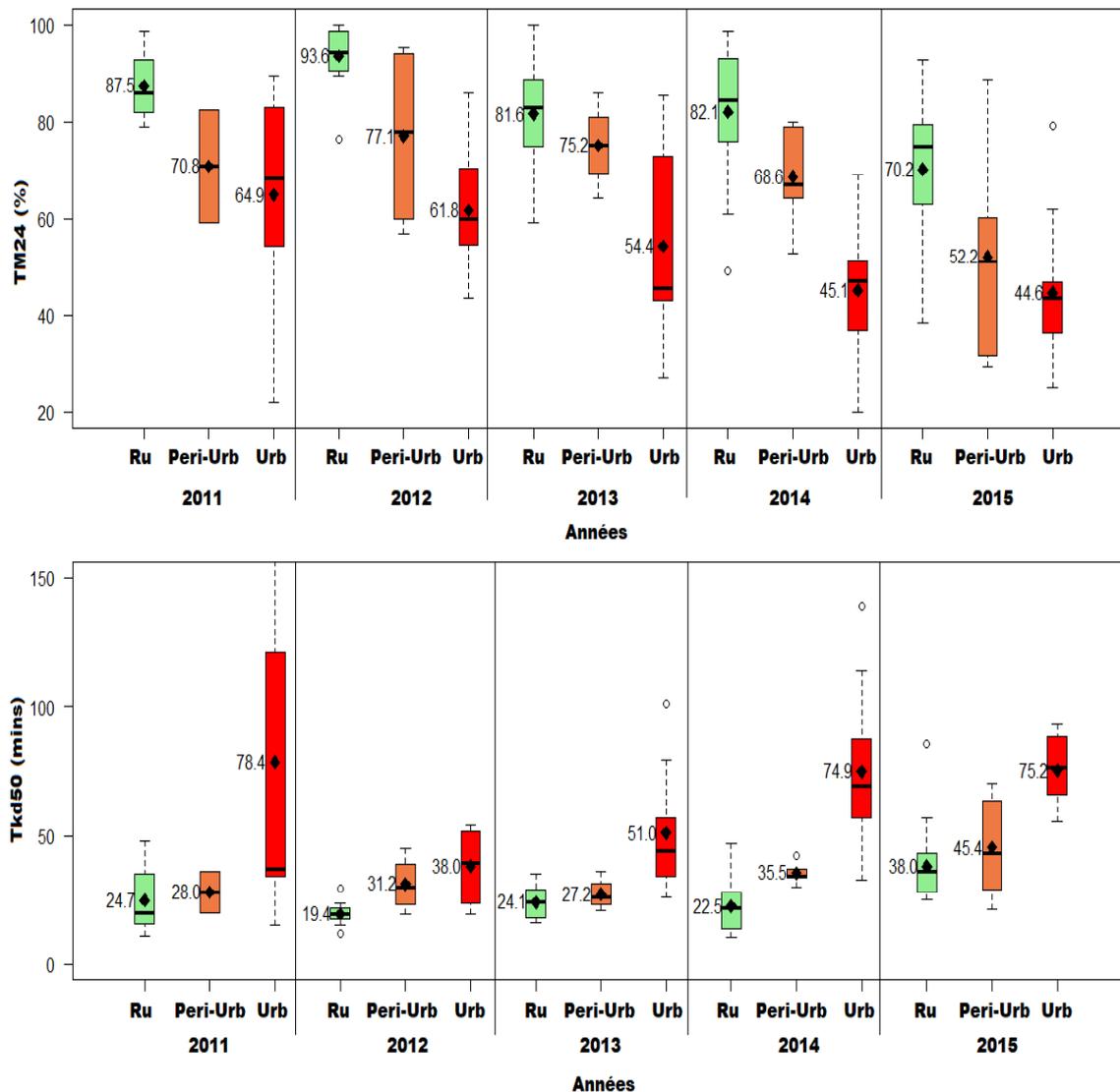


Figure 30 : Distribution spatio-temporelle du taux de mortalité (TM24) et des temps de « knockdown » (Tkd50) de 2011 à 2015 d'*A. gambiae* s.l.. Ru : zone rurale ; Peri-Urb : zone peri-urbaine ; Urb : zone urbaine. TM24 : taux de mortalité après 24 heures d'exposition à l'insecticide ; Tkd50 : temps de « knockdown » pour 50% de moustiques testés.

III.1.2.2 Répartition des espèces du complexe *A. gambiae* en fonction du profil de la résistance à la deltaméthrine 0,05%

Cette partie du travail a consisté à l'identification des espèces du complexe *A. gambiae* dans les populations de moustiques testées et à l'étude de la relation entre ces espèces et les différents niveaux de la résistance à la deltaméthrine. Cette étude a concerné les échantillons provenant de neuf sites dans le district de santé de Garoua (Kanadi I et II, Djamboutou II, Ouro Housso I et II, Kollere, Oourogarga, Plateau et Mbilga), trois sites dans le district de santé de

Pitoea (Lombou, Be-Centre et Guizigare) et trois sites dans le district de santé de Mayo Oulo (Mayo Oulo, Bala et Dourbeye).

Au total, 2687 moustiques morphologiquement identifiés comme appartenant au complexe *A. gambiae* ont été soumis à l'identification moléculaire des espèces ; ces spécimens ont été choisis au hasard parmi les échantillons de moustiques témoins aux tests de sensibilité. En fonction du profil évolutif de la résistance entre 2011 et 2015, nous avons distingué deux groupes de populations :

- les populations de moustiques dont le statut de la résistance à la deltaméthrine était confirmé pendant toute la période d'étude ; ce groupe a concerné les échantillons collectés dans huit sites : Kolléré, Kanadi I et II, Ouro Housso I et II, Djamboutou II, Plateau et Guizigare (1^{er} groupe) ;

- les populations de moustiques dont le statut est passé de sensible/résistance probable à la résistance confirmée dans les échantillons collectés dans sept sites : Ougarga, Mbilga, Be-Centre, Lombou, Bala, Mayo Oulo et Dourbeye (2^e groupe).

Dans le premier groupe, *A. arabiensis* (46,7%) et *A. coluzzii* (42,7%) étaient majoritaires. Entre 2011 et 2015, nous avons observé une diminution non linéaire de la proportion d'*A. arabiensis* ainsi qu'une augmentation de la fréquence d'*A. coluzzii* (tableau XXIV). Les fréquences relatives d'*A. gambiae* s.s. ont oscillé entre 2,5% et 25,7%. Dans le deuxième groupe, *A. arabiensis* était l'espèce dominante (80,1%) contre 12,9% pour *A. coluzzii* et 6,9% pour *A. gambiae* s.s.. D'année en année, nous avons observé une diminution progressive de la proportion d'*A. arabiensis* allant de 94,5% en 2011 à 66,0% en 2015. Par contre, les proportions d'*A. coluzzii* ont augmenté, de 2011 à 2015, de 3,3% à 23%, et celles d'*A. gambiae* s.s. de 2,2% à 23% pour la même période.

De façon générale, la baisse de la fréquence relative d'*A. arabiensis* et l'augmentation de celles d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae* s.s. étaient en dents de scie dans le premier groupe de populations ; dans le deuxième groupe de populations, ces variations étaient plutôt linéaires. Ces résultats suggèrent une liaison étroite entre les proportions relatives des espèces et l'évolution du statut de la résistance entre 2011 et 2015, allant de « sensible » ou « résistance probable » à « résistance confirmée ».

La figure 31 montre les variations des fréquences des espèces du complexe *A. gambiae* en fonction des taux de mortalité des échantillons de moustiques soumis aux tests de sensibilité.

En effet, nous avons observé que l'augmentation des taux de mortalité était associée à une augmentation de la fréquence relative d'*A. arabiensis* avec une diminution de celles d'*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s.. En revanche, les taux de mortalité les plus bas ont été associés aux

fréquences relatives les plus faibles d'*A. arabiensis*, et inversement aux fréquences les plus élevées d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae* s.s.. Ces résultats suggèrent que parmi les trois espèces du complexe *A. gambiae* en présence dans les sites d'étude, *A. gambiae* s.s. et *A. coluzzii* sont plus aptes à développer une résistance à la deltaméthrine par rapport à *A. arabiensis* qui est l'espèce la plus abondante. En effet, le développement de la résistance des populations d'*A. gambiae* s.l. dans les trois district de santé semble résulter de l'augmentation de la fréquence de deux espèces de ce complexe : *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s..

Tableau XXIV : Distribution des espèces du complexe *A. gambiae* en fonction du profil évolutif de la résistance à la deltaméthrine 0,05% entre 2011 et 2015

Statut	Sites	Années	N	Espèces		
				<i>A. arabiensis</i> (%)	<i>A. coluzzii</i> (%)	<i>A. gambiae</i> s.s.(%)
R	Kollere, Kanadi I et	2011	126	70,3	20,5	9,1
TM24 < 90%	II, Ouro Housso I et	2012	333	39,2	58,3	2,5
		2013	341	48,5	46,4	5,4
	II, Djamboutou II, Plateau, Guizigare	2014	345	60,1	29,6	10,2
		2015	58	15,5	58,6	25,7
	Total	1203	46,7	42,7	10,5	
S/RP à R	Ourogarga, Mbilga,	2011	180	94,5	3,3	2,2
90%	Be-Centre, Lombou,	2012	344	90,9	8,1	0,9
≤TM24≥98% à TM<90%	Bala, Mayo Oulo,	2013	334	87,7	8,4	3,8
		2014	455	61,6	21,5	16,8
	Dourbeye	2015	171	66,0	23,0	10,9
		Total	1484	80,2	12,9	6,9

N : nombre examiné ; S : sensible ; RP : résistance probable ; R : résistance ; TM24 : taux de mortalité après 24 heures.

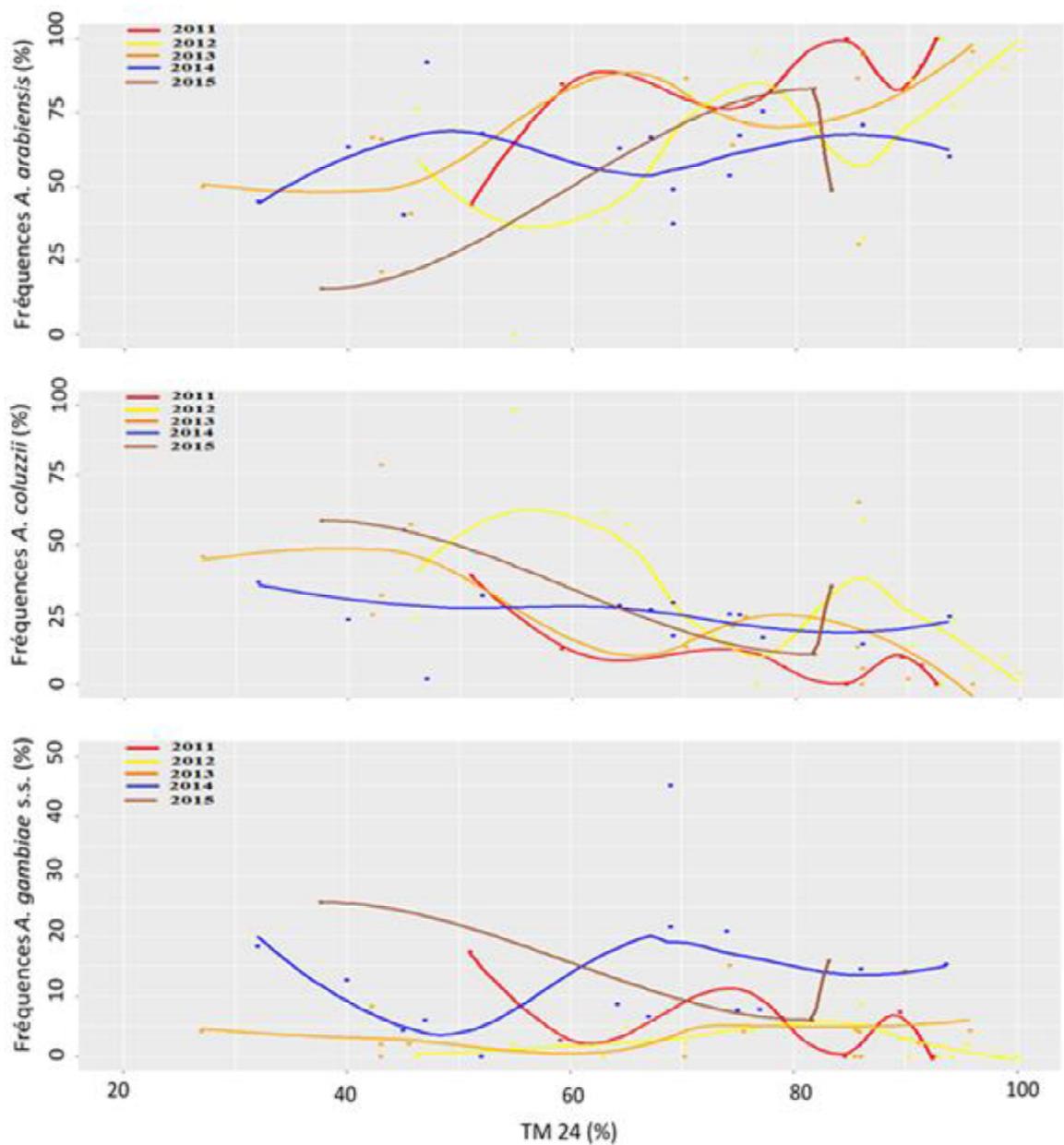


Figure 31 : Variations de la fréquence relative des différentes espèces en fonction des taux de mortalité dans les sites de collecte entre 2011 et 2015. TM 24 : taux de mortalité après 24 heures.

III.1.3 Mécanismes de résistance

Cette partie du travail a consisté à évaluer les mécanismes enzymatiques et les fréquences de la mutation « *kdr* » généralement impliqués dans la résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes.

III.1.3.1 Mécanismes enzymatiques

Afin d'explorer la détoxification enzymatique dans les échantillons de moustiques, nous avons évalué l'effet des synergistes PBO (pipéronyl butoxide) et du DEF (S,S,S-tributylphosphotrithioate) sur les indicateurs de la résistance à la deltaméthrine que sont les temps de « *knockdown* » et les taux de mortalité. En effet, la réversion de la résistance par le synergiste PBO permet de mettre en évidence l'activité des oxydases et celle du DEF l'activité des estérases généralement impliquées dans le métabolisme pyréthrinoïdes.

III.1.3.1.1 Effet du synergiste PBO (pipéronyl butoxide)

Au total 60 tests de sensibilité associant la deltaméthrine au synergiste PBO ont été réalisés sur les échantillons collectés dans 33 sites dont 15 sites du district de santé Garoua, 11 sites du district de santé de Pitoa et sept (7) sites du district de santé de Mayo Oulo. Les temps de « *knockdown* » et les taux de réversion de l'effet « *knockdown* » sont consignés dans le tableau XXV et les taux de mortalité à la figure 32.

A Garoua, l'exposition préalable au PBO a engendré une baisse des Tkd50 à la deltaméthrine sur nos échantillons de moustiques, excepté en 2013 dans l'échantillon d'Ouro Lawane dont le Tkd50 PBO+deltaméthrine a été de 41 minutes contre 36 minutes pour la deltaméthrine seule. Plus spécifiquement, pour les sites où au moins deux séries de tests ont été effectuées, nous avons observé une baisse des Tkd50 dans les échantillons de Kanadi I allant de 46 minutes en 2014 à 31 minutes en 2015, et dans les échantillons de Plateau allant 46 minutes en 2012 à 33 minutes en 2014. Par contre, une augmentation linéaire des Tkd50 a été observée dans les échantillons de Kanadi II et Ouro Housso II allant respectivement de 21 minutes en 2011 à 40 minutes en 2015 et de 29 minutes en 2012 à 39 minutes en 2014. Les taux de réversion de l'effet « *knockdown* » (TrKd50) ont varié entre 14% et 76%, excepté à Ouro Lawane (TrKd50 < 0). Les Tkd95 correspondants ont été pour la majorité des échantillons supérieurs à 60 minutes, suggérant une absence de la détection de l'effet du synergiste PBO sur cette variable.

A Mayo Oulo, l'exposition préalable au PBO a engendré une baisse des Tkd50 à la deltaméthrine sur tous nos échantillons de moustiques. Plus spécifiquement, dans les sites où au moins deux tests avaient été réalisés, nous avons observé une baisse des Tkd50 à Bala et Bossoum ; alors qu'une augmentation a été observée dans les échantillons de Mayo Oulo allant de 17 minutes en 2011 à 18 minutes en 2015, dans ceux de Dourbeye allant de 20 minutes en 2012 à 22 minutes en 2015 et ceux de Doumou allant de 18 minutes en 2014 à 25 minutes en 2015. Les taux de réversion de l'effet « *knockdown* » (TrKd50) ont varié entre 3% et 70%. Les Tkd95 correspondants ont été pour la majorité des échantillons inférieurs à 50 minutes.

A Pitoa, l'exposition préalable au PBO a engendré une baisse des Tkd50 à la deltaméthrine sur nos échantillons de moustiques, excepté à Pene (19 minutes pour le PBO+ deltaméthrine contre 18 minutes pour la deltaméthrine seule) et Boulgou (18 minutes pour le PBO+ deltaméthrine contre 11 minutes pour la deltaméthrine seule). Nous avons observé une augmentation des Tkd50 dans tous les sites où au moins deux séries de tests avaient été effectuées ; cette augmentation a été linéaire, allant de 7 minutes en 2011 à 15 minutes en 2015 dans les échantillons de Be-centre et de 8 minutes en 2011 à 27 minutes en 2015 dans les échantillons de Guizigare. Elle a été également linéaire, allant de 8 minutes en 2012 à 38 minutes en 2015 à Lombou, de 19 minutes en 2012 à 38 minutes en 2015 à Pene, et de 10 minutes en 2012 à 19 minutes en 2015 à Mbolom. Les taux de réversion de l'effet « *knockdown* » (TrKd50) ont varié entre 19 et 58%, excepté à Boulgou en 2014 et Pene en 2012 (TrKd50 < 0). Les Tkd95 correspondants ont également augmenté jusqu'à dépasser les 60 minutes.

Par ailleurs, concernant les taux de mortalité des moustiques, une augmentation significative ($p < 0,05$) a été observée à l'issue des tests de sensibilité avec le PBO, excepté à Lombou et Pene en 2012, Boulgou en 2014 et Be-centre en 2015 dans le district de santé de Pitoa, et en 2011 dans le site Mayo Oulo du district de santé de Mayo Oulo. Lorsque nous comparons les taux de mortalité dans les sites où au moins deux séries de tests ont été effectuées, trois groupes d'échantillons sont mis en évidence par rapport à l'effet synergique du PBO :

- les échantillons pour lesquels les taux de mortalité ont augmenté significativement après exposition préalable au PBO ; c'est le cas de Kanadi I et Bossoum ;

- les échantillons pour lesquels les taux de mortalité ont baissé après exposition préalable au PBO ; c'est le cas d'Ouro Housso II, Plateau, Be-centre, Mbolom, Lombou, Bala, Dourbeye et Doumou ;

- les échantillons pour lesquels les taux de mortalité ont alternativement augmenté puis diminué et vice versa après exposition au PBO ; il s'agit de ceux qui ont montré un effet de synergie du PBO entre 2013 et 2015 et pas en 2011 (Mayo Oulo) et pendant toute l'étude de 2011 à 2015 (Kanadi II et Guizigare).

Dans le district de santé de Garoua, les taux de mortalité étaient généralement inférieurs à 90% matérialisant une réversion partielle de la résistance. Par contre, dans les districts de santé de Mayo Oulo et Pitoa les taux de mortalité à la deltaméthrine ont augmenté de moins de 90% à plus de 90% après exposition préalable au PBO. En effet, le statut des échantillons de moustiques est passé de « résistant » à « résistance probable » et même à « sensible » après

exposition au PBO. Ces résultats suggèrent une très forte implication des oxydases dans la résistance à la deltaméthrine dans ces deux derniers district de santé.

Tableau XXV: Temps de « *knockdown* (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi de la sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% associée au PBO dans les districts de santé de Garoua, Mayo Oulo et Pitoa de 2011 à 2015

Districts	Sites de collecte	Années	N	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	TrKd50 (%)	Statut
Garoua	Kanadi II	2011	86	21 (15-25)	59 (52-71)	62	R
		2012	26	18 (3-28)	55 (40-84)	53	S
		2014	98	32 (29-34)	106 (89-136)	57	R
		2015	38	40 (35-47)	130 (97-215)	56	R
	Kanadi I	2014	93	46 (43-50)	112 (94-145)	60	R
		2015	50	31 (29-34)	68 (60-82)	44	R
	Ouro Houso I	2012	69	22 (20-24)	74 (62-95)	60	RP
	Ouro Houso II	2012	81	29 (21-35)	117 (92-177)	44	R
		2014	63	39 (36-43)	115 (93-156)	57	R
	Plateau	2012	23	46 (39-52)	86 (69-170)	14	R
		2014	68	33 (29-37)	115 (181-869)	49	R
	Ouro Lawane	2013	96	41 (7-80)	1110 (405-3287)	<0	R
	Kollere	2014	39	35 (30-41)	127 (93-216)	75	R
	Djamboutou II	2014	60	19 (15-24)	81 (57-155)	41	RP
	Lainde II	2014	56	21 (18-23)	80 (65-106)	51	R
	Mbilga	2014	100	16 (11-19)	42 (35-63)	47	RP
	Bocki	2015	107	33 (30-36)	134 (107-184)	53	R
	Djamboutou I	2015	36	47 (40-57)	166 (119-334)	50	R
	Lainde I	2015	100	37 (35-43)	187 (144-267)	31	R
	Nassarao	2015	28	29 (23-34)	102 (75-181)	34	R
Ourogarga	2015	53	31 (28-34)	94 (77-123)	76	RP	
Mayo Oulo	Bala	2011	51	38 (26-101)	50 (23-249)	7	S
		2014	70	15 (13-17)	36 (32-43)	46	S
		2015	89	26 (25-28)	61 (55-69)	5	RP
	Bossoum	2011	48	26 (50-35)	41 (31-59)	46	S
		2015	64	17 (16-18)	31 (28-35)	42	S
	Mayo Oulo	2011	78	17 (14-20)	34 (28-52)	50	RP
		2013	66	11 (10-12)	17 (18-23)	58	S
		2014	81	16 (15-18)	45 (40-52)	54	RP
		2015	83	18 (17-19)	34 (31-38)	29	S
	Dourbeye	2012	73	20 (19-21)	32 (30-36)	3	S
		2014	63	15 (11-19)	59 (43-104)	57	RP
		2015	89	22 (17-26)	57 (45-93)	38	RP
	Doumou	2014	81	18 (16-21)	46 (38-62)	61	S
		2015	59	25 (23-27)	61 (53-73)	45	RP
	Maboni	2014	103	24 (20-27)	48 (41-63)	70	RP
	Batoum	2015	34	18 (16-19)	32 (28-39)	35	S
Pitoa	Guizigare	2011	64	8 (3-10)	17 (14-20)	60	S
		2012	67	27 (25-30)	84 (70-107)	40	RP
		2013	55	9 (8-24)	29 (17-45)	57	S

Tableau XXV (suite): Temps de « *knockdown* (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi de la sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% associée au PBO dans les districts de santé de Garoua, Mayo Oulo et Pitoa de 2011 à 2015

	2014	89	14 (3-21)	49 (34-121)	60	RP
	2015	75	27 (23-30)	99 (80-136)	9	R
Be-Centre	2011	68	7 (2-22)	14 (9-21)	59	S
	2012	70	11 (7-15)	42 (28-94)	54	S
	2013	56	15 (13-18)	44 (38-53)	32	RP
	2015	82	15 (12-18)	237 (150-477)	60	R
Mbolom	2012	61	10 (2-18)	35 (20-66)	36	S
	2013	76	15 (13-16)	27 (24-34)	25	S
	2015	64	19 (8-28)	129 (94-257)	58	R
Lombou	2012	90	8 (6-10)	26 (19-42)	54	RP
	2013	93	9 (8-10)	21 (19-24)	47	S
	2015	88	38 (21-62)	171 (86-9254)	18	R
Pene	2012	63	19 (17-20)	60 (51-74)	<0	R
	2015	85	38 (35-39)	71 (65-81)	57	S
Nassarao Be	2013	86	9 (3-13)	23 (20-37)	50	S
Boulgou	2014	86	18 (14-22)	50 (41-70)	<0	RP
Kirambo	2015	72	29 (27-31)	58 (52-65)	19	S
Banaye	2015	22	20 (14-24)	62 (48-100)	52	S
Boussa	2015	80	14 (8-19)	44 (33-74)	51	RP
Boula Ibib	2015	87	16 (14-19)	45 (36-62)	35	S

N : effectif testé ; IC : intervalle de confiance ; RP : résistance probable ; S : sensible ; Del: deltaméthrine ; PBO : pipéronyl butoxide ; TrKd : taux de réversion de l'effet knockdown ; Tkd50 et Tkd95 : temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de la population de moustiques en minutes.

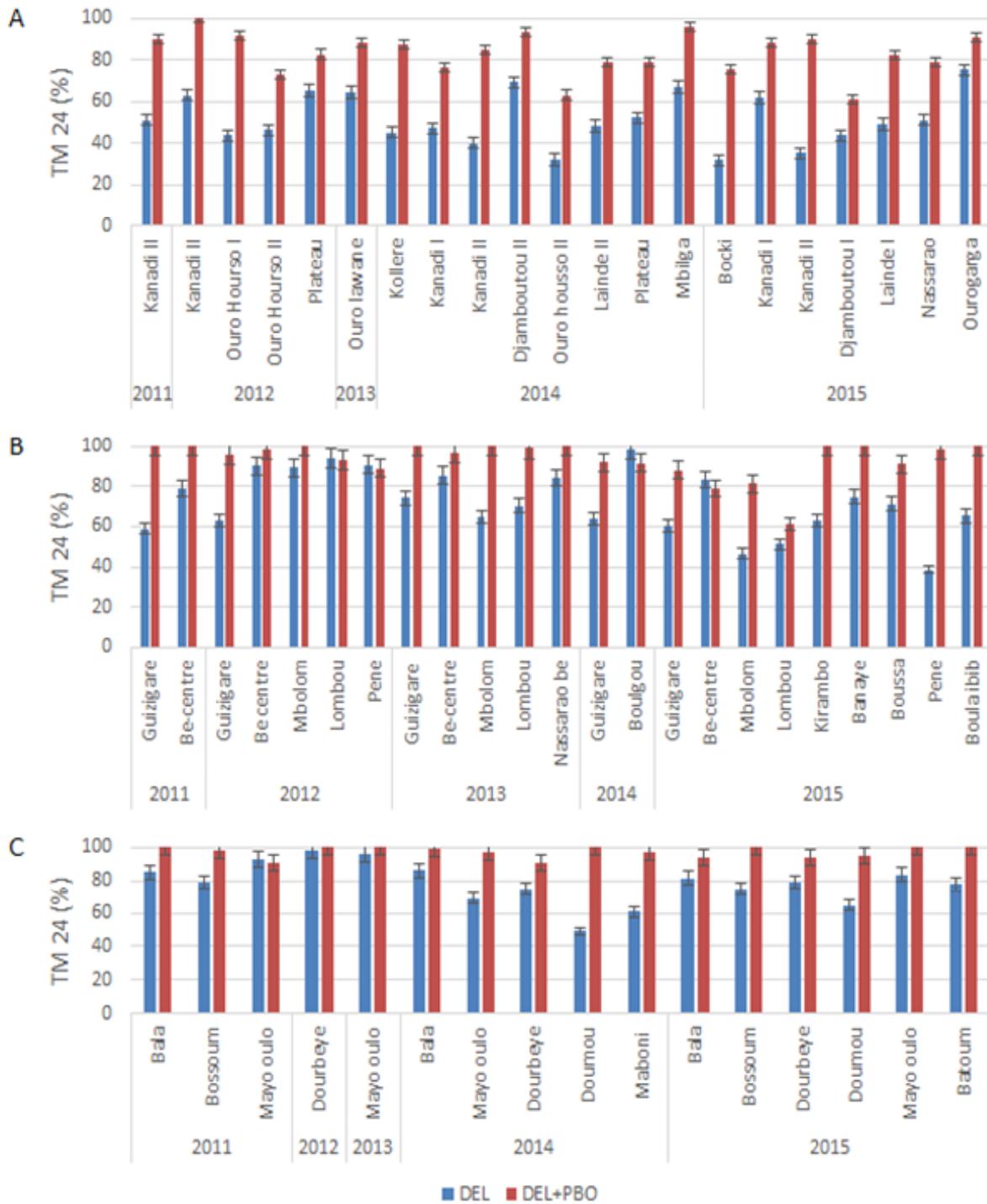


Figure 32 : Taux de mortalité causée par la deltaméthrine associée au synergiste PBO dans les échantillons d'*A. gambiae* s.l. au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015. A : district de santé de Garoua ; B : district de santé de Pitoa ; C : district de santé de Mayo Oulo ; Del : deltaméthrine ; PBO : pipéronyl butoxide ; TM 24 : taux de mortalité après 24 heures.

III.1.3.1.2 Effet du synergiste DEF (S,S,S-tributylphosphotrithioate)

Les échantillons de moustiques utilisés pour les tests de sensibilité associant la deltaméthrine au DEF n'ont été collectés que dans sept sites du district de santé de Garoua et trois sites du district de santé de Pitoa. Dans le district de santé de Mayo Oulo, les tests n'ont pas été effectués pour des raisons d'insuffisance des effectifs de moustiques lors des collectes larvaires. Au total, 15 tests ont été réalisés avec le DEF. Les temps de « *knockdown* » et les taux de réversion de l'effet « *knockdown* » sont consignés dans le tableau XXVI, et les taux de mortalité sur la figure 33.

Dans l'ensemble, l'exposition préalable des moustiques au DEF a engendré une baisse des Tkd50 à la deltaméthrine, excepté à Kanadi II en 2011 dont le Tkd50 DEF+deltaméthrine a été de 59 minutes contre 55 minutes pour la deltaméthrine seule (59 minutes contre 55 minutes), Ourolawane en 2013 (43 minutes contre 36 minutes), Lainde II (43 minutes contre 42 minutes) et Guizigare (72 minutes contre 29 minutes). Cependant, pour les sites où au moins deux séries de tests ont été effectuées, nous avons observé une baisse des Tkd50 dans les échantillons de Kanadi II, allant de 59 minutes en 2011 à 52 minutes en 2014. Par contre, une augmentation linéaire des temps de « *knockdown* » (Tkd50) a été observée, allant de 12 minutes en 2011 à 72 minutes en 2015 à Guizigare, et de 16 minutes en 2012 à 39 minutes en 2015 à Lombou. Les taux de réversion de l'effet « *knockdown* » (TrKd50) ont varié entre 8% et 59%, excepté à Guizigare et Ouro Lawane en 2015, Kandi II en 2011 et Lainde II en 2014 (TrKd50 < 0), suggérant aucune détection de l'effet du synergiste DEF dans les échantillons testés ; les Tkd95 correspondants ont été pour la majorité des échantillons supérieurs à 60 minutes. Par rapport aux taux de mortalité, trois groupes d'échantillons ont été mis en évidence :

- les échantillons pour lesquels les taux de mortalité ont augmenté significativement après exposition préalable au DEF ; c'est le cas de Kanadi II, Ouro Housso I, Lainde I et II, Bocki et Be-Centre, dont le statut de la résistance chez certains a changé de « résistant » à « résistance probable ». Pour les autres tests, le statut de la résistance est resté inchangé ; bien que les taux de mortalité à la deltaméthrine aient augmenté après l'exposition au DEF, ils sont restés inférieurs à 90% ;

- les échantillons pour lesquels les taux de mortalité n'ont pas significativement changé après exposition préalable au DEF ; il s'agit de ceux d'Ouro Lawane et de Mbilga qui sont demeurés résistants à la deltaméthrine ;

- les échantillons pour lesquels les taux de mortalité ont alternativement augmenté puis diminué après exposition au DEF ; il s'agit de ceux qui ont montré un effet de synergie du DEF

en 2011 (Guizigare) et 2013 (Lombou) et pas en 2012 (Lombou), et enfin un effet antagoniste en 2015 (Guizigare et Lombou). Ces résultats suggèrent une forte variabilité de l'implication des estérases dans la résistance en fonction des populations de moustiques et du temps.

Tableau XXVI: Temps de « *knockdown* (Tkd50, Tkd95) » en minutes et suivi de la sensibilité des échantillons d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05% associée au DEF dans les districts de Santé de Garoua et Pitoa de 2011 à 2015

Districts	Sites de collecte	Années	N	Tkd50 (IC)	Tkd95 (IC)	TrKd50 (%)	Statut
Garoua	Kanadi II	2011	20	59 (47-24854)	151 (88-728682)	<0	R
		2014	14	52 (45-69)	109 (78-278)	30	R
	Ouro Housso I	2012	37	36 (25-45)	203 (123-689)	34	R
	Mbilga	2013	57	23 (8-33)	59 (49-74)	8	R
	Ouro Lawane	2013	105	43 (24-79)	249 (59-1050)	<0	R
	Lainde II	2014	25	43 (37-52)	123 (89-223)	<0	R
	Bocki	2015	14	44 (36-59)	131 (86-368)	37	R
	Laindé I	2015	13	41 (33-5)	136 (85-464)	26	R
Pitoa	Guizigare	2011	48	12 (9-14)	25 (22-32)	40	S
		2013	63	13 (3-30)	54 (11-76)	38	R
		2015	88	72 (60-96)	342 (203-951)	<0	R
	Be-Centre	2011	86	7 (4-9)	25 (19-42)	59	RP
	Lombou	2012	77	16 (3-27)	57 (11-76)	38	R
		2013	72	18 (7-13)	31 (27-38)	35	R
		2015	88	39 (32-48)	101 (73-206)	15	R

N : effectif testé ; IC : intervalle de confiance ; RP : résistance probable ; S : sensible ; Del: deltaméthrine ; DEF : S,S,S-tributylphosphotrithioate ; TrKd : taux de réversion de l'effet knockdown ; tkd50 et tkd95 : temps nécessaires pour assommer 50% et 95% de la population de moustiques en minutes.

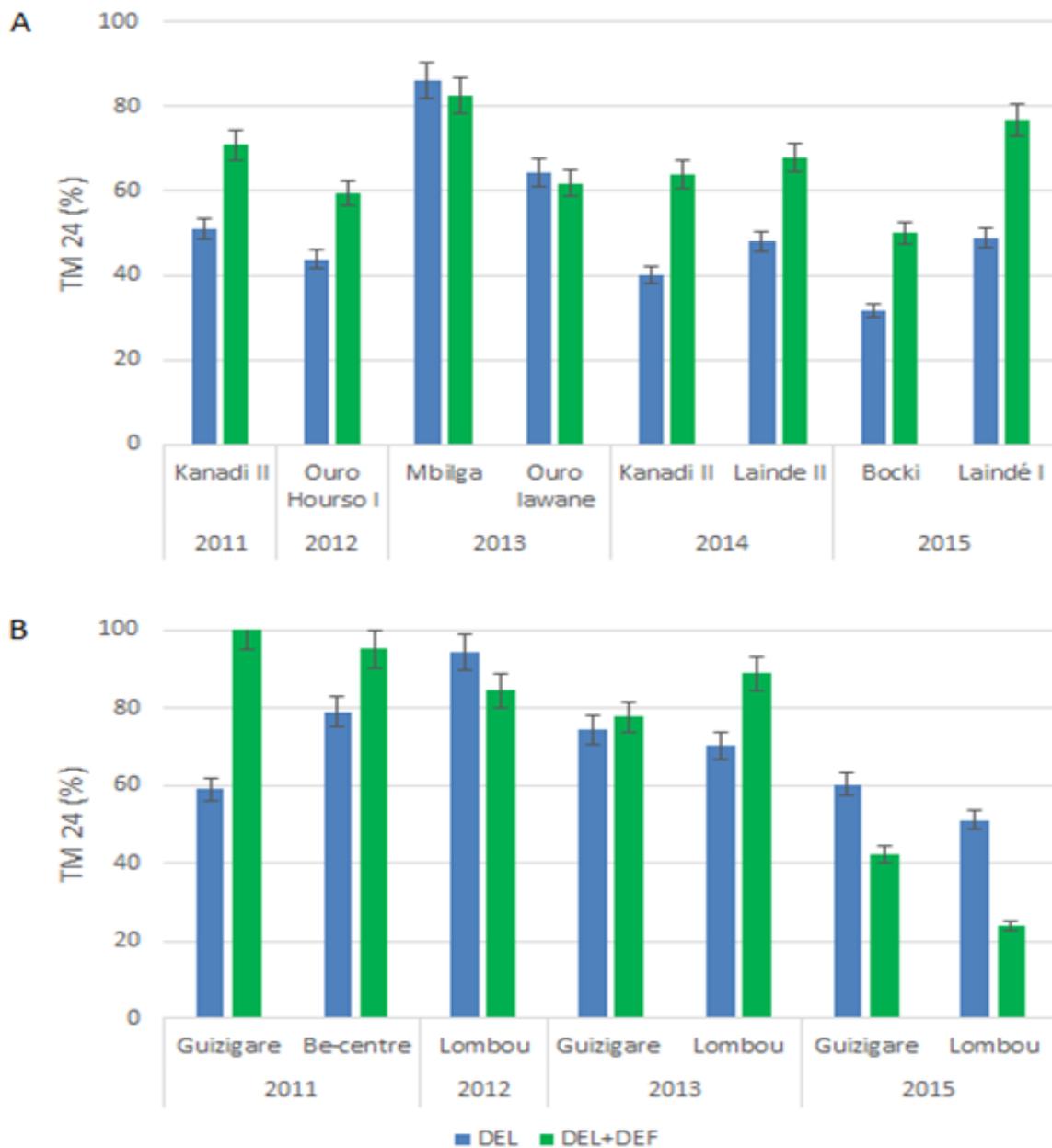


Figure 33 : Taux de mortalité causée par la deltaméthrine associée au synergiste DEF dans les échantillons d'*A. gambiae* s.l. au Nord-Cameroun entre 2011 et 2015. A : district de santé de Garoua ; B : district de santé de Pitoa ; Del : deltaméthrine ; PBO : pipéronyl butoxide ; TM 24 : taux de mortalité après 24 heures.

III.1.3.2 Mutations au locus « kdr »

La détection des mutations au locus 995 du gène « kdr » a été effectuée sur 1850 femelles d'*A. gambiae* s.l. préalablement soumises à l'identification des espèces. Les spécimens analysés sont issus des échantillons de moustiques collectés dans 13 sites des trois districts de santé. Pour chacune des trois espèces en présence, les fréquences des allèles « kdr » sauvage/sensible (995L) et mutants /résistants (995F et 995S) ont été présentées par site (tableaux XXVII, XXVIII et XXIX) ; en effet, les deux allèles résistants ont été retrouvés avec l'allèle sensible dans les échantillons d'*A. arabiensis* et *A. coluzzii*. Chez *A. gambiae* s.s., seul l'allèle résistant (995F) et l'allèle sensible ont été observés.

III.1.3.2.1 Fréquences relatives des allèles « kdr » 995F et 995S chez *A. arabiensis*,

A. coluzzii et *A. gambiae* s.s.

Au total, 1850 spécimens d'*A. gambiae* s.l. ont été analysés, soient 1245 spécimens d'*A. arabiensis*, 468 spécimens d'*A. coluzzii* et 137 spécimens d'*A. gambiae* s.s..

Chez *A. arabiensis*, l'allèle résistant 995F a présenté une large distribution géographique, avec des fréquences variables d'un site à l'autre et d'une année à l'autre. Les fréquences les plus élevées ont été observées en 2014 dans les échantillons d'Ouro Houso II (81%) du district de santé de Garoua et Guizigare (75%) du district de santé de Pitoa. Par contre, cet allèle a été absent entre 2011 et 2012, dans les échantillons de cinq sites répartis dans les trois districts de santé, y compris dans l'échantillon de Guizigare où la fréquence a considérablement augmenté en 2014. L'allèle 995S n'a été identifié que dans les échantillons de Kanadi II du district de santé de Garoua en 2013 à une fréquence de 4%, en plus de l'allèle 995F (tableau XXVII). En effet, au cours de cette étude, les fréquences de l'allèle résistant 995F ont significativement augmenté dans les sites des trois districts de santé, allant de moins de 40% à 40-60% dans le district de santé de Garoua, de moins 10% à 10-15% dans le district de santé de Mayo Oulo et de moins 16% à 28-75% dans le district de santé de Pitoa. Toutefois, avec les échantillons de Be-Centre dans le district de santé de Pitoa, la fréquence de l'allèle 995F est restée inférieure ou égale à 5% tout au long des quatre années de suivi (tableau XXVII).

Dans les échantillons d'*A. coluzzii*, les fréquences des allèles 995F et 995S du gène « kdr » sont présentées dans le tableau XXVIII ; parmi les deux allèles résistants identifiés, l'allèle 995F a présenté une distribution géographique plus étendue dans les trois districts de santé. Cet allèle qui n'a pourtant pas été observé dans l'échantillon de Dourbeye du district de santé de Mayo Oulo en 2012 est apparu dans ledit échantillon en 2014 avec une fréquence de

100%. Cependant, sa présence a été relevée régulièrement dans tous les autres échantillons à des fréquences variant entre 16% et 90%. L'allèle 995S n'a été identifié que dans les échantillons de Mayo Oulo en 2014 du district de santé de Mayo Oulo, à une fréquence de 6%, en plus de l'allèle 995F dont la fréquence a été de 81%. D'importantes fluctuations annuelles des fréquences alléliques ont également été relevées dans les échantillons analysés.

Chez *A. gambiae* s.s., contrairement aux deux précédentes espèces (*A. arabiensis* et *A. coluzzii*), seul l'allèle 995F a été identifié dans les 12 échantillons d'*A. gambiae* s.l. collectés dans les trois districts de santé (tableau XXIX) ; cependant, sur les 29 échantillons testés, son absence a été notée dans cinq, à savoir ceux de Kollere en 2012 et de Djamboutou en 2013 dans le district de santé DS de Garoua, ceux de Be-Centre, de Lombou et de Guizigare en 2011 dans le district de santé de Pitoa. Dans les échantillons collectés en 2014 au niveau des cinq sites sus-cités, l'allèle « kdr » 995F est apparu avec des fréquences pouvant atteindre 100% ; les fréquences les plus élevées ont été observées dans les échantillons des districts de santé de Garoua et Mayo Oulo.

III.1.3.2.2 Conformité des populations d'*A. arabiensis*, d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae* s.s. à l'équilibre de Hardy-Weinberg

La conformité des populations de moustiques à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifiée sur les mêmes spécimens (N=1850) soumis à la détection des mutations au locus 995 du gène « kdr ». Les résultats de ces analyses ont été présentés dans les mêmes tableaux que ceux des fréquences relatives des allèles « kdr » 995F et 995S (tableaux XXVII, XXVIII et XXIX).

Chez *A. arabiensis*, parmi les 13 lots de populations de moustiques analysés, un excès non significatif ($p > 0,05$) d'hétérozygotes (caractérisé par des valeurs de Fis négatives) n'a été observé qu'à Ouro Housso II (district de santé de Garoua) en 2013 et Lombou (district de santé de Pitoa) en 2012, traduisant ainsi une conformité de ces échantillons à l'équilibre de Hardy-Weinberg (tableau XXVII). Tous les autres échantillons ont montré un déficit d'hétérozygotes caractérisé par des valeurs de Fis positives ; d'un lot de moustiques à l'autre, ce déficit était significatif ($p < 0,05$) ou non significatif ($p > 0,05$) selon les périodes de collecte des échantillons. Ces valeurs de Fis significatives ($p < 0,05$) suggèrent une déviation de la plupart des populations d'*A. arabiensis* à l'équilibre de Hardy-Weinberg, quel que soit le district de santé ou le site de collecte.

Chez *A. coluzzii*, 15 des 37 échantillons analysés ont présenté un excès non significatif ($p > 0,05$) d'hétérozygotes caractérisé par des valeurs de Fis négatives, traduisant ainsi leur conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg (tableau XXVIII) ; la majorité de ces échantillons

ont été collectés dans le district de santé de Garoua. Seul l'échantillon de Mbilga en 2014 a montré un déficit significatif ($p < 0,05$) d'hétérozygotes suggérant une déviation de cette population par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Tableau XXVII : Fréquences relatives des allèles « kdr » 995F et 995S et conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg dans les populations d'*A. arabiensis*

Districts	Années	Sites de collecte	Fréquences relatives des allèles « kdr » (%)				Fis	p(HW)
			NA	995L (S)	995F (Rw)	995S (Re)		
GAR	2011	Kanadi II	20	62,50	37,50	0	+0,8980	0,0000
		Djamboutou II	34	100	0	0	ND	-
	2012	Ouro Housso II	35	77,14	22,86	0	+0,6840	0,0002
		Djamboutou II	32	90,63	9,38	0	+0,2790	0,9882
		Kanadi I	11	81,82	18,18	0	+1,0000	0,0067
		Mbilga	40	96,25	3,75	0	+0,6610	0,0377
		Oourogarga	43	100	0	0	ND	-
	2013	Kanadi II	23	84,78	13,04	2,17	+0,84170	0,0001
		Djamboutou II	24	97,92	2,08	0	ND	-
		Ouro Housso II	19	76,32	23,68	0	-0,28570	0,2902
		Oourogarga	34	75,00	25,00	0	+0,1519	0,9111
		Kollere	11	90,91	9,09	0	+1,1000	0,0472
		Mbilga	24	87,50	12,50	0	+1,0435	0,0001
	2014	Kanadi II	28	39,29	60,71	0	+0,2683	0,2325
		Djamboutou II	14	57,14	42,86	0	+0,7263	0,0092
		Ouro Housso II	16	18,75	81,25	0	+0,2105	0,4324
Oourogarga		42	45,24	54,76	0	+0,3379	0,0359	
Kollere		9	55,56	44,44	0	+0,5897	0,1715	
Mbilga		30	56,67	43,33	0	+0,3364	0,9878	
MAY	2011	Mayo Oulo	50	100	0	0	ND	-
		Bala	40	100	0	0	ND	-
	2012	Mayo Oulo	43	89,53	10,47	0	+0,1050	0,6265
		Bala	43	90,70	9,30	0	+0,1841	0,9697
		Dourbeye	40	90,00	10,00	0	+0,1790	0,9674
	2013	Mayo Oulo	45	100	0	0	ND	-
		Bala	41	95,12	4,88	0	+0,0394	0,9242
		Dourbeye	46	98,91	1,09	0	ND	-
	2014	Mayo Oulo	15	90,00	10,00	0	+0,6500	0,1039
Bala		34	85,29	14,71	0	+0,5417	0,0106	
Dourbeye		24	85,42	14,58	0	+0,8392	0,0014	
PIT	2011	Lombou	39	97,44	2,56	0	+1,0000	0,0123
		Be-Centre	41	95,12	4,88	0	+1,0000	0,0004
		Guizigare	33	100	0	0	ND	-
	2012	Lombou	23	84,78	15,22	0	-0,1580	0,5832
		Be-Centre	30	96,67	3,33	0	+1,0000	0,0167
		Guizigare	15	100	0	0	ND	-
	2013	Lombou	30	98,33	1,67	0	ND	-
		Be-Centre	38	96,05	3,95	0	+0,6753	0,0407
		Guizigare	23	97,83	2,17	0	ND	-
	2014	Lombou	23	71,74	28,26	0	+0,2701	0,9650
Be-Centre		20	95,00	5,00	0	+1,0000	0,0251	
Guizigare		20	25,00	75,00	0	+0,2245	0,5417	

NA : nombre d'individus examinés appartenant à l'espèce *A. arabiensis* ; 995L (S) : allèle « kdr » sensible ; 995F (Rw) : allèle résistant « kdr » Ouest ; 995S (Re) : allèle résistant « kdr » Est ; ND : non déterminé ; p(HW) : probabilité exacte du test de conformité de Hardy-Weinberg ; lorsque l'échantillon n'est pas en équilibre, p(HW) < 0,05 (en gras) ; GAR : district de santé de Garoua ; MAY : district de santé de Mayo Oulo ; PIT : district de santé de Pitoa.

Tableau XXVIII : Fréquences relatives des allèles « kdr » 995F et 995S et conformité à l'équilibre de Hardy- Weinberg dans les populations d'*A. coluzzii*

Districts	Années	Sites de collecte	Fréquences relatives des allèles « kdr » (%)				Fis	p(HW)
			N _C	995L (S)	995F (Rw)	995S (Re)		
GAR	2011	Kanadi II	18	38,89	61,11	0	+0,0930	1,0000
		Djamboutou II	4	12,50	87,50	0	ND	-
	2012	Ouro HoussoII	12	54,17	45,83	0	+0,2029	0,9059
		Djamboutou II	5	50,00	50,00	0	-0,0909	0,7656
		Kanadi I	25	36,00	64,00	0	-0,3714	0,0756
		Kollere	43	62,79	37,21	0	+0,4126	0,9991
		Mbilga	3	50,00	50,00	0	-1,0000	0,3974
	2013	Kanadi II	22	11,36	88,64	0	-0,1053	1,0000
		Djamboutou II	13	50,00	50,00	0	+0,2683	0,9418
		Ouro Housso II	27	24,07	75,93	0	-0,3000	0,2850
		Ourogarga	11	13,64	86,36	0	-0,1111	1,0000
		Kollere	36	25,00	75,00	0	-0,1715	0,4027
		Mbilga	2	0	100	0	ND	-
	2014	Kanadi II	10	50,00	50,00	0	+0,2500	0,9291
		Djamboutou II	12	37,50	62,50	0	+0,5000	0,2018
		Ouro Housso II	16	34,38	65,63	0	+0,0625	1,0000
		Ourogarga	12	33,33	66,67	0	-0,0820	0,6556
Kollere		21	26,19	73,81	0	-0,0843	1,0000	
Mbilga		20	70,00	30,00	0	+0,7725	0,0012	
MAY	2012	Bala	2	0	100	0	ND	-
		Dourbeye	5	100	0	0	ND	-
	2013	Bala	1	0	100	0	ND	-
	2014	Bala	8	6,25	93,75	0	ND	-
		Mayo Oulo	8	12,50	81,25	6,25	+0,2821	0,2063
		Dourbeye	12	0	100	0	ND	-
PIT	2011	Lombou	3	33,33	66,67	0	-0,3330	1,0000
		Be-Centre	3	66,67	33,33	0	+1,0000	0,2042
		Guizigare	5	40,00	60,00	0	+0,2730	1,0000
	2012	Lombou	7	14,29	85,71	0	+1,0000	0,0783
		Be-Centre	7	42,86	57,14	0	+0,4783	0,4402
		Guizigare	28	21,43	78,57	0	+0,3793	0,0745
	2013	Lombou	7	14,29	85,71	0	-0,0909	1,0000
		Be-Centre	5	20,00	80,00	0	-0,1429	1,0000
		Guizigare	9	33,33	66,67	0	+0,0588	1,0000
	2014	Lombou	18	27,78	72,22	0	-0,0794	1,0000
		Be-Centre	16	28,13	71,88	0	-0,0500	1,0000
		Guizigare	12	83,33	16,67	0	-0,1579	0,7470

NC : nombre d'individus examinés appartenant à l'espèce *A. coluzzii* ; 995L (S) : allèle « kdr » sensible ; 995F (Rw) : allèle résistant « kdr » Ouest ; 995S (Re) : allèle résistant « kdr » Est ; ND : non déterminé ; p(HW) : probabilité exacte du test de conformité de Hardy-Weinberg ; lorsque l'échantillon n'est pas en équilibre, p(HW) < 0,05 (en gras) ; GAR : district de santé de Garoua ; MAY : district de santé de Mayo Oulo ; PIT : district de santé de Pitoa.

Tableau XXIX : Fréquences relatives des allèles « kdr » 995F et 995S et conformité à l'équilibre de Hardy- Weinberg dans les populations d'*A. gambiae* s.s.

Districts	Année	Sites de collecte	Fréquences relatives des allèles « kdr » (%)				Fis	p(HW)
			N _s	995L (S)	995F (Rw)	995S (Re)		
GAR	2011	Kanadi II	8	43,75	56,25	0	-0,2070	1,0000
		Djamboutou II	3	83,33	16,67	0	ND	-
	2012	Djamboutou II	1	50,00	50,00	0	ND	-
		Kanadi I	4	25,00	75,00	0	-0,2000	1,0000
		Kollere	1	100	0	0	ND	-
	2013	Ourogarga	2	25,00	75,00	0	ND	-
		Kanadi II	2	75,00	25,00	0	ND	-
		Djamboutou II	1	100	0	0	ND	-
	2014	Ouro Houso II	1	0	100	0	ND	-
		Ourogarga	2	25,00	75,00	0	ND	-
		Kanadi II	5	30,00	70,00	0	+0,6000	0,3353
		Djamboutou II	9	33,33	66,67	0	+0,0588	1,0000
		Ouro Houso II	8	6,25	93,75	0	ND	-
		Ourogarga	3	66,67	33,33	0	-0,3333	0,7958
			Kollere	2	0	100	0	ND
		Mbilga	5	60,00	40,00	0	+1,0000	0,0479
MAY	2013	Mayo Oulo	2	0	100	0	ND	-
		Bala	7	0	100	0	ND	-
		Dourbeye	2	0	100	0	ND	-
	2014	Mayo Oulo	21	14,29	85,71	0	+0,2453	0,3394
		Bala	8	0	100	0	ND	-
		Dourbeye	4	0	100	0	ND	-
PIT	2011	Lombou	1	100	0	0	ND	-
		Be-Centre	3	100	0	0	ND	-
		Guizigare	1	100	0	0	ND	-
	2013	Guizigare	8	18,75	81,25	0	-0,1667	1,0000
	2014	Guizigare	4	62,50	37,50	0	+0,5714	0,4413
		Lombou	7	57,14	42,86	0	+0,4783	0,4402
		Be-Centre	12	20,83	79,17	0	+0,2826	0,4094

NS : nombre d'individus examinés appartenant à l'espèce *A. gambiae* s.s.; 995L (S) : allèle « kdr » sensible ; 995F (Rw) : allèle résistant « kdr » Ouest ; 995S (Re) : allèle résistant « kdr » Est ; ND : non déterminé ; p(HW) : probabilité exacte du test de conformité de Hardy-Weinberg ; lorsque l'échantillon n'est pas en équilibre, p(HW) < 0,05 (en gras) ; GAR : district de santé de Garoua ; MAY : district de santé de Mayo Oulo ; PIT : district de santé de Pitoa.

Dans le district de santé de Pitoa, en dehors des échantillons collectés à Lombou, ceux de Be-Centre et Guizigare ont montré une variation des valeurs de Fis partant d'un déficit non significatif d'hétérozygotes entre 2011 et 2012 à un excès non significatif d'hétérozygotes ($p > 0,05$) en 2014 ; un excès non significatif ($p > 0,05$) d'hétérozygotes a plutôt été observé dans tous les échantillons de Lombou. En effet, toutes les populations de Pitoa sont restées en conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg pendant toute la période d'étude. À Mayo Oulo (district de santé de Mayo Oulo) où les deux allèles « kdr » 995F et 995S ont été retrouvés, l'échantillon collecté en 2014 a montré un déficit non significatif ($p > 0,05$) d'hétérozygotes, traduisant également la conformité de cette population à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Dans les échantillons d'*A. gambiae* s.s., le test de conformité de Hardy-Weinberg a montré un excès non significatif ($p > 0,05$) d'hétérozygotes dans quatre échantillons et un déficit non significatif ($p > 0,05$) d'hétérozygotes dans six échantillons sans distinction de district de santé ; les valeurs de Fis correspondantes traduisent la conformité des populations étudiées par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (tableau XXIX). Cependant, l'échantillon collecté à Mbilga en 2014 (district de santé de Garoua) a montré un déficit significatif ($p < 0,05$) en hétérozygotes, suggérant une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

De façon générale, neuf populations d'*A. arabiensis* sur les 13 analysées ont présenté une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Par contre, la plupart des populations d'*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. ont montré un excès ou un déficit non significatif en hétérozygotes, suggérant une conformité par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, exception faite des échantillons de Mbilga dans le district de santé de Garoua en 2014 où nous avons observé une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

L'analyse des fréquences de l'allèle résistant 995F et des valeurs de Fis entre les trois espèces du complexe *A. gambiae* a montré que les fréquences les plus faibles de cet allèle de résistance ont été enregistrées chez *A. arabiensis* par rapport aux deux autres espèces (*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s.). Par ailleurs, ces faibles fréquences de l'allèle « kdr » 995F étaient généralement accompagnées par un déficit significatif en hétérozygotes dans près de la moitié des échantillons analysés, suggérant une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Par contre, dans la majorité des échantillons d'*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. où les fréquences de l'allèle « kdr » 995F étaient les plus élevées, le déficit ou l'excès n'étaient pas significatifs ; les populations en question étaient donc en équilibre de Hardy-Weinberg.

III.1.3.3 Synthèse des facteurs associés à la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05%

L'analyse multifactorielle des taux de mortalité d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine, la distribution des espèces (*A. arabiensis*, *A. coluzzii*, *A. gambiae* s.s.) et les fréquences de l'allèle 995F du gène « kdr » au cours des cinq années d'étude de 2011 à 2015 a été réalisée sur les données issues de 13 sites d'étude, où les trois ensembles de données étaient disponibles. Les résultats de cette analyse sont présentés aux figures 34 et 35. La carte des facteurs individuels montre une relation entre les sites ; le cercle de corrélation indique la corrélation entre les sites et les différentes variables (distribution des espèces, les fréquences alléliques, les taux de mortalité et année de collecte des moustiques).

En effet, les sites d'un même district de santé étaient plus proches les uns des autres et très distincts de ceux qui appartenaient aux autres districts de santé (figure 34).

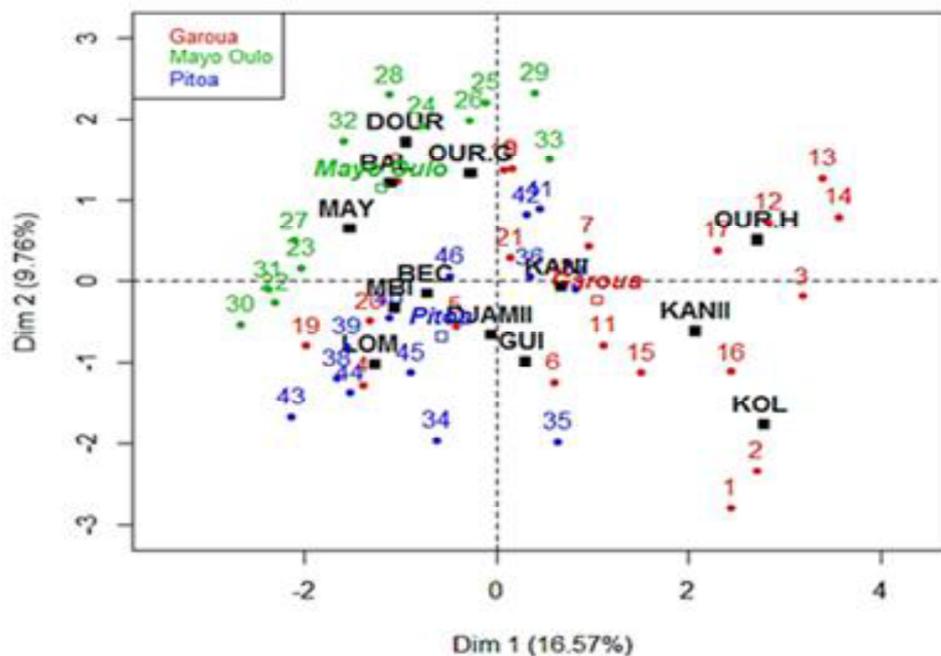


Figure 34 : Carte des facteurs individuels montrant les interactions entre les sites en fonction des districts de santé sur les deux premières composantes principales [Dim 1 (16,57%) et Dim 2 (9,76%)] de l'analyse multifactorielle. District de santé de Garoua : OUR.G (Ourogarga), MBI (Mbilga), DJAM II (Djamboutou II), KOL (Kolléré), KAN I (Kanadi I), KAN II (Kanadi II), OUR.H (Ouro Housso II) ; district de santé de Pitoa : LOM (Lombou), BEC (Be-centre), GUI (Guizigare) ; district de santé de Mayo Oulo : DOUR (Dourbeye), BAL (Bala), MAY (Mayo Oulo).

Le cercle de corrélation (figure 35) a montré une forte corrélation linéaire positive entre les taux de mortalité (TM24) et la présence d'*A. arabiensis*. Inversement, nous avons observé une forte corrélation négative entre les taux de mortalité (TM24) et la présence d'*A. coluzzii*, suivie d'une faible corrélation négative entre les taux de mortalité (TM24) et la présence d'*A. gambiae* s.s.. Une corrélation négative a été également observée entre les taux de mortalité (TM24) et les fréquences de l'allèle 995F du gène « kdr », chez *A. coluzzii* (Col995F) et *A. arabiensis* (Ara995F), avec une corrélation négative plus faible entre les taux de mortalité (TM24) et les fréquences de l'allèle 995F du gène « kdr » chez *A. gambiae* s.s. (Gab 995F). En plus, nous avons observé une faible corrélation négative entre les taux de mortalité (TM24) et les années de collecte des échantillons de moustiques testés. Les fréquences de l'allèle « kdr » 995F chez *A. coluzzii* (Col995F), les proportions d'*A. gambiae* s.s. (per.gamb) et les fréquences de l'allèle « kdr » 995F chez *A. arabiensis* (Ara995F) ont moins contribué à la construction des deux premiers plans [Dim 1 (16,57%) et Dim 2 (9,76%)].

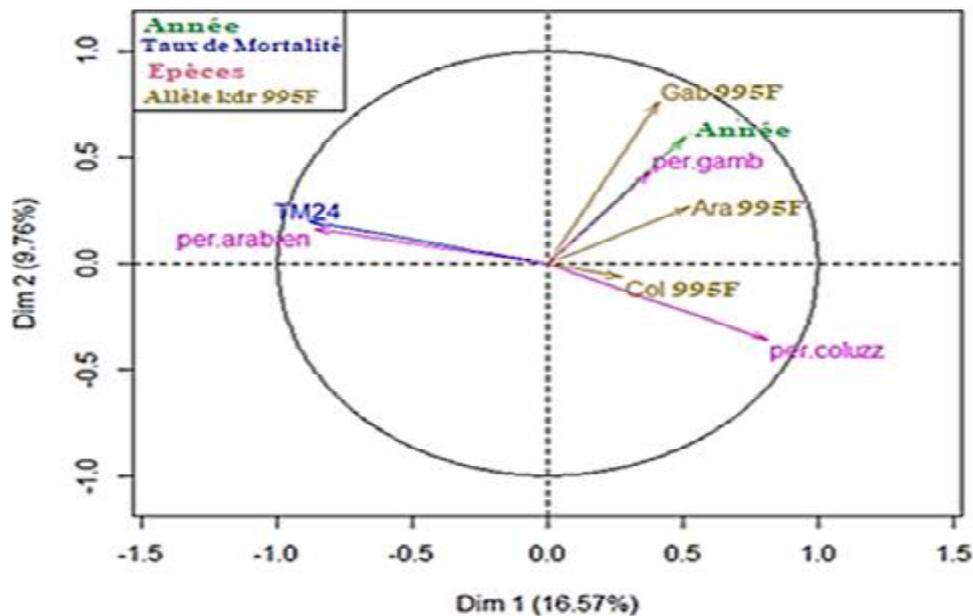


Figure 35 : Cercle de corrélation pour le suivi des données quantitatives (taux de mortalité, allèle « kdr » 995F, composition des espèces et année) sur les deux premières composantes principales [Dim 1 (16,57%) et Dim 2 (9,76%)] de l'analyse multifactorielle. L'analyse de l'ensemble des données pendant les 5 années a été effectuée dans les sites où ces données étaient disponibles. TM24 : taux de mortalité après 24 heures ; per.arabien : pourcentage de l'espèce *A. arabiensis* ; per.coluzz : pourcentage de l'espèce *A. coluzzii* ; per.gamb : pourcentage de l'espèce *A. gambiae* s.s. ; Col995F : fréquences de l'allèle « kdr » 995F chez *A. coluzzii* ; Ara995F : fréquences de l'allèle « kdr » 995F chez *A. arabiensis* ; Gab995F : fréquences de l'allèle « kdr » 995F chez *A. gambiae* s.s.

III.2 Discussions

III.2.1 Etude taxinomique d'*A. gambiae* s.l.

Les analyses moléculaires nous ont permis d'identifier trois espèces du complexe *A. gambiae* au sein des échantillons analysés, notamment *A. coluzzii*, *A. gambiae* s.s. et *A. arabiensis*. Les deux premières espèces citées ont une large répartition à-travers le pays, alors que la troisième est confinée dans les zones tropicales de la partie septentrionale du pays (Simard *et al.*, 2009).

Les observations morphologiques effectuées sur les ailes de moustiques (femelles et mâles) nous ont permis de noter 28 variants sur les nervures des ailes des moustiques examinés. Parmi ces variants, seulement une quinzaine avaient déjà été signalées dans les travaux antérieurs (Holstein, 1954 ; Coluzzi, 1964 ; Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987). Chez les femelles, les variants Var₃ et Var₁₃ ont été spécifiques à *A. coluzzii*, Var₆ et Var₂₁ à *A. arabiensis*. Chez les mâles, les variants Var₁, Var₇ et Var₁₁ sont spécifiques à *A. coluzzii*, Var₆, Var₁₀, Var₁₂ et Var₂₁ à *A. arabiensis*. Chez les femelles et les mâles, les fréquences de ces variants ont été inférieures à 5%, excepté le variant Var₁₂ chez les mâles dont la fréquence a été de 16%. La faible proportion des spécimens présentant ces variants montre que les différents caractères ne sont pas dominants et par conséquent ne peuvent pas être utilisés comme des éléments spécifiques pour l'identification morphologique de ces espèces.

L'étude du polymorphisme alaire a montré que, sur les 31 morphotypes observés chez les femelles, trois ont été spécifiques à *A. arabiensis* (Mor₁, Mor₂ et Mor₃), avec des fréquences inférieures à 2%. Neuf morphotypes ont été spécifiques à *A. coluzzii* (Mor₁₄, Mor₁₅, Mor₁₆, Mor₁₇, Mor₁₈, Mor₁₉, Mor₂₀, Mor₂₁ et Mor₂₂) et quatre spécifiques à *A. gambiae* s.s. (Mor₂₃, Mor₂₄, Mor₂₅ et Mor₂₆), avec des fréquences inférieures à 10%. Cependant, le morphotype Mor₃₀ observé chez les trois espèces a été majoritaire avec des fréquences comprises entre 15% et 37% ; ce résultat suggère que les espèces identifiées partagent encore entre elles plusieurs traits phénétiques. Toutefois, la proportion assez élevée de morphotypes spécifiques à *A. coluzzii* (n= 9/24) montre qu'il existe au sein de cette espèce diverses variations intraspécifiques. Chez les mâles, neuf morphotypes ont été retrouvés chez *A. arabiensis* (Mor₃₂, Mor₃₃, Mor₃₄, Mor₃₅, Mor₃₆, Mor₃₇, Mor₂₉, Mor₃₀ et Mor₂₃), avec des fréquences inférieures à 12%. Huit des 15 morphotypes ont été observés chez *A. coluzzii* (Mor₄₃, Mor₄₄, Mor₄₅, Mor₄₆, Mor₄₇, Mor₄₈, Mor₄₉ et Mor₅₀), avec des fréquences inférieures à 4%, excepté le morphotype Mor₄₃ dont la fréquence relative a été de 21%. Le morphotype Mor₅₂ dont la fréquence a été de moins de 8% a été retrouvé chez *A. gambiae* s.s.. En effet, la fréquence élevée du morphotype Mor₄₃ chez les mâles d'*A.*

coluzzii montre que des processus de spéciation sont en cours dans les populations de cette espèce. De plus, le morphotype Mor₄₁ a été majoritaire (16%) chez *A. arabiensis*, alors que chez *A. coluzzii*, il a été retrouvé à des fréquences faibles (3%).

Les valeurs obtenues sur la longueur des ailes ont été de 3 mm chez les femelles et entre 2,8 mm et 2,9 mm chez mes mâles ; ces valeurs sont caractéristiques de l'aile d'*A. gambiae* s.l.. Pour la largeur des ailes, les valeurs chez les femelles ont été comprises entre 0,8 mm et 0,9 mm et chez les mâles elles ont été toutes égales à 0,7 mm ; ces valeurs sont légèrement en dessous de celles obtenues par Hamza *et al.* (2016) dont les mesures des largeurs des ailes étaient comprises entre 0,82 mm et 0,94 mm. Les résultats du rapport des palpes (indice palpal) ont présenté différentes valeurs. La proportion des individus ayant des valeurs de l'indice palpal comprises entre 0,81 et 0,86 a été majoritaire chez les femelles ; chez les mâles, la proportion des individus ayant des valeurs de l'indice palpal comprises entre 0,66 et 0,74 était plus élevée ; ce résultat est en accord avec les travaux antérieurs (Coluzzi, 1964 ; Gillies & De Meillon, 1968 ; Hamza *et al.*, 2016).

Des variations évidentes de la taille des moustiques femelles de *A. gambiae* s.s. et d'*A. arabiensis* collectées sur le terrain avaient déjà été signalées par Petrarca *et al.* (1998) ; ces derniers ont émis l'hypothèse selon laquelle la grande taille des femelles de *A. arabiensis* pourrait être causée par le climat frais par rapport aux femelles des milieux à climat chaud. L'influence de la température sur la taille du corps a été signalée à plusieurs reprises chez d'autres espèces d'anophèles telles que *A. merus* (Le Sueur Sharp & Appleton, 1992) et *A. crucians* (Hu *et al.*, 1993). Ces observations sont différentes de celles obtenues dans notre travail, parce que les moustiques provenant des sites frais du Nord (Mayo Oulo) ont présenté des tailles plus petites par rapport aux moustiques des sites chauds (Pitoa et Garoua). En effet, les caractéristiques écologiques pourraient influencer de manière directe les dimensions d'une partie du corps d'un animal. Wasserberg *et al.* (2003) ont mentionné que les différences morphométriques des ailes peuvent être attribuées à l'effet des conditions microclimatiques qui affecterait le développement larvaire, la durée de vie de l'adulte (imago) et l'abondance de l'espèce.

D'après Coluzzi (1964), les variations bioécologiques entre les espèces de moustiques des eaux douces et celles des eaux saumâtres peuvent entraîner des différences morphologiques au sein desdites espèces. Cependant, il semble plus difficile de distinguer les différentes espèces du complexe *A. gambiae* par les critères morphologiques et morphométriques. En effet, en raison de la plasticité morphologique et de l'existence possible du polytypisme, seuls quelques caractères (écologie, capacité vectorielle, comportement de la recherche de l'hôte...) montrent une divergence qui concorde avec la génétique au sein des différentes espèces (Coluzzi, 1964).

III.2.2 Résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine 0,05%

Nous avons réalisé un suivi longitudinal de la sensibilité à la deltaméthrine 0,05% d'*A. gambiae* s.l. de trois districts de santé de la Région du Nord-Cameroun, à savoir Garoua, Pitoa et Mayo Oulo. En effet, nous avons observé une dissémination progressive de la résistance à la deltaméthrine à 0,05% entre 2011 et 2015 dans les trois districts de santé prospectés. La résistance de *A. gambiae* s.l. aux pyréthrinoïdes dans la Région du Nord-Cameroun est largement documentée (Etang *et al.*, 2003 ; Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2013 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). L'augmentation des fréquences de la résistance à la deltaméthrine que nous avons observée par rapport aux travaux antérieurs (Etang *et al.*, 2003) serait liée à un effet combiné des facteurs environnementaux tels que l'utilisation intense et continue des insecticides en agriculture et en santé publique (Diabaté *et al.*, 2002 ; Nwane *et al.*, 2009 ; Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015). De plus, les facteurs inhérents à la génétique et à la biologie des populations de vecteurs tels que les mutations, les migrations et la sélection des gènes de résistance auraient accéléré l'évolution de la résistance tel que suggéré par Etang *et al.* (2009) ; ces facteurs comprennent le nombre de gènes qui interagissent pour développer le phénotype de la résistance, la relation de dominance entre les allèles ainsi que la taille et la proportion de la population exposée aux traitements insecticides (Chareonviriyaphap *et al.*, 2002). En effet, l'utilisation des insecticides dans les ménages et dans les champs de coton a été rapportée comme affectant la sensibilité des populations de vecteurs du paludisme au Nord-cameroun (Chouaïbou *et al.*, 2008). D'après nos observations, la résistance a été plus élevée en zone urbaine qu'en zones péri-urbaines et rurales ; cette distribution de la résistance serait liée également à la distribution des espèces de moustiques. En zone urbaine, *A. coluzzii* qui est très anthropophile était fortement représenté ; à cause de cette anthropophilie, *A. coluzzii* serait plus exposé aux insecticides à usage domestique (bombes aérosols, spirales ou MILDA), donc à la sélection de la résistance à ces insecticides. Dans le même ordre d'idées, Etang *et al.* (2016b) ont pu démontrer un comportement de repos sélectif des espèces de moustiques à l'intérieur des habitations fournies en moustiquaires imprégnées d'insecticides, avec des densités d'*A. coluzzii* plus élevées à l'intérieur des maisons par rapport à *A. arabiensis*. De plus, la diminution progressive des taux de mortalité associée à l'augmentation des temps de « knockdown » et de la fréquence de l'allèle 995F du gène « kdr » dénote d'importants changements physiologiques au sein des trois espèces du complexe *A. gambiae* au fil du temps. En effet, la présente étude a mis en évidence la tendance évolutive de la résistance partant du niveau « faible » au niveau « élevé » selon la classification de Strode *et al.* (2014) :

- faible= taux de mortalité >80% et la fréquence du gène « kdr » <25% ;
- modérée= taux de mortalité compris entre 25% et 80% et la fréquence du gène « kdr » <25% ;
- élevée= : taux de mortalité <25% et la fréquence du gène « kdr » <25% ou >80%).

Les espèces concernées par cette résistance à la deltaméthrine sont *A. arabiensis*, *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. ; la répartition de ces trois espèces dans les sites prospectés est en accord avec leur biologie (Coetzee *et al.*, 2000) et les travaux antérieurs menés dans cette région (Wondji *et al.*, 2005 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 ; Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Simard *et al.*, 2009 ; Nwane *et al.*, 2013). *Anopheles arabiensis* est connu comme étant une espèce des zones savanicoles caractérisées par une sécheresse accentuée et une rareté des précipitations ; il colonise la majorité des régions tropicales sèches allant de l’Afrique de l’Ouest vers l’Afrique de l’Est (Coetzee *et al.*, 2000). L’écologie d’*A. coluzzii* et d’*A. gambiae* s.s. demeure jusqu’ici une problématique de recherche. En effet, ce sont des espèces cosmopolites dont la répartition est associée à de nombreux facteurs, entre autres la qualité de l’eau du gîte (Touré *et al.*, 1998), le climat, la végétation, le degré d’urbanisation (Kamdem *et al.*, 2012), la pression insecticide (Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2009). Nos travaux se sont déroulés après la première distribution de masse des moustiquaires imprégnées d’insecticides à longue durée d’action (MILDA) en 2011, et les données collectées ont montré une augmentation d’année en année de la proportion dans nos échantillons d’*A. coluzzii* plus connu des zones équatoriales humides. Cette observation suggère l’adaptation d’*A. coluzzii* à divers environnements et son évolution progressive vers les zones arides. De plus, les interactions biotiques qui surviennent tant aux niveaux des stades larvaires qu’adulte entre *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. telles que la prédation et la compétition peuvent davantage déterminer la structure des populations et avoir un impact sur l’équilibre et la répartition locale des espèces comme cela a été rapporté au Burkina Faso (Diabaté *et al.*, 2007 ; Gimonneau *et al.*, 2010).

Le gradient d’urbanisation des trois districts de santé pourrait également expliquer l’augmentation de la fréquence d’*A. coluzzii* dans nos échantillons. En effet, la capacité d’*A. coluzzii* à tolérer les gîtes larvaires pollués avec prééminence des matières organiques densément retrouvées dans les agglomérations urbaines du Cameroun a été mis en évidence par Tene Fossog *et al.* (2013b). Parmi les trois districts de santé prospectés, ceux de Garoua et de Pitoa sont situés dans le même faciès écologique, alors que le district de santé de Mayo Oulo présente deux faciès écologiques bien distincts : un faciès de plaine et un faciès de montagne. Les deux premiers districts sont situés dans la vallée inondable de la cuvette de la Bénoué où les gîtes permanents ou semi-permanents sont propices au développement d’*A. coluzzii* comme cela a été rapporté par

Etang *et al.* (2016a). Par ailleurs, en altitude (470m) dans le district de santé de Mayo Oulo, *A. coluzzii* est remplacé par *A. gambiae* s.s. ; cette observation est en accord avec celle de Tene Fossog *et al.* (2015).

La résistance à la deltaméthrine observée chez les trois espèces du complexe *A. gambiae* présentes dans les trois districts de santé est en accord avec les travaux antérieurs effectués dans cette Région (Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Ndjemaï *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2013). Toutefois, les proportions d'invidus résistants étaient plus faibles chez l'espèce *A. arabiensis* par rapport à *A. gambiae* s.s. et *A. coluzzii*. D'après les travaux antérieurs de Etang *et al.* (2007), le principal mécanisme de résistance d'*A. gambiae* s.l. du Nord-Cameroun est de type métabolique et le vecteur principal du paludisme dans cette région est l'espèce *A. arabiensis*. Nos travaux ont mis en évidence une corrélation positive entre les proportions d'*A. coluzzii*, d'*A. gambiae* s.s. et l'augmentation de la résistance à la deltaméthrine. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le gène « kdr » L995F est fortement lié à la résistance aux pyréthriinoïdes chez les populations d'*A. coluzzii* et d'*A. gambiae* s.s. par rapport à l'espèce jumelle *A. arabiensis* (Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Ibrahim *et al.*, 2014 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015).

III.2.3 Mécanismes de résistance d'*A. gambiae* s.l.

L'utilisation des synergistes donne une indication préliminaire sur le mécanisme enzymatique responsable de la résistance aux insecticides (Mc Caffrey, 1998). Les tests associant les synergistes (PBO et DEF) à la deltaméthrine ont montré une hétérogénéité des niveaux de réversion de la résistance au sein des différentes populations de moustiques testées. En effet, l'absence de réversion de la résistance lors de l'utilisation des synergistes PBO et DEF dans sept échantillons de moustiques suggère que la détoxification par les monooxygénases à cytochrome P450 ou par les estérases non spécifiques n'est pas impliquée dans la résistance de ces populations à la deltaméthrine. D'autres mécanismes de résistance seraient donc à l'origine de la résistance présente dans ces populations de moustiques, notamment le gène « kdr » qui y avait déjà été mis en évidence dans cette région du pays, bien qu'à de très faibles fréquences (Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Ndjemaï *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2013).

Par ailleurs, nous avons observé une réversion de la résistance à la deltaméthrine dans la majorité des populations, à travers une réduction significative des temps de « knockdown » et une augmentation significative de la mortalité ; ce résultat est en accord avec les travaux antérieurs effectués au Cameroun (Nwane *et al.*, 2013 ; Etang *et al.*, 2016a) et dans d'autres pays africains (Yewhalaw *et al.*, 2012 ; Koffi *et al.*, 2013 ; Aïzoun *et al.*, 2014 ; Chabi *et al.*, 2016). Dans notre travail, nous n'avons pas dosé l'activité de ces systèmes enzymatiques.

Cependant, la combinaison PBO/deltaméthrine a été la plus létale sur la majorité des populations par rapport à la combinaison DEF/deltaméthrine ; cette observation confirme que la famille d'enzymes la plus impliquée dans la résistance des populations de la zone d'étude aux pyréthrinoïdes est celle des monooxygénases tel que suggéré par Etang *et al.* (2007). Les résultats obtenus par Müller *et al.* (2008) ont d'ailleurs révélé la surexpression dans les populations d'*A. arabiensis* de Pitoa du gène CYP4AG16 appartenant à la famille des cytochromes CYP450. Les moustiquaires imprégnées de deltaméthrine+PBO pourraient donc constituer un moyen efficace de lutte contre les populations de vecteurs du paludisme dans la Région du Nord-Cameroun. En effet, les résultats des essais de moustiquaires imprégnées avec la combinaison deltaméthrine+PBO en zone de résistance ont démontré l'efficacité de cet outil dans plusieurs pays d'Afrique (Corbel *et al.*, 2010 ; Yewhalaw *et al.*, 2012 ; Menze *et al.*, 2018).

La recherche de la mutation « kdr » au locus 995 nous a permis de mettre en évidence deux allèles mutants 995F et 995S dans les populations étudiées ; cependant, seul l'allèle 995F a été observé chez les trois espèces du complexe *A. gambiae* retrouvées en sympatrie. La présence de cet allèle dans les populations de moustiques étudiées est en accord avec les travaux antérieurs menés au Cameroun (Etang *et al.*, 2006 ; Chouaïbou *et al.*, 2008 ; Ndjemaï *et al.*, 2008 ; Reimer *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2011 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015) et dans d'autres pays africains (Weill *et al.*, 2000 ; Reimer *et al.*, 2005 ; Mathias *et al.*, 2011 ; Dabiré *et al.*, 2014 ; Foster *et al.*, 2016). Les fréquences alléliques les plus élevées ont été enregistrées chez *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. par rapport à *A. arabiensis*. Cette distribution en accord les travaux antérieurs (Ndjemaï *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2011) pourrait émaner d'une introgression due au passage de l'allèle 995F d'une espèce du complexe *A. gambiae* à l'autre (Diabaté *et al.*, 2003) ou d'événements mutationnels indépendants chez chacune des espèces (Lawniczack *et al.*, 2010). Quant à l'allèle 995S qui n'a été mis en évidence au Cameroun que dans la zone forestière (Ndjemaï *et al.*, 2008 ; Nwane *et al.*, 2011), sa présence chez *A. coluzzii* et *A. arabiensis* dans la Région du Nord-Cameroun à des fréquences très faibles de moins de 3%, traduit son introduction récente dans les populations de cette région. De plus, *A. arabiensis* étant majoritaire dans les échantillons testés, la faible fréquence de cet allèle traduirait son acquisition récente dans notre zone d'étude. Les fréquences de l'allèle 995F observées dans notre étude sont plus élevées que celles rapportées en 2008 (Ndjemaï *et al.*, 2008 ; Chouaïbou *et al.*, 2008). Cependant, celles-ci sont relativement faibles par rapport à celles rapportées plus tard par Nwane *et al.* (2011, 2013) ; cette observation suggère que les processus d'expansion et d'augmentation des fréquences des allèles des gènes « kdr » responsables de la résistance aux insecticides dans les populations d'*A. gambiae* s.l. du Nord-Cameroun sont non linéaires.

Les fréquences les plus élevées de l'allèle 995F ont été enregistrées dans le district de santé de Garoua, en accord avec le niveau de résistance élevé des moustiques collectés dans ce DS. Ainsi, l'activité accrue des enzymes de détoxification rapportée dans les populations d'anophèles du Nord-Cameroun (Etang *et al.*, 2007) couplée à la présence de l'allèle 995F du gène « kdr » enregistrée dans notre étude suggère des mécanismes de résistance multiples dans les populations prospectées. Ces observations sont en accord avec celles de Nwane *et al.* (2013) dans plusieurs populations d'*A. gambiae* s.l. du Cameroun.

L'utilisation des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes en agriculture et en santé publique engendre souvent une pression de sélection des allèles de la résistance de type « kdr » chez *A. gambiae* s.l. (Fanello *et al.*, 2003). Ainsi, la pression de sélection due aux insecticides confère un avantage sélectif aux individus de génotypes homozygotes résistants 995F-995F par rapport aux hétérozygotes (995L-995F), c'est ce qui expliquerait le déficit en hétérozygotes observé dans les populations qui ont montré une déviation ponctuelle par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, notamment celles de :

- *A. arabiensis* dans les districts de santé de Garoua (majorité des sites), Pitoa (Lombou et Be-centre) et Mayo Oulo (Bala et Dourbeye) ;
- *A. coluzzii* dans le district de santé Garoua (Lombou).

Plus encore, les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg au locus « kdr » 995F observés dans les différentes populations peuvent vraisemblablement être imputés aux seules fluctuations stochastiques dues à l'échantillonnage d'un nombre faible d'individus d'*A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. sur la population totale. Cependant, aucune déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg n'a été observée à l'intérieur de la population d'*A. gambiae* s.s., suggérant un pool de gène homogène pendant la collecte des échantillons.

CONCLUSION, RECOMMENDATIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

La présente étude avait pour objectif général de caractériser la dynamique de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine dans la Région du Nord-Cameroun. Cette étude a été effectuée après la première campagne de distribution de masse des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) en 2011 dans la Région du Nord-Cameroun. En effet, nous avons mis en exergue pour la première fois au Cameroun le développement et la dispersion de la résistance à la deltaméthrine chez *A. gambiae* s.l. dans le temps et dans l'espace. Par ailleurs, nous avons mis à jour quelques caractères morphologiques des trois espèces du complexe *A. gambiae* en présence : *A. arabiensis* qui est l'espèce typique de la région, *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s. qui sont des espèces cosmopolites. De plus, nous avons observé une augmentation des proportions d'*A. coluzzii* couplée à l'évolution de la résistance dans les différents sites prospectés. L'utilisation des synergistes (PBO et DEF) combinée à la deltaméthrine au cours des tests de sensibilité, notamment la combinaison de la deltaméthrine avec le PBO a engendré un effet réversible de la résistance à travers une augmentation significative de la mortalité des moustiques testés. Cette réversion de la résistance aux insecticides traduit une implication des enzymes de détoxification dans la résistance à la deltaméthrine. Par ailleurs, le génotypage au locus « kdr » a confirmé la présence de ce gène de résistance et sa diffusion rapide chez les trois espèces du complexe *A. gambiae* par rapport aux années antérieures (2003-2011). L'allèle 995F du gène « kdr » était plus présent chez *A. coluzzii* que chez *A. gambiae* s.s. ou *A. arabiensis*, confirmant la forte capacité de cette espèce à porter l'allèle 995F du gène « kdr ». Ainsi, nous avons constaté que la résistance dans les trois districts de santé étudiés était plus élevée en zones urbaines qu'en zones rurales en passant par les zones peri-urbaines, avec une forte présence de l'espèce *A. coluzzii* dans les proportions des individus dont les taux de mortalité étaient les plus faibles, compris entre 20% et 50%, confirmant son adaptation biologique par rapport au milieu.

RECOMMANDATIONS

Le paludisme est l'une des affections parasitaires les plus dangereuses de la planète, avec un impact dévastateur sur le bien-être des populations du continent africain. Dans un contexte où la stratégie technique mondiale 2016-2030 (WHO, 2015) vise à réduire le poids global du paludisme dans le monde de près de 90% d'ici 2030, le développement de la résistance d'*A. gambiae* s.l. à la deltaméthrine qui représente l'insecticide de choix pour les MILDA semble très compromettant. Toutefois, cette étude a montré que la combinaison de la deltaméthrine+PBO

pourrait être une configuration efficace pour les moustiquaires à mettre à la disposition des populations du Nord-Cameroun. Il est également nécessaire de mettre en place un comité d'expertise associant les acteurs des secteurs publics et privés (agriculture, hygiène et assainissements), les chercheurs et les décideurs, afin qu'un choix raisonné soit fait sur l'utilisation des insecticides contre les insectes nuisibles aux cultures et à la santé humaine ; cela permettra d'éviter des éventuels échecs opérationnels.

PERSPECTIVES

En perspective, nous nous proposons d'approfondir ce travail par :

- une recherche plus poussée sur les caractères pigmentaires pouvant permettre de séparer les différentes espèces du complexe *A. gambiae* dans les régions équatoriales du Cameroun;
- une étude de la sensibilité des vecteurs aux nouvelles molécules insecticides afin d'identifier les insecticides de substitution;
- une investigation approfondie des gènes impliqués dans la résistance métabolique et un suivi de la fréquence des allèles « kdr » chez les trois espèces du complexe *A. gambiae* en présence dans la Région du Nord-Cameroun.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbot W. S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Aïzoun N., Aïkpon R., Gnanguenon V., Azondekon R., Oké-Agbo F., Padonou G. G., & Akogbéto M. 2014.** Dynamics of insecticide resistance and effect of synergists piperonyl butoxide (PBO), S.S.S-tributylphosphorotrithioate (DEF) and ethacrynic acid (ETAA or EA) on permethrin, deltamethrin and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) resistance in two *Anopheles gambiae* s. l. populations from Southern Benin, West Africa. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 6(1): 1-10.
- Antonio-Nkondjio C., Awono P., Toto J. C., Meunier J. Y., Zebaze S., Nyambam R., Wondji C., Tchuinkam T., & Fontenille D. 2002.** High Malaria Transmission Intensity in a Village Close to Yaounde, the Capital City of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 39 (2): 350-355.
- Antonio-Nkondjio C., Kerah C. H., Simard F., Awono-Ambene P., Chouaïbou M., Tchuinkam T., & Fontenille D. 2006.** Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of Medical Entomology*, 43(6): 1215-1221.
- Antonio-Nkondjio C., Ndo C., Njiokou F., Bigoga J. D., Awono-Ambene P., Etang J., Same Ekobo A., & Wondji C. S. 2019.** Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites and Vectors*, 12: 501.
- Antonio-Nkondjio C., Poupardin R., Fossog Tene B., Kopya E., Costantini C., Awono-Ambene P., & Wondji C. S. 2016.** Investigation of mechanisms of bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malaria Journal*, 15:424.
- Antonio-Nkondjio C., Sonhafouo-Chiana N., Ngadjeu C. S., Doumbe-Belisse P., Talipouo A., Djamouko-Djonkam L., Kopya E., Bamou R., Awono-Ambene P., & Wondji C. S. 2017.** Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites and Vectors*, 10: 472.
- Antonio-Nkondjio C., Tene Fossog B., Kopya E., Poumachu Y., Menze Djantio B., Ndo C., Tchuinkam T., Awono-Ambene P., & Wondji C. 2015.** Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malaria Journal*, 14: 155.
- Arora N., Anbalagan L. C., & Pannu A. K. 2021.** Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? *Risk Management and Healthcare Policy*, 14: 1033-1039.
- Awolola T. S., Brooke B. D., Koekemoer L. L., & Coetzee M. 2003.** Absence of the *kdr* mutation in the molecular 'M' form suggests different pyrethroid resistance mechanisms

in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Tropical Medicine and International Health*, 8(5): 420-422.

- Awolola T. S., Oduola A. O., Oyewole I. O., Obansa J. B., Amajoh C. N., Koekemoer L. L., & Coetzee M. 2007.** Dynamics of knockdown pyrethroid insecticide resistance alleles in a field population of *Anopheles gambiae* s.s. in southwestern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44: 181-188.
- Awono-Ambene P., Antonio-Nkondjio C., Toto J., Ndo C., Etang J., Fontenille D., Simard F. 2009.** Epidemiological importance of the *Anopheles nili* group of malaria vectors in equatorial villages of Cameroon, Central Africa. *Science and Medicine in Africa*, 1:13-20.
- Awono-Ambene H. P., Kengne P., Simard F., Antonio-Nkondjio C., & Fontenille D. 2004.** Description and bionomics of *Anopheles* (Cellia) ovengensis (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 41(4): 561-568.
- Bamou R., Mbakop L. R., Kopya E., Ndo C., Awono-Ambene P., Tchuinkam T., Rono M. K., Mwangangi J., & Antonio-Nkondjio C. 2018.** Changes in malaria vector bionomics and transmission patterns in the equatorial forest region of Cameroon between 2000 and 2017. *Parasites and Vectors*, 11:464.
- Benedict M. Q. & Robinson A. S. 2003.** The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 19(8): 349-355.
- Benoît-Vical F., Paloque L., & Augereau J. M. 2016.** *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies (ACTs): Fears of widespread drug resistance. *Bulletin Académique Nationale de Médecine*, 200(3): 477-490.
- Binyang A. J., Elanga-Ndille E., Tene-Fossog B., Ndo C., Nouage L., Assatse T., Fotso-Toguem Y., Tabue R., Zeukeng F., Nguete Nguifo D., Etang J., Njiokou F., & Wondji C. S. 2022.** Distribution of acetylcholinesterase (Ace-1^R) target-site G119S mutation and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* sensu lato populations from Cameroon. *Parasites and Vectors*, 15: 53.
- Brindley W.A., & Selim A. A. 1984.** Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environmental Entomology*, 13: 348-353.
- Bruce-Chwatt L. J., & Zulueta J. D. 1985.** *Essential Malariology*. W. Heinemann medicine. Books Ltd, London, chap., 8: 166-209.
- Bryan J. H. 1983.** *Anopheles gambiae* and *A. melas* at Brefet, The Gambia, and their role in malaria transmission. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77: 1-12.
- Bushrod F. M. 1981.** The *Anopheles gambiae* Giles complex and Bancroftian filariasis transmission in a Tanzanian coastal village. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 75: 93-100.

- Camara S., Ahoua Alou L.P., Koffi A. A., Clegban Y. C. M., Kabran J. P., Koffi F. M., Koffi K., & Pennetier C. 2018.** Efficacy of Interceptor® G2, a new long-lasting insecticidal net against wild pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire: a semi-feld trial. *Parasite*; 25: 42.
- Carnevale P., & Mouchet J. 1990.** Vector control and malaria control. *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial*, 50: 391-398.
- Carnevale P., & Mouchet J. 2001.** La lutte antivectorielle au Cameroun. Passé-présent-avenir. Réflexions. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 94, 2 bis, 202-209.
- Carnevale P., & Robert V. 2009.** *Les anopheles: Biologie, transmission du plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Editions. Collection didactique, Marseille, p. 47-55.
- Chabi J., Baidoo P. K., Datsomor A. K., Okyere D., Ablorde A., Iddrisu A., Wilson M. D., Dadzie S. K., Jamet H. P., & Diclaro II J. W. 2016.** Insecticide susceptibility of natural populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* (sensu stricto) from Okyereko irrigation site, Ghana, West Africa. *Parasites and Vectors* 9:182.
- Champ P. 1985.** « Mode d'action et utilisation des organophosphorés ». In: Insect-Insecticides. Santé, Colloque national d'Angers, « Mode d'action et utilisation des insecticides », *ACTA*: 207-221.
- Chandre F., Darriet F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J., & Guillet P. 1999a.** Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.l. *Bulletin of World Health Organization*, 77: 230-234.
- Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., Carnevale P., & Guillet P. 1999b.** Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15: 53-59.
- Chareonviriyaphap T., Rongnoparut P., & Juntarumporn P. 2002.** Selection for pyrethroid resistance in a colony of *Anopheles minimus* species A, malaria vector in Thailand. *Journal of Vector and Ecology*, 27:222-229.
- Cheverud J. M., Dow M. M., & Leutenegger W. 1985.** The quantitative assessment of phylogenetic constraints in comparative analyses: sexual dimorphism in body weight among primates. *Evolution*, 39: 1335-1351.
- Chouaïbou M., Etang J., Brevault T., Nwane P., Hinzoumbé C. K., Mimpfoundi R., & Simard F. 2008.** Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Tropical Medicine and International Health*, 13(4):1-11.
- Chouaïbou M., Simard F., Chandre F., Etang J., Darriet F., & Hougard J. M. 2006.** Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against *Anopheles funestus* and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* in North Cameroon. *Malaria Journal*, 5: 77.

- Christophides G. K. 2005.** Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cellular Microbiology*, 7(3): 325-333.
- Clarkson C. S., Miles A., Harding N. J., Weetman D., Wiatkowski D., Donnelly M., & The Anopheles gambiae 1000 Genomes Consortium. 2018.** The genetic architecture of target-site resistance to pyrethroid insecticides in the African malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Molecular Ecology*, doi: 10.1111/mec.15845.
- Cliff A. D., & Ord J. K. 1973.** Spatial Autocorrelation. Pion Limited, London, p. 173-176.
- Cliff A. D., & Ord J. K. 1981.** Spatial and temporal analysis: Autocorrelation in space and time. In Wrigley E. N., & Bennett R. J, editors, *Quantitative Geography: A British View*, pages 104-110. Routledge & Kegan Paul, London.
- Coetzee M., Craig M., & Le Sueur D. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.
- Coetzee M., Hunt R. H., Wilkerson R., Della Torre A., Coulibaly M. B., & Besansky N. J. 2013.** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619 (3): 246-274.
- Cole L. M., & Casida J. E. 1986.** Polychlorocycloalcan insecticide-induced convulsions in mice in relation to disruption of the GABA-regulated chloride ionophore. *Life Science* 39: 1855-1862.
- Collins F. H., Mendez M. A., Razmussen M. O., Mehaffey P. C., Besansky N. J., & Finnerty V. 1987.** A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37: 37-41.
- Coluzzi M. 1964.** Morphological divergences in the *Anopheles gambiae* complex. *Rivista di Malariologia*, 43: 197-232.
- Coluzzi M., Petrarca V., & Di Deco M. A. 1985.** Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino zoologia*, 52: 45-63.
- Coluzzi M., Sabatini A., Della Torre A., Di Deco M. A., & Petrarca V. 2002.** A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298: 1415-1418.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V., & Di Deco M. A. 1979.** Chromosomal differentiation and adaptations to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 483-497.
- Corbel V., Chabi J., Dabiré R. K., Etang J., Nwane P., Pigeon O., Akogbéto M., & Hougaard J. M. 2010.** Field efficacy of a new mosaic long lasting mosquito net (PermaNet® 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in western and central Africa. *Malaria Journal*, 9:113.

- Dabiré K. R., Namountougou M., Diabaté A., Soma D. D., Bado J., Toé H. K., Bass C., & Combarry P. 2014.** Distribution and Frequency of kdr Mutations within *Anopheles gambiae* s.l. Populations and First Report of the Ace.1G119S Mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PLoS ONE* 9(7): e99584.
- Davidson. 1962.** *Anopheles gambiae* complex. *Nature*, 196: 907.
- De Meeûs T. 2012.** *Initiation à la génétique des populations naturelles: Application aux parasites et leurs vecteurs*, IRD éditions. Marseille, France, p. 29-31.
- De Queiroz K. 2007.** Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879-886.
- Della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-Yovo J., Favia G., Petrarca V., & Coluzzi M. 2001.** Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology*, 10: 3-7.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., & Akogbéto M. 2002.** The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 617-622.
- Diabaté A., Baldet T., Chandre F., Dabiré K. R., Kengne P., Guiguemde T. R., Simard F., Guillet P., & Hemingway J. 2003.** Kdr mutation; a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in tropical savannah area of West-Africa. *Journal of Medical Entomology*, 40 (2): 195-198.
- Diabaté A., Dabiré R. K., Millogo N., & Lehmann T. 2007.** Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44:60-64.
- Diabaté A., Dao A., Yaro A. S., Adamou A., Gonzalez R., Manoukis N. C., Traore S. F., Gwadz R. W., & Lehman T. 2009.** Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276: 4215-4222.
- Djouaka R. F., Bakare, A. A., Coulibaly O. N., Akogbeto M. C., Ranson H., Hemingway J., & Strode. C. 2008.** Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC genomics*, 9: 538.
- Eldefrawi A. T. 1976.** The acetylcholine receptor and its interaction with insecticides. In *insecticide biochemistry and physiology*. (Ed. C.F. Wilkinson). Plenum Press, New York, p. 297-326.
- Elliot M., & Janes N. F. 1978.** Synthetic pyrethroids - a new class of insecticide. *Chemical Society Review*, 7: 473-505.

- Enayati A. A., Ranson H., & Hemingway J. 2005.** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14: 3-8.
- Eno Belinga S. M. 1984.** *Géologie du Cameroun*, librairie universitaire. Yaoundé, Cameroun, 308p.
- Enquête Démographique et de Santé (EDS),** Rapport d'activité 2018, Yaoundé Cameroun p. 255-267.
- Etang J., Fesuh Nono B., Awono-Ambene P., Bigoga J., Ekoko Eyisap W., Piameu M., Toto J. C., Ndong Nguema E. P., Gwet H., Fondjo E., & Mnzava A. P. 2016b.** Resting Behaviour of Deltamethrin-Resistant Malaria Vectors, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coluzzii*, from North Cameroon: Upshots from a Two-Level Ordinary Logit Model. *Intech*, <http://dx.doi.org/10.5772/65463>.
- Etang J., Fondjo E., Chandre F., Morlais I., Brengues C., Nwane P., Chouaïbou M., Amadou D., & Simard F. 2006.** First report of the kdr mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 795-797.
- Etang J., Manga L., Chandre F., Guillet P., Fondjo E., Mimpfoundi R., Toto J. C., & Fontenille D. 2003.** Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 40:491-497.
- Etang J., Manga L., Toto J. C., Guillet P., Fondjo E., & Chandre F. 2007.** Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *Journal of Vector Ecology*, 32(1): 123-133.
- Etang J., Mbida Mbida A., Ntonga Akono P., Binyang J., Eboumbou Moukoko C. E., Lehman L.G., Awono-Ambene P., Talipouo A., Ekoko Eyisab W., Tagne D., Tchoffo R., Manga L., & Mimpfoundi R. 2016a.** *Anopheles coluzzii* larval habitat and insecticide resistance in the island area of Manoka, Cameroon. *BMC Infectious Diseases*, 16:217.
- Etang J., Vicente J. L., Nwane P., Chouaïbou M., Morlais I., Do Rosario V. E., Simard F., Awono-Ambene P., Toto J. C., & Pinto J. 2009.** Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Molecular Ecology*, 18: 3076-3086.
- Fanello C., Petrarca V., Della Torre A., Santolamazza F., Allouèche A., Coulibaly M., Dolo G., Curtis C., Touré Y. T., & Coluzzi M. 2003.** The pyrethroid knock-down resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *A. gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 12:241-245.

- Fanello C., Santolamazza F., & Della Torre A. 2002.** Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complexe by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 461-464.
- Favia G., Della Torre A., Bagayoko M., Lanfroncotti A., Sagnon N. F., Touré Y. T., & Coluzzi M. 1997.** Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Molecular Biology*, 6: 377-383.
- Favia G., Lanfroncotti A., Spanos L., Siden-Kiamos., & Louis C. 2001.** Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 10: 19-23.
- Fettene M., Koekemoer L. L., Hunt R. H., & Coetzee M. 2002.** PCR assay for identification of *Anopheles quadriannulatus* species B from Ethiopia and other sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 214-217.
- Fettene M., & Temu E. A. 2003.** Species-specific primer for identification of *Anopheles quadriannulatus* sp. B (Diptera: Culicidae) from Ethiopia using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Journal of Medical Entomology*, 40: 112-115.
- Feyereisen R. 1999.** Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology*, 44, 507-533.
- Ffrench-Constant R. H., Streichen J. C., Rocheleau T. A., Aronstein K., & Roush R. T. 1993.** A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in Drosophila populations. *Proceedings of National Academy Sciences USA*, 90: 1957-1961.
- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P., Kengne P., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., & Simard F. 2005.** Vecteurs du paludisme: du terrain à la génétique moléculaire recherches en Afrique. Malaria vectors from the field to genetics. *Research in Africa. Epidemiology review*. Santé Publique, 53: 283-290.
- Foster G. M., Coleman M., Thomsen E., Ranson H., Yangalbé-Kalnone E., Moundai T., Demba Kodindo I., Nakebang A., Mahamat A., Peka M., & Kerah-Hinzoumbé C. 2016.** Spatial and Temporal Trends in Insecticide Resistance among Malaria Vectors in Chad Highlight the Importance of Continual Monitoring. *PLoS ONE* 11(5): e0155746.
- Fournier D., Bride J. M., Hoffmann F., & Karch F. 1992.** Acetylcholinesterase: Two types of modifications confer resistance to insecticide. *Journal of Biological and Chemistry*, 267: 14270-14274.
- Franciosa H., & Bergé J. B. 1995.** Glutathione S-transferases in housefly (*Musca domestica*): location of GST-1 and GST-2 families. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 25: 311-317.
- Georghiou G. P. 1980.** Insecticide resistance and prospects for its management. *Residue Review* 76: 131-144.

- Gillies M. T., Coetzee M. 1987.** Supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (afrotropical region). Publication South African Institute of Medical Research, Johannesburg, 55: 143p.
- Gillies M. T., & De Meillon B. 1968.** *The Anophelinae of Africa South of Sahara (Ethiopian zoogeographical region)*, 2nd ed. Johannesburg: South African Institute for Medical research, 54: 343.
- Gillot C. 2005.** Entomology (third edition) Springe (eds). Dordrecht, Netherlands, 834p.
- Gimonneau G., Bouyer J., Morand S., Besansky N. J., Diabate A., & Simard F. 2010.** A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behavioral Ecology*, 21(5):1087-1092.
- Guillet P. 1995.** *La résistance des insectes aux insecticides*. Document ORSTOM, 13p.
- Guillet P., Chandre F., & Mouchet J. 1997.** L'utilisation des insecticides en santé publique: état et perspectives. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 27: 552-557.
- Hamza A. M., Abukashawa S. M. A., & El Rayah El-A. 2016.** Morphometrics Studies on Females *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) from Kassala State, Eastern Sudan. *Journal of Mosquito Research*, 6(6): 1-13.
- Harbach R. E. 2004.** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetics relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 94: 537-553.
- Harbach R. E., & Knight K. L. 1980.** *Taxonomist's glossary of mosquito anatomy*. Marlton, Plexus Publishing, New Jersey, p. 86-91.
- Hargreaves K., Koekemoer L. L., Brooke B., Hunt R. H., Mthembu J., & Coetzee M. 2000.** *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 12: 1-12.
- Hemingway J. 1985.** Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 23: 309-313.
- Hemingway J., & Karunaratne H. P. P. 1998.** Mosquito carboxylesterase: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide 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., Carroll L., & Ranson H. 2004.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 653-65.

- Hengy C., Garridge G., Abissegue Ghogomu N. A., Gazin P., Gelas H., Kouka-Bemba D., Le Bras J., & Jambou R. 1989.** Surveillance de la chimio-sensibilité de *Plasmodium falciparum* à Yaoundé et ses environs (Cameroun). Etude in vivo, in vitro. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 82: 217-223.
- Holstein M. H. 1949.** *Guide pratique de l'anophélisme en A.O.F.* Dakar, Direction générale de la Santé publique, p. 55.
- Holstein M. H. 1954.** Biology of *Anopheles gambiae*: recherches en Afrique Occidentale Français: Serie des monographies. *Organisation Mondiale de la Santé*, Genève: No. 9, p. 35-49.
- Hu G. Y., Lounibos L. P., & Escher R. L. 1993.** Seasonal abundance, age composition and body size of salt-marsh *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in South Florida. *Journal of Medical Entomology*, 30: 883-887.
- Huang H. S., Hu N. T., Yao Y. E., Wu C. Y., Chiang S. W., & Sun C. N. 1998.** Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 28: 651-658.
- Hunt R. H., Coetzee M., & Fettene M. 1998.** The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92: 231-235.
- Ibrahim S. S., Manu Y. A., Tukur Z., Irving H., & Wondji C. S. 2014.** High frequency of kdr L1014F is associated with pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzii* in Sudan savannah of northern Nigeria. *BMC Infectious Diseases*, 14: 441.
- Ibrahim S. S., Riveron J. M., Bibby J., Irving H., Yunta C., Paine M. J. et al. 2015.** Allelic variation of cytochrome P450s drives resistance to bednet insecticides in a major malaria vector. *PLoS Genetic* 11: e1005618.
- Institut National de la Statistique (INS). 2013.** Annuaire statistique du Cameroun. Recueil de séries d'informations statistiques sur les activités économiques, sociales, politiques et culturelles du pays jusqu'en 2013. Edition 2013.
- Activity report, Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). 2006.** Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. Miami, 13p.
- Kamdem C., Fouet C., Gamez S., & Bradley J. W. 2017.** Pollutants and insecticides drive local adaptation in African malaria mosquitoes. *Molecular Biology and Evolution*, 34(5):1261-1275.
- Kamdem C., Tene Fossog B., Simard F., Etouna J., Ndo C., Kengne P., Boussès P., Etoa F. X., Awono-Ambene P., Fontenille D., Antonio-Nkondjio C., Besansky N. J., &**

- Costantini C. 2012.** Anthropogenic Habitat Disturbance and Ecological Divergence between Incipient Species of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*, 7(6): e39453.
- Koffi A. A., Alou L. P. A., Adja M. A., Chandre F., & Pennetier C. 2013.** Insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* s.s. population from M'Bé: a WHOPEs labelled experimental hut station, 10 years after the political crisis in Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*, 12: 151.
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A. J., Metaxakis A., Boukavala E., & Papadopoulou Mourkidou E. 2001.** Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1-8.
- Lacey L. A., & Orr B. K. 1994.** The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 50, suppl. 97-115.
- Lawniczak M. K. N., Emrich S. J., Holloway A. K., Regier A. P., Olson M., White B., Redmond S., Fulton L., Appelbaum E., Godfrey J., Farmer C., Chinwalla A., Yang S. P., Minx P., Nelson J., Kyung K., Walenz B. P., Garcia-Hernandez E., Aguiar M., Viswanathan L. D., Rogers Y. H., Strausberg R. L., Sasaki C. A., Lawson D., Collins F. H., Kafatos F. C., Christophides G. K., Clifton S. W., Kirkness E. F., & Besansky N. J. 2010.** Widespread divergence between incipient *Anopheles gambiae* species revealed by whole genome sequences. *Science*, 330: 512-514.
- Le Sueur Sharp D. B., & Appleton C. C. 1992.** Dark-scaled areas on adult *Anopheles* mosquitoes are selectively affected by temperature-related size variation. *Medical and Veterinary Entomology*, 6: 396-398.
- Leeper J. R., Roush R. T., & Reynolds H. T. 1986.** Preventing or managing resistance in arthropods, In *Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management populations, Committee on strategies for the management of pesticide resistance pest populations* (ed). National Academy Press, Washington, D.C, p 335-346.
- Letouzey R. 1985.** Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/500.000. Volume 1. Domaine sahélien et soudanien. Document IRA (Herbier National, Yaoundé, Cameroun), Institut de la Carte Internationale de la Végétation Toulouse, France, p. 1-103.
- Lindberg R. L., & Negishi M. 1989.** Alteration of mouse cytochrome P450 coh substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature*, 339: 632.
- Lividas G., Mouchet J., Gariou J., & Chastang R. 1958.** Peut-on envisager l'éradication du paludisme dans la région forestière du Sud-Cameroun ? *Rivista di Malariologia*, 37: 229-256.

- Lund A. E., & Narahashi. 1983.** Kinetics of Sodium Channel Modification as the Basis for the variation in the Nerve Membrane Effects of Pyrethroid and DDT Analogs. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 20: 203-216.
- Lynd A., Ranson H., McCall P. J., Randle N. P., Black IV W. C., Walker E. D., & Donnelly M. J. 2005.** A simplified high-throughput method for pyrethroid knockdown, resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4: 1-16.
- Martinez Torres D., Chandre F., Williamson M. S., Darriet F., Berge J. B., Devonshire A. L., Guillet P., Pasteur N., & Pauron D. 1998.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*, 7: 179-184.
- Mathias D. K., Ochomo E., Atieli F., Ombok M., Bayoh M. N., Olang G., Muhia D., Kamau L., Vulule J. M., Hamel M. J., Hawley W. A., Walker E. D., & Gimnig J. E. 2011.** Spatial and temporal variation in the kdr allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in Western Kenya. *Malaria Journal*, 10:10.
- Mc Caffrey A. R. 1998.** Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera; a global view. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Lond B*, 353: 1735-1750.
- Menze B. D., Wondji M. J., Tchappa W., Tchoupo M., Riveron J. M., & Wondji C. S. 2018.** Bionomics and insecticides resistance profiling of malaria vectors at a selected site for experimental hut trials in central Cameroon. *Malaria Journal*, 17:317.
- Mitchell S. N., Stevenson B. J., Müller P., Wilding C. S., Egyir-Yawson A., Field S. G., Hemingway J., Paine M. J., Ranson H., & Donnelly M. J. 2012.** Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 6147-6152.
- Moffett A., Shackelford N., & Sarkar S. 2007.** Malaria in Africa: vector species niche models and relative risk maps. *PLoS ONE*, 2: e824.
- Moran P. A. P. 1950.** Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37:17-23.
- Mosha F. W., & Petrarca V. 1983.** Ecological studies on *Anopheles gambiae* complex sibling species on the Kenya coast. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 344-345.
- Mouches C., Magnin M., Berge J. B., De Silvestri M., Beyssat V; Pasteur N., & Georghiou G. P. 1987.** Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proceedings of National Academy Sciences USA*, 84: 2113-2116.

- Mouchet J. 1980.** *Lutte contre les vecteurs et nuisances en santé publique. Encyclopédie Médico Chirurgicale des Maladies infectieuses.* Paris, 8120-B10 3:1-16.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Lenoble R. D., & Sircoulon J. 2004.** *Biodiversité du paludisme dans le monde.* John Libbey. Paris, 428p.
- Müller P., Chouaïbou M., Pignatelli P., Etang J., Walker E. D., Donnelly M. J., Simard F., & Ranson H. 2008.** Pyrethroid tolerance associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Molecular Ecology*, 17(4):1145-1155.
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J. M., & Fournier D. 1994.** Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91: 5922-5926.
- Ndjemaï H. N. M., Patchoké S., Atangana J., Etang J., Simard F., Bilong Bilong C. F., Reimer L., Cornel A., Lanzaro C. G., & Fondjo E. 2008.** The distribution of insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l populations from Cameroon: an update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(11):1127-1138.
- Nwane P., Etang J., Chouaïbou M., Toto J. C., Koffi A., Mimpfoundi R., & Simard F. 2013.** Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasites and Vectors*, 6: 41.
- Nwane P., Etang J., Chouaïbou M., Toto J. C., Mimpfoundi R., & Simard F. 2011.** Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.s populations in Cameroon: spread of the L1014F and L995S mutations. *BMC infectious diseases*, 4: 463.
- Nwane P., Etang J., Costantini C., Batomen., Antonio-Nkondjio C., Mimpfoundi R., & Simard F. 2009.** Field evaluation of three commercial repellent formulations against afro-tropical vector mosquitoes in Cameroon. *Sciences et Médecine d'Afrique*, 1: 21-26.
- Oppenoorth F. J. 1985.** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: “*Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*”. Volume 12. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, ed. Pergamon, New York, p. 731-773.
- Oye K. A., Esvelt K., Appleton E., Catteruccia F., Church G., Kuiken T., Lightfoot S. B. Y., McNamara J., Smidler A., & Collins J. P. 2014.** Regulating gene drives. *Science*, 345(6197): 626-628.
- Pages F., Orlandi-Pradines E., & Corbel V. 2007.** Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection. *Médecine et maladies infectieuses*, 37: 153–161.
- Pennetier C., Warren B., Dabiré K. R., Russell I. J., & Gibson G. 2010.** “Singing on the wing” as a mechanism for species recognition in the malarial mosquito *Anopheles gambiae*. *Current Biology*, 20: 131-136.

- Petrarca V., Sabatinelli G., Toure Y. T., & Di Deco M. A. 1998.** Morphometric multivariate analysis of field samples of adult *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* s. s. (Diptera: Culicidae), *Journal of Medical Entomology*, 35 (1): 16-25.
- Philogene B. J. R. 1991.** *L'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes: problèmes et perspectives. La lutte anti-acridienne.* AUPELF-UREF John Libbey, Paris, p. 269-278.
- Pinto J., Lynd A., Elissa N., Donnelly M. J., Costa C., Gentile G., Caccone A., & Do Rosário V. E. 2006.** Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 27-32.
- Pitman R. M. 1971.** Transmitter substances in insects: a review. *Computer General Pharmacological*, 2: 347-371.
- Prequalification Vector Control (PqVC). 2019.** <https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/en/>. Accessed Jan 2019.
- Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). 2017.** Rapport d'activité 2017, Yaoundé, Cameroun: 71p.
- Pumain D., & Saint-Julien T 1997.** *L'analyse spatiale-1. Localisations dans l'espace.* Collection Cursus. Armand Colin, Paris, p. 123-144.
- Ranson H., Jensen B., Vulule J. M., Wang X., Hemingway J., & Collins F H. 2000.** Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9: 491-497.
- Raymond M., Prato G., & Ratsira D. 1993.** *PROBIT analysis of mortality assays displaying quantal response, version 2.0.* Licence CNRS-UMII L93019. Praxème, 34680 St. Georges d'Orques, France.
- Regnault J. M. 1986.** *Synthèse géologique du Cameroun.* Ministère des Mines et de l'Energie, Yaoundé, Cameroun: 119p.
- Reimer L. J., Fondjo E., Patchoké S., Diallo B., Lee Y., Arash N. G., Ndjemai H. M., Atangana J., Traoré S. F., Lanzaro G., & Cornel J. A. 2008.** Relationship between kdr mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of *Anopheles gambiae*. *Journal of Medical Entomology*, 45(2):260-266.
- Reimer L. J., Tripet F., Slotman M., Spielman A., Fondjo E., & Lanzaro G. C. 2005.** An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Insect Molecular Biology*, 14:683-688.
- Ringwald P., Keundjian A., Samè Ekobo A., & Basko L. K. 2000.** Chimiorésistance de *P. falciparum* en milieu urbain à Yaoundé, Cameroun. Part 2: Evaluation de l'efficacité de

l'amodiaquine et de l'association sulfadoxine-pyriméthamine pour le traitement de l'accès palustre simple à *Plasmodium falciparum* à Yaoundé, Cameroun. *Tropical Medicine and International Health*, 5(9): 620-627.

- Riveron J. M., Irving H., Ndula M., Barnes K. G., Ibrahim S. S., Paine M. J., & Wondji C. S. 2013.** Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 252-7.
- Riveron J. M., Yunta C., Ibrahim S. S., Djouaka R., Irving H., Menze B. D., Ismail H. M., Hemingway J., Ranson H., Albert A., & Wondji C. S. 2014.** A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biology*, 15: R27.
- Rodhain F., & Perez C. 1985.** *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Maloine, Paris, France, p. 253-268.
- Rooker S., Guillemaud T., Bergé J. B., Pasteur N., & Raymond M. 1996.** Co-amplification of the esterases A and B as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, 77: 555-561.
- Roush R. T. 1989.** Designing resistance management programmes: how can you choose? *Journal of Pesticide Science*, 26: 423-442.
- Rousset F. 2008.** GENETOP '007: a complete re-implementation of the GENETOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Saïki R. K., Scharf S., Falona F., Mullis K. B., Horn G.T., Herlich H. A., & Amheim N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350.
- Salgado V. L., Irwing S. N., & Miller T. A. 1983.** The importance of nerve terminals depolarization in pyrethroid poisoning insect. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 20: 169-182.
- Sansonetti P. P., Le Bras J., Verdier F., Charmot G., Dupont B., & Lapresle C. 1985.** Chloroquine-resistant in *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *The Lancet*, 1: 1154-1155.
- Santolamazza F., Calzetta M., Etang J., Barrese E., Dia I., Caccone A., Donnelly M. J., Petrarca V., Simard F., Pinto J., & Della eTorre A. 2008.** Distribution of knockdown resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in West and West-Central Africa. *Malaria Journal*, 7: 74.
- Scott J. A., Brogdon W. G., & Collins F. H. 1993.** Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 520-529.

- Scott J. G. 1996.** Cytochrome P450 Monooxygenase-Mediated Resistance to Insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 2: 241-245.
- Silver J. B. 2008.** *Mosquito ecology: Field Sampling Methods*, Third edition, Dordrecht, Netherlands, 1494p.
- Simard F., Ayala D., Kamdem G. C., Pombi M., Etouna J., Ose K., Fotsing J. M., Fontenille D., Besansky N. J., & Costantini C. 2009.** Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecology*, 9: 17.
- Soderlund D. M., & Bloomquist J. R. 1989.** Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush RT, Tabashnik BE. (eds) *Pesticides resistance in arthropods*. Chapman and Hall, New York, p. 58-96.
- Sogoba N., Vounatsou P., Bagayoko M. M., Doumbia S., Dolo G., Gosoni L., Traore S. F., Toure Y. T., & Smith T. 2007.** The spatial distribution of *Anopheles gambiae sensu stricto* and *A. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Mali. *Geospatial Health*, 2: 213-222.
- Strode C., Donegan S., Garner P., Enayati A. A., & Hemingway J. 2014.** The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated Bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS Medecine*, 11(3): e1001619.
- Suchel J. B. 1987.** Les climats du Cameroun. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Bordeaux III, 1186p.
- Tabashnik B. E. 1989.** Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendations. *Journal of Economical Entomology*, 82: 1263-1269.
- Tabashnik B. E., & Croft B. A. 1982.** Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. *Environmental Entomology*, 11: 1137-1144.
- Tabue R. N., Awono-Ambene P., Etang J., Atangana J., Antonio-Nkondjio C., Toto J. C., Patchoke S., Leke R. G. F., Fondjo E., Mnzava A. P., Knox T. B., Tougordi A., Donnelly M. J., & Bigoga J. D. 2017.** Role of *Anopheles (Cellia) rufipes* (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon: a cross-sectional survey. *Parasites and Vectors*, 10:22.
- Tchouakui M., Chiang M. C., Ndo C., Kuicheu C. K., Amvongo-Adjia N., Wondji M. J., Tchoupo M., Kusimo M. O., Riveron J. M., & Wondji C. S. 2019.** A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher Plasmodium infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Scientific Reports*, 9: 5772.
- Tchuinkam T., Simard F., Lélé-Defo E., Téné-Fossog B., Tateng-Ngouateu A., Antonio-Nkondjio C., Mpoame M., Toto J. C., Njiné T., Fontenille D., & Awono-Ambéné**

- H. P. 2010.** Bionomics of Anopheline species and malaria transmission dynamics along an altitudinal transect in Western Cameroon. *BMC Infectious Diseases*, 10: 11.
- Tene Fossog B., Antonio-Nkondjio C., Kengne P., Njiokou F., Besansky N. J., & Costantini C. 2013b.** Physiological correlates of ecological divergence along an urbanization gradient: differential tolerance to ammonia among molecular forms of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Ecology*, 13: 1.
- Tene Fossog B., Ayala D., Acevedo P., Kengne P., Abeso Mebuy I. N., Makanga B., Magnus J., Awono-Ambene P., Njiokou F., Pombi M., Antonio-Nkondjio C., Paupy C., Besansky N. J., & Costantini C. 2015.** Habitat segregation and ecological character displacement in cryptic African malaria mosquitoes. *Evolutionary Applications*, 8: 326-345.
- Tene Fossog B., Poupardin R., Costantini C., Awono-Ambene P., Wondji C. S., Ranson H., & Antonio-Nkondjio C. 2013a.** Resistance to DDT in an Urban Setting: Common Mechanisms Implicated in Both M and S Forms of *Anopheles gambiae* in the City of Yaounde Cameroon. *PLoS ONE*, 8(4): e61408.
- Thomas A., Kumar S., & Pillai M. K. K. 1991.** Pyperonyl butoxide as a counter measure for deltaméthrine-resistance in *Culex quinquefasciatus* Say. *Entomology* 18: 1-10.
- Touré Y. T., Petrarca V., Traoré S. F., Coulibaly A., Maiga H. M., Sankaré O., Sow M., Di Deco M. A., & Coluzzi M. 1998.** Distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia*, 40(4): 477-511.
- Van Thiel R. H. 1927.** Sur l'origine des variations de taille de l'*Anopheles maculipennis* dans les Pays-Bas. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 20: 366-390.
- Vaughan A., & Hemingway J. 1995.** Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 17044-17049.
- Vontas J. G., Small G. J., & Hemingway J. 2001.** Glutathione-S-transferase as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemistry Journal* 357: 65-72.
- Ware G.W., & Whitacre D. M. 2004.** *The Pesticide Book*, 6th Ed. Willoughby: Meister Media Worldwide, Cleveland, 496p.
- Wasserberg G., Yarom I., & Warburgy A. 2003.** Seasonal abundance patterns of the sand fly *Phebotomas papatsi* in climatically distinct foci of cutaneous Leishmaniasis in Israeli deserts. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 452-456.
- Weedall G. D., Mugenzi L. M., Menze B. D., Tchouakui M., Ibrahim S. S., Amvongo-Adjia N., Irving H., Wondji M. J., Tchoupo M., & Djouaka R. 2019.** A cytochrome P450

allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine*, 11: 7386.

- Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin S., Akogbéto M., Pasteur N., Guillet P., & Raymond M. 2000.** The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, 9:451-455.
- Weill M., Lutfalla., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., & Raymond M. 2003.** Responsible for insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 87: 2574-2578.
- Weir B. S., & Cockerham C.C. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- White G. B. 1973.** Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt. Culicidae). III. The distribution, ecology, behaviour and vectorial importance of species D in Bwamba Country, Uganda, with an analysis of biological, ecological, morphological and cytogenetical relationships of Ugandan species D. *Bulletin of entomological Research*. 63: 65-97.
- White G. B. 1985.** *Anopheles bwambae* n.sp., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *A. gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 10: 501-522.
- White G. B., & Rosen P. 1973.** Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt. Culicidae). II. Ecology of species A and B in savanna around Kaduna, Nigeria, during transition from wet to dry season. *Bulletin of entomological Research*, 62: 613-625.
- World Health Organization (WHO). 2003.** Principes directeurs pour la gestion des pesticides utilisés en santé publique. *WHO/CDS/WHOPES/2003.7*, p. 15.
- World Health Organization (WHO). 2004.** *Malaria epidemics: forecasting, prevention, early detection and control: from policy to practice*. Geneva, World Health Organization, 23p.
- World Health Organization (WHO). 2006.** Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. *WHOPES document WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1*, p. 13.
- World Health Organization (WHO). 2012.** Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). 2012. *ISBN*, 978: 4.
- World Health Organization (WHO). 2013.** Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes, 18: 40p.
- World Health Organization (WHO). 2014.** World malaria report 2014. Global Malaria Programme. World Health Organization, Geneva: 227p.

- World Health Organization (WHO). 2015.** Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030. Global Malaria Programme. World Health Organization, Geneva: 29p.
- World Health Organization (WHO). 2019.** World malaria report 2016. Global Malaria Programme. World Health Organization, Geneva: 166p.
- World Health Organization (WHO). 2021a.** World malaria report 2021. Global Malaria Programme. World Health Organization, Geneva: 263p.
- World Health Organization (WHO). 2021b.** World malaria report 2021. Dossier d'information : Données et tendances régionales, Genève: 15p.
- Wondji C. S., Dabiré R. K., Tukur Z., Irving H., Djouaka R., & Morgan J. C. 2011.** Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 484-491.
- Wondji C. S., Irving H., Morgan J., Lobo N. F., Collins F. H., Hunt R. H., Coetzee M., Hemingway J., & Ranson H. 2009.** Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome research*, 19: 452-459.
- Wondji C. S., Simard F., Petrarca V., Etang J., Santolamazza F., Della Torre A., & Fontenille D. 2005.** Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s.. *Journal of Medical Entomology*, 42(6): 998-1005.
- Wright S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323-354.
- Yewhalaw D., Asale A., Tushune K., Getachew Y., Duchateau L., & Speybroeck N. 2012.** Bio-efficacy of selected long-lasting insecticidal nets against pyrethroid resistant *Anopheles arabiensis* from South-Western Ethiopia. *Parasites and Vectors*, 5:159.
- Zaim M., Aitio A., & Nakashima N. 2000.** Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 1-5.

ANNEXES

Annexe 1 : Clé d'identification des adultes d'anophèles (Gillies & De Meillon, 1968)

CLES DES ANOPHELES VECTEURS MAJEURS AU CAMEROUN (adultes)

CARACTERES COMMUNS

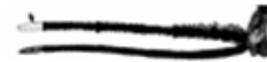
- Abdomen SANS touffes d'écaillés latérales
- Pattes postérieures SANS AUCUN tarse entièrement blanc
- Apex des palpes blancs
- Aile avec des taches blanches et noires réparties sur toute la surface

CARACTERES DISTINCTIFS

1. - Palpe entièrement noire*An. obscurus* (non vector)
 - Palpe avec bandes pâles ⇨ 2



2. - Palpe avec une seule bande pâle sur l'apex *An. nili*
 - Palpe avec plus d'une bande pâle ⇨ 3



3. - Pattes entièrement noires *An. funestus*
 - Pattes pas complètement noires ⇨ 4



4. - Pattes tachetées..... *A. gambiae* s.l.



- Pattes avec bandes pâles sur l'apex de chaque tarse..... *An. m. moucheti*



AUTRES CRITERES BIOMETRIQUES

espèce	palpe	aile	patte
- <i>A. gambiae</i> s.l.			
- <i>An. funestus</i>			
- <i>An. moucheti</i>			
- <i>An. nili</i>			

Annexe 2 : Articles publiés en relation avec la thèse

STANISLAS ELYSÉE MANDENG, HERMAN PARFAIT AWONO-AMBENE, JUDE D. BIGOGA, WOLFGANG EYISAP EKOKO, JÉRÔME BINYANG, MICHAEL PIAMEU, LILI RANAISE MBAKOP, BETRAND NONO FESUH, NARCISSE NVONDO, RAYMOND TABUE, PHILIPPE NWANE, RÉMY MIMPFOUNDI, JEAN CLAUDE TOTO, IMMO KLEINSCHMIDT, TESSA BELLAMY KNOX, ABRAHAM PETER MNZAVA, MARTIN JAMES DONNELLY, ETIENNE FONDJO AND JOSIANE ETANG. **2019**. Spatial and temporal development of deltamethrin resistance in malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex from North Cameroon. *PLoS ONE*, 14(2): e0212024.

JOSIANE ETANG, **STANISLAS ELYSÉE MANDENG**, PHILIPPE NWANE, HERMAN PARFAIT AWONO-AMBENE, JUDE D. BIGOGA, WOLFGANG EYISAP EKOKO, ACHILLE JEROME BINYANG, MICHAEL PIAMEU, LILI RANAISE MBAKOP, NARCISSE MVONDO, RAYMOND TABUE, REMY MIMPFOUNDI, JEAN CLAUDE TOTO, IMMO KLEINSCHMIDT, TESSA BELLAMY KNOX, ABRAHAM PETER MNZAVA, MARTIN JAMES DONNELLY AND ETIENNE FONDJO. **2022**. Patterns of Kdr-L995F Allele Emergence Alongside Detoxifying Enzymes Associated with Deltamethrin Resistance in *Anopheles gambiae* s.l. from North Cameroon. *Pathogens*, 11 : 253.

RESEARCH ARTICLE

Spatial and temporal development of deltamethrin resistance in malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex from North Cameroon

Stanislas Elysée Mandeng^{1,2}, Herman Parfait Awono-Ambene¹, Jude D. Bigoga³, Wolfgang Eyisap Ekoko^{1,4}, Jérôme Binyang², Michael Piameu^{1,5}, Lili Ranaisé Mbakop^{1,2}, Bertrand Nono Fesuh⁶, Narcisse Mvondo², Raymond Tabue^{3,7}, Philippe Nwane¹, Rémy Mimpfoundi², Jean Claude Toto¹, Immo Kleinschmidt^{8,9}, Tessa Bellamy Knox¹⁰, Abraham Peter Mnzava¹¹, Martin James Donnelly¹², Etienne Fondjo⁷, Josiane Etang^{1,13,14*}



1 Institut de Recherche de Yaoundé (IRY), Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), Yaoundé, Cameroon, **2** Laboratory of General Biology, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon, **3** Laboratory for Vector Biology and control, National Reference Unit for Vector Control, The Biotechnology Center, Nkolbisson-University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon, **4** Laboratory of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Douala, Douala, Cameroon, **5** Ecole des Sciences de la Santé, Université Catholique d'Afrique Centrale, Yaoundé, Cameroon, **6** National Advanced School of Engineering, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon, **7** Ministry of Public Health, National Malaria Control Programme, Yaounde, Cameroon, **8** Department of Infectious Disease Epidemiology, London School of Tropical Medicine & Hygiene, MRC Tropical Epidemiology Group, London, United Kingdom, **9** School of Public Health, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, **10** Global Malaria Programme, World Health Organization, Geneva, Switzerland, **11** African Leaders Malaria Alliance (ALMA), Dar es Salaam, Tanzania, **12** Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom, **13** Department of biological sciences, Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, Douala, Cameroon, **14** Institute for Insect Biotechnology, Justus Liebig University Gießen, Heinrich-Buff-Ring, Germany

* josyet2@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Mandeng SE, Awono-Ambene HP, Bigoga JD, Ekoko WE, Binyang J, Piameu M, et al. (2019) Spatial and temporal development of deltamethrin resistance in malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex from North Cameroon. PLoS ONE 14(2): e0212024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024>

Editor: Silvie Huijben, Arizona State University, UNITED STATES

Received: July 24, 2018

Accepted: January 26, 2019

Published: February 19, 2019

Copyright: © 2019 Mandeng 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 and its Supporting Information files.

Funding: Funding was provided by the Bill and Melinda Gates Foundation (Grant Number: 484991.01). This research forms part of a multi-country study coordinated by the Global Malaria Programme of the World Health Organization. The funders had no role in study design, data

Abstract

The effectiveness of insecticide-based malaria vector control interventions in Africa is threatened by the spread and intensification of pyrethroid resistance in targeted mosquito populations. The present study aimed at investigating the temporal and spatial dynamics of deltamethrin resistance in *An. gambiae s.l.* populations from North Cameroon. Mosquito larvae were collected from 24 settings of the Garoua, Pitoa and Mayo Oulo Health Districts (HDs) from 2011 to 2015. Two to five days old female *An. gambiae s.l.* emerging from larval collections were tested for deltamethrin resistance using the World Health Organization's (WHO) standard protocol. Sub samples of test mosquitoes were identified to species using PCR-RFLP and genotyped for knockdown resistance alleles (*Kdr* 1014F and 1014S) using Hot Ligation Oligonucleotide Assay (HOLA). All the tested mosquitoes were identified as belonging to the *An. gambiae* complex, including 3 sibling species mostly represented by *Anopheles arabiensis* (67.6%), followed by *Anopheles coluzzii* (25.4%) and *Anopheles gambiae* (7%). Deltamethrin resistance frequencies increased significantly between 2011 and 2015, with mosquito mortality rates declining from 70–85% to 49–73% in the three HDs (Jonckheere-Terstra test statistic (*JT*) = 5638, *P* < 0.001), although a temporary increase of

collection, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

mortality rates (91–97%) was seen in the Pitoa and Mayo Oulo HDs in 2012. Overall, confirmed resistance emerged in 10 *An. gambiae s.l.* populations over the 24 field populations monitored during the study period, from 2011 to 2015. Phenotypic resistance was mostly found in urban settings compared with semi-urban and rural settings ($JT = 5282$, $P < 0.0001$), with a spatial autocorrelation between neighboring localities. The *Kdr* 1014F allelic frequencies in study HDs increased from 0–30% in 2011 to 18–61% in 2014–2015 ($JT = 620$, $P < 0.001$), especially in *An. coluzzii* samples. The overall frequency of the *Kdr* 1014S allele was 0.1%. This study revealed a rapid increase and widespread deltamethrin resistance frequency as well as *Kdr* 1014F allelic frequencies in *An. gambiae s.l.* populations over time, emphasizing the urgent need for vector surveillance and insecticide resistance management strategies in Cameroon.

Introduction

Malaria is one of the most dangerous parasitic diseases of the current decade [1] impacting on the health and standard of living of populations in endemic areas. Despite huge efforts conceded for its elimination, about 3.2 billion people living in 97 countries worldwide are still at risk, especially children under 5 years living in sub-Saharan Africa [2]. Since no antimalarial vaccine is commercially available, efforts to prevent the disease rely mainly on vector control tools such as long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS) [3]. However, these measures are threatened by rapid expansion of insecticide resistance in vector populations [4, 5]. Insecticidal products belonging to five chemical classes (carbamates, neonicotinoids, organochlorines, organophosphates, and pyrethroids) are recommended or pre-qualified by the World Health Organization for adult malaria vector control [6]. For LLINs, the range of available insecticides is very limited. Currently, only three pyrethroid insecticides (deltamethrin, permethrin and alpha-cypermethrin) are used in prequalified LLIN products, because of their low toxicity to mammals, fast action, and high residual insecticidal activity [7]. Unfortunately, resistance particularly to DDT and pyrethroids is spreading widely in the major malaria vector species, *An. gambiae s.l.* and *Anopheles funestus* group [8, 9]. Extensive use of similar insecticides in both agriculture and public health including scaling up insecticide treated bed nets during the past decades is considered to have induced the emergence and rapid expansion of insecticide resistance [10, 11, 12]. Two main physiological mechanisms confer insecticide resistance in malaria vectors: target site modification including mutations at the voltage gate sodium channel (*Kdr* 1014F or 1014S mutations) conferring resistance to DDT and pyrethroids, and cetylcholinesterase (G119S *Ace-1* mutation) conferring resistance organophosphates and carbamates [13, 14, 15], and detoxification enzymes involved in insecticide degradation [16, 17]. Both leucine to phenylalanine (L1014F) and leucine to serine (L1014S) substitutions are known to decrease affinity of pyrethroids for the receptor of voltage gate sodium channel [13]. Metabolic resistance operates through higher catalytic properties and/or overexpression of detoxification genes such carboxylesterases (CoEs), cytochrome P450 mono-oxygenases (P450s) and glutathione S-transferases (GSTs) [18]. Furthermore, it is now common to find mosquitoes displaying multiple insecticide resistance mechanisms [19].

In Cameroon, malaria causes more than 30% of annual deaths in hospitals and health facilities, 30% of morbidity cases, 36% of consultations and 48% of hospitalizations annually [20]. Since 2000 the National Malaria Control Programme (NMCP) has implemented the distribution of impregnated bed nets. In 2011, more than 8 million LLINs were freely distributed

throughout the country. This initiative was reinforced by distributing over 12 million LLINs that are recommended by the WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), between 2015 and 2016. LLINs distributed in 2011 were mainly the PermaNet 2.0 mosquito (0.055 g/m² deltamethrin coated on polyester, Vestergaard, Lausanne, Switzerland) whereas those distributed in 2015 were either PermaNet 2.0 or Olyset nets (1 g/m² permethrin incorporated into polyethylene, Sumitomo Chemical, Tokyo, Japan), or Interceptor (A polymer binder system combined with 0.2 g/m² alpha-cypermethrin, BASF chemical company, Ludwigshafen, Germany).

Studies conducted so far across the country reported an increase in the prevalence of insecticide resistance and heterogeneous patterns in vector populations [19, 21]. While in the southern part of the country, high prevalence of insecticide resistance is associated positively with high prevalence of *Kdr* 1014 alleles, in the northern parts, moderate resistance, mainly associated with metabolic resistance was reported in cotton growing areas [21, 22, 23]. However, little is known about the dynamics of insecticide resistance in malaria vectors from different ecological settings, particularly between urban and remote rural settings.

Therefore, this study sought to assess the spatial and temporal distribution of deltamethrin resistance in wild populations of the *An. gambiae* complex in 24 sites across northern Region of Cameroon, after LLINs distribution in 2011.

Materials and methods

Study sites

The study was conducted in 24 locations within 3 Health Districts (HD) of the Northern region of Cameroon; namely Garoua (9° 18'N; 13° 24'E) the capital city of the North Region, Mayo Oulo (9° 46'N; 13° 44'E) located 90 km to the north of Garoua, and Pitoa (9° 24'N; 13° 31'E) located 18 km north-East of Garoua (Fig 1). These HDs are located along the Bénoué

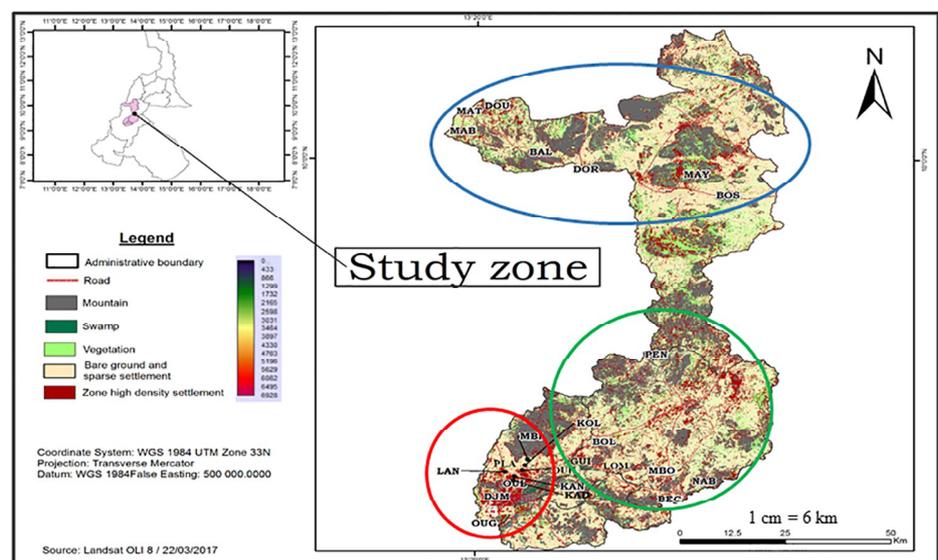


Fig 1. Map of North Cameroon showing study Health Districts (HDs) and clusters. The red chart encloses cluster of the Garoua HD (LAN: Lainde II; OUL: Ouro lawane; PLA: Plateau; DJM: Djamboutou; OUG: Ourogarga; KAN: Kanadi I; KAD: Kanadi II; MBI: Mbilga; OUH: Ouro houso; KOL: Kollere). The green chart encloses cluster of the Pitoa HD (PEN: Pene; BOL: Boulgou; LOM: Lombou; MBO: Mbolom; NAB: Nassarao-be; BEC: Be-centre; GUI: Guizigare). The Blue chart encloses cluster of the Mayo Oulo HD (DOU: Doumou; BOS: Bossoum; DOR: Dourbeye; MAY: Mayo oulo; MAB: Maboni; MAT: Matra; BAL: Bala).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g001>

River basin in humid tropical domain. The climate in these areas is characterized by two seasons: one dry season extending from November to May and one rainy season from June to October, with average annual rainfall between 700–1000 mm and a mean annual temperature of 28.1°C [24]. Table 1 presents the geo-localization and ecological features of the 24 study locations, including 14 rural, 7 urban and 3 peri-urban settings, classified according to the rates of built-up land (RBL), i.e.: $RBL > 50\%$ for urban areas, $RBL < 40\%$ for rural areas; $40 < RBL < 50$ for peri-urban areas proximate to the city.

Mosquito collection

Mosquito larvae were sampled in 24 study sites between September and November each year for 5 consecutive years from 2011 to 2015, using the dipping technique [25]. In each locality, anopheline larvae were collected from mosquito breeding sites (temporary pools of water, permanent shelters, hoof prints, rice paddies flooded with water) for testing susceptibility to deltamethrin. No specific permissions were required for larval collection, because the visited breeding sites were outdoors in open access areas. These field studies did not involve endangered or protected species.

Mosquito larvae from the field were brought to local insectaries, fed with TetraMindBaby (fry food), and reared until adult emergence. Adults were fed with 10% glucose solution, and identified using morphological identification reference keys [26, 27]. Only female *An. gambiae s.l.* were used for bioassays and molecular analyses.

Insecticide susceptibility bioassays

Bioassays were performed on mosquitoes aged 2–5 days using WHO susceptibility test kits and standard protocol for adults [28] under ambient room temperature ranging from 25°C to 28°C and relative humidity of 70–80%. Filter papers impregnated with 0.05% deltamethrin were supplied by the Vector Research and Control Unit of University Sains Malaysia (Penang, Malaysia). Each complete set of bioassays was performed with five batches of 20–25 unfed females, four batches were exposed to insecticide impregnated filter papers and one batch was exposed to untreated filter paper as control.

During exposure to insecticides, the number of mosquitoes knocked down was recorded at 5 min intervals. After 1 h exposure, mosquitoes were transferred to holding tubes and provided with cotton pads soaked with 10% sugar solution. The mortality rates were determined 24 h post-exposure. All test samples were individually stored desiccated in 1.5-mL micro centrifuge tubes containing silica gel and kept at -20 °C for molecular analyses.

Species identification and *kdr* genotyping

Total DNA of mosquitoes used as control samples during susceptibility tests was extracted using the CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) method [29] and each mosquito species identified using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) [30]. This method allows simultaneous identification of the species of the *An. gambiae* complex. Alleles at the *Kdr* 1014 locus were genotyped using Hot Oligonucleotide Ligation Assay (HOLA) as described by Lynd *et al.* [31]. Based on the limited number of adult mosquitoes from larval collections in some locations, only samples from 13 representative settings (7 in the Garoua HD, 3 in the Mayo Oulo HD and 3 in the Pitoa HD) where breeding sites were mostly productive were selected for species identification and *kdr* genotyping from 2011 to 2014 (Table 1). In 2015, three sentinel sites were selected, i.e. Ouro Housso I, Bala and Be-Centre in the Garoua, Mayo Oulo and Pitoa HDs respectively for follow up.

Table 1. Study sites and their ecological features.

Health Districts	Population of District	Locality	Geographical coordinates	Ecological features	Rate of built-up land (% RBL)
Garoua	316 957	Kanadi II*	09°18'05,9"N -13°22'09,6"E	urban	85
		Kanadi I*	09°18'07,7"N-13°22'29,9"E	urban	80
		Ouro housso*	09°17'35,4"N-13°22'37,8"E	urban	82
		Lainde II	09°20'39,7"N-13°25'01,5"E	urban	87
		Djamboutou II*	09°18'19,3"N-13°20'48,3"E	urban	79
		Plateau	09°18'21,3"N-13°22'55,1"E	urban	83
		Ouro lawane	09°21'30,7"N-13°25'39,4"E	peri-urban	45
		Mbilga*	09°20'40,8"N-13°23'04,2"E	peri-urban	40
		Kollere*	09°18'02,9"N-13°23'40,2"E	urban	78
		Ouro garga*	09°16'30,4"N-13°17'55,7"E	rural	20
Pitsoa	108 611	Guizigare*	09°24'25,2"N-13°31'01,8"E	peri-urban	47
		Pene	09°34'47"N-13°37'13,0"E	rural	15
		Boulgou	09°25'13"N-13°28'87"E	rural	18
		Nassarao-be	09°18'58"N-13°43'22"E	rural	22
		Lombou*	09°20'54"N-13°32'25"E	rural	12
		Be-centre*	09°18'54"N-13°40'21"E	rural	9
		Mbolom	09°19'72"N-13°39'29"E	rural	13
Mayo Oulo	91 501	Mayo oulo*	09°58'02,3"N-13°36'81,9"E	rural	25
		Doumou	10°03'646"N-13°18'25,2"E	rural	18
		Matra	10°03'206"N-13°18'15,9"E	rural	20
		Maboni	10°02'75,0"N-13°19'90,7"E	rural	13
		Dourbeye*	09°59'67,2"N-13°30'21,6"E	rural	15
		Bossoum	09°56'22,8"N-13°42'50,6"E	rural	10
		Bala*	10°00'36,7"N-13°28'02,4"E	rural	7

Sites with asterix (*) are those where a complete data set from bio assays to molecular analysis was collected.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.t001>

Statistical analysis

Susceptibility test data were excluded from the analysis if fewer than 40 mosquitoes were tested. Resistance status was evaluated in each location and each year according to the WHO criteria [28]: mortality rates <90% was indicative of resistance, 90% ≥ mortality rates between ≤97% suggested probable resistance to be confirmed, while mortality rates ≥98% indicated susceptibility. The knock-down times for 50% and 95% mosquitoes (Tkd50 and Tkd95) during bioassays were estimated using a log probit model [32] and analyses were performed using the WIN DL (version 2.0, 1999) software. Comparison of mortality rates was performed using the Chi-square test. Estimates of mortality rates and the 95% confidence interval were determined using the software MedCalc V16.8.4. Allelic frequencies at the *Kdr* 1014 locus were calculated using Genepop Online (Version 4.5.1) [33].

Spatial autocorrelation was explored annually in three HDs using Moran's I statistic to investigate whether mortality measurements were more similar in clusters geographically closer to each other. Box plots were used to show trends or dissimilarities in the distributions of quantitative variables across years, while 95% bootstrap confidence intervals based on 2,000 samples were reported for the means of quantitative variables across years. Trends in mortality and Tkd50 measurements from rural to urban zones, and trends in the distribution of species and *Kdr* 1014F alleles frequencies over time were assessed using Jonckheere-Terstra k-sample test of the null that all samples come from a common population against the alternative that

there is a trend. Variation in mortality and *Kdr* 1014F alleles frequencies across Health Districts was examined using the Anderson-Darling k-sample test of the null that all samples come from a common population against the alternative that exist differences in distributions. Non-overlapping 95% confidence intervals (CI) or p-values < 0.05 were considered as statistically significant. In order to show the relationship between localities [respectively variables], the quality of the representation of the localities [respectively variables], as well as, the correlation between localities [respectively variables] and the dimensions; multiple factor analysis (MFA) was performed using FactoMineR package. Health district was added as a supplementary variable.

All the analyses were performed using the R 3.5.0 software (R Development Core Team, 2018). R packages used include: kSamples, boot, shapefiles, maps, mapdata, sp, lme4, spdep, maptools, ggplot2, ggmap, geoR, geoRglm, rgdal, shapefiles, RgoogleMaps, spacetime, FactoMineR, plus other basic packages.

Results

Spatio-temporal distribution of species of the *Anopheles gambiae* complex

A total of 2,637 *An. gambiae s.l.* specimens from 13 representative localities were identified down to the species, including 1,299 specimens from the Garoua HD, 710 specimens from the Pitoa HD and 628 specimens from the Mayo Oulo HD (Table 2). The distribution of the sibling species in the surveyed locations over the 5 years longitudinal survey is presented in Fig 2 and the temporal variations of their proportions across the three HDs in Fig 3. Three species of the *An. gambiae* complex were identified; *An. arabiensis* was predominant (67.6%), followed *An. coluzzii* (25.4%) and *An. gambiae* (7%). The three species showed variable spatial and temporal distribution patterns. *An. arabiensis* was widespread and present at variable proportions (14–98%) across the 13 study sites and all over the study period. *An. coluzzii* which was mostly found in the 10 study sites within the Garoua and Pitoa HDs from 2011 to 2013 (6–98%), was subsequently represented in all the 13 sites in 2014, including the 3 study sites of the Mayo Oulo HD. In some urban settings such as Kollere, Kanadi, Plateau and Ouro housso in the Garoua HD, *An. coluzzii* was a major species representing up to 36% of the analyzed samples,

Table 2. Number of *Anopheles gambiae s.l.* specimens tested/analysed per health district per year.

Experiment	Health District	Number of mosquitoes tested									
		2011		2012		2013		2014		2015	
		T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
Susceptibility tests	Garoua	686	177	996	300	1306	492	1322	565	1331	740
	Pitoa	570	160	794	325	723	172	775	275	1031	273
	Mayo Oulo	315	74	173	50	368	112	534	186	610	138
	Total	1,571	411	1,963	675	2,397	776	2,631	1,026	2,972	1,151
Species identification	Garoua		87		331		372		451		58
	Pitoa		129		145		157		191		88
	Mayo Oulo		90		151		146		158		83
	Total		306		627		675		800		229
<i>Kdr</i> genotyping	Garoua		87		257		252		259		58
	Pitoa		128		110		120		132		88
	Mayo Oulo		90		133		144		134		83
	Total		305		500		516		525		229

T: Test mosquitoes (i.e. exposed to deltamethrin impregnated papers); C: Control mosquitoes (i.e. not exposed to deltamethrin impregnated papers)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.t002>

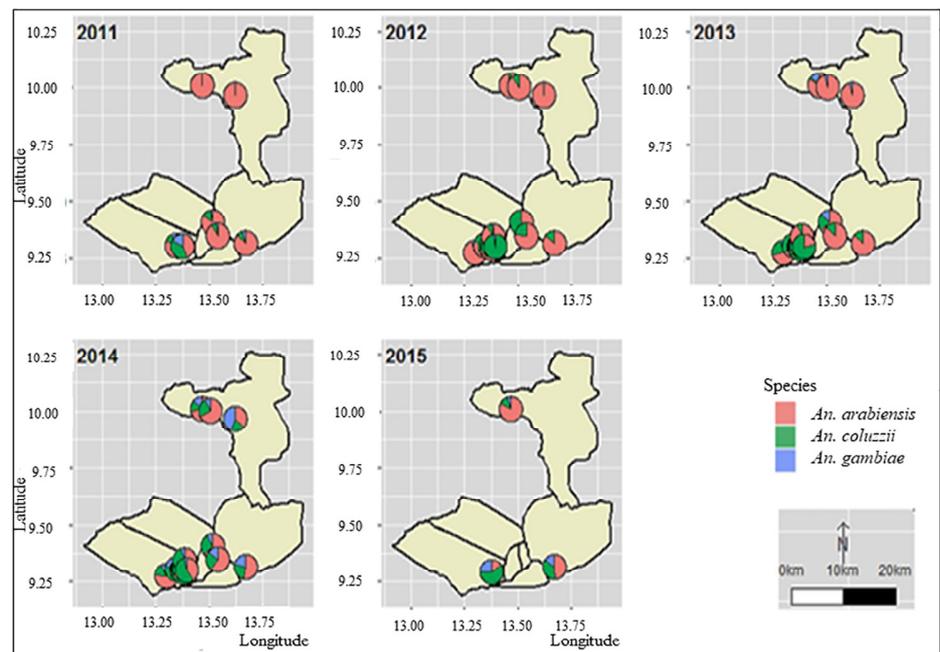


Fig 2. Distribution of species among *An. gambiae* s.l. samples from 2011 to 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g002>

while it was less represented in rural settings of the Mayo Oulo HD (7%). From 2011 and 2013, *An. gambiae* was found only in 3 study sites among the 13 survey locations, and at very low frequencies (<5%). Subsequently in 2014, this species became widespread across all the study sites, with up to 35% frequencies in few locations (e.g. Mayo Oulo, 2014). In 2015, species distribution in the 3 three selected sentinel sites reflected the heterogeneity observed across the three HDs, i.e.:

- in Ouro Housso I (Garoua HD), there was a predominance of *An. coluzzii* (59%) HD, followed by *An. gambiae* 26% and *An. arabiensis* (15%);
- in Be-centre (Pitoa HD), half of the tested mosquitoes were of *An. arabiensis* species (49%), followed by *An. coluzzii* (35%) and *An. gambiae* (12%);
- in Bala (Mayo Oulo HD), 84% specimens were *An. arabiensis* versus 11% and 5% *An. coluzzii* and *An. gambiae*. *An. gambiae* which was not identified in this site between 2011 and 2012 appeared in 2013, and in two other localities of the Mayo Oulo HD as well.

Considering the overall temporal variations of species proportions in each HD, three different patterns of species distributions were observed (Fig 3). In the Garoua HD, the average frequencies of *An. arabiensis* was 55–63% between 2011 and 2014, then it dropped to 15.5% in 2015. Conversely, the frequencies of *An. coluzzii* increased from 24% in 2011 to 59% in 2015, although it sporadically declined to 28% in 2014. The frequencies of *An. gambiae* showed a parabola-like variation, with the lowest values recorded in 2012–2013 (3%) and the highest in 2011 and 2015 respectively (12% and 26%). In the Mayo Oulo HD, the frequencies of *An. arabiensis* was mostly higher than 80% over the years, except in 2014 when it dropped to 58%. The frequencies of *An. coluzzii* and *An. gambiae* were variable from year to year, i.e. 0% in

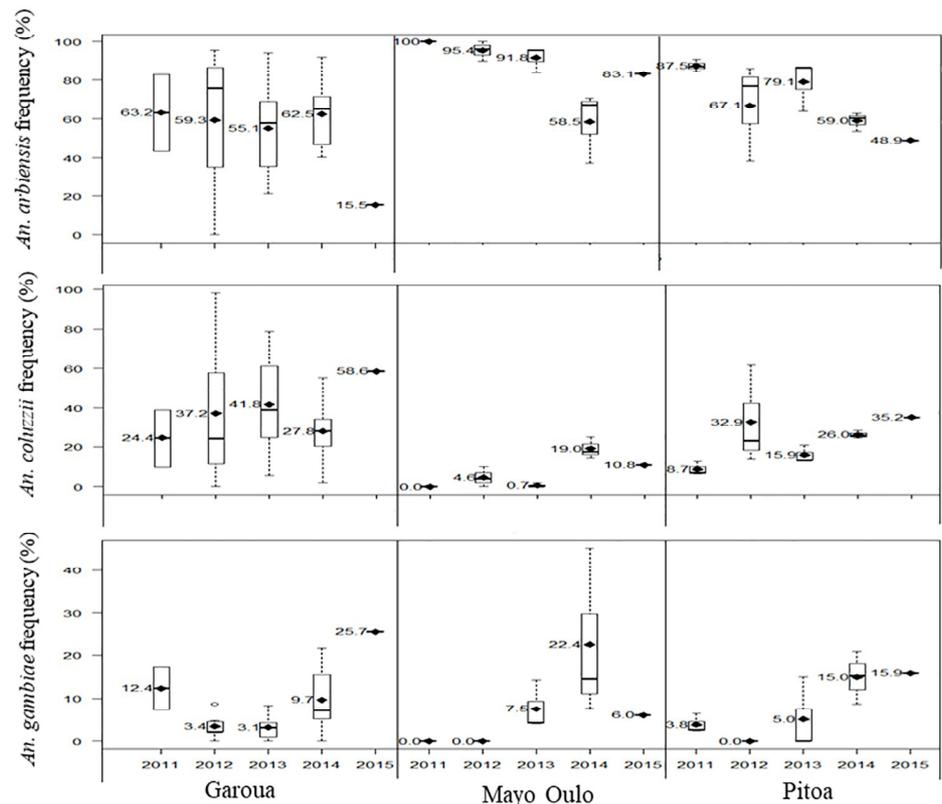


Fig 3. Temporal evolution of *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae* species proportions across the Garoua, Mayo Oulo and Pitoa Health districts (2011–2015).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g003>

2011, increased up to 19–22% between 2012 and 2014, then decreased to 6–11% in 2015. In the Pitoa HD, the frequencies of *An. arabiensis* progressively declined from 87% in 2011 to 49% in 2015, while the proportions of *An. coluzzii* and *An. gambiae* increased from 9% to 35% and from 4% to 16% respectively. However, these variations were nonlinear.

When considering the data from the three HDs together, there was a significant decrease in the overall proportion of *An. arabiensis* between 2011 (84%) and the following years from 2012 to 2015 (53–68%) (Jonckheere-Terstra test statistic or $JT = 660, P = 0.0028$). The proportion of *An. coluzzii* increased from 11% in 2011 to 25–33% during the following years ($JT = 622, P = 0.017$), while the frequencies of *An. gambiae* which was 1–5% between 2011 and 2013 changed to 13–14% in 2014–2015.

Spatio-temporal distribution of deltamethrin resistance

A total of 100 susceptibility tests were conducted during five years from 2011 to 2015, with 11, 534 mosquitoes exposed to 0.05% deltamethrin and 4, 039 control mosquitoes (Table 2). The numbers of the surveys conducted in each study site and the status of deltamethrin resistance in tested *An. gambiae s.l.* populations from 2011 to 2015 are provided in Table 3. Of the 24 localities retained for the study, yearly screening of mosquito susceptibility during the five-year study period was conducted 5 times in 11 sites; 4 times in 10 sites and 1–2 times in the remaining 2 sites. Apart from 2011 when only 13 populations were tested, the number of populations

Table 3. Layout of the monitoring and status of deltamethrin resistance in tested *An. gambiae s.l.* populations from 211 to 2015.

Health district	Locality	Mortality rates ^(Resistance status)				
		Nov. 2011	Oct. 2012	Oct. 2013	Oct. 2014	Oct. 2015
Garoua	Kanadi II	51.0 _(R)	63.0 _(R)	27.0 _(R)	40.0 _(R)	35.0 _(R)
	Kanadi I	ND	86.1 _(R)	85.6 _(R)	47.0 _(R)	61.9 _(R)
	Ouro housso	68.0 _(R)	46.2 _(R)	45.6 _(R)	32.0 _(R)	37.7 _(R)
	Lainde II	ND	75.0 _(R)	72.8 _(R)	48.0 _(R)	25.00 _(R)
	Djamboutou II	89.50 _(R)	70.4 _(R)	54.4 _(R)	69.0 _(R)	61.4 _(R)
	Plateau	ND	65.0 _(R)	42.2 _(R)	52.0 _(R)	44.6 _(R)
	Ouro lawane	ND	56.9 _(R)	64.4 _(R)	53 _(R)	24.4 _(R)
	Mbilga	ND	95.5 _(PR)	86.0 _(R)	67.0 _(R)	88.9 _(R)
	Kollere	22.0 _(R)	54.8 _(R)	43.0 _(R)	45 _(R)	39.0 _(R)
	Ouro garga	99.0 _(S)	76.5 _(R)	75.5 _(R)	77.0 _(R)	75.0 _(R)
Pitoea	Guizigare*	59.1 _(R)	63.0 _(R)	74.3 _(R)	64.2 _(R)	63.0 _(R)
	Pene	ND	90.8 _(PR)	74.5 _(R)	93.2 _(PR)	38.5 _(R)
	Boulgou*	ND	97.6 _(PR)	87.7 _(R)	98.7 _(S)	93.0 _(PR)
	Nassarao-be	ND	95.3 _(PR)	84.3 _(R)	95.7 _(PR)	75.5 _(R)
	Lombou	91.2 _(PR)	94.2 _(PR)	70.2 _(R)	93.7 _(PR)	51.1 _(R)
	Be-centre	78.9 _(R)	90.3 _(PR)	85.5 _(R)	74.0 _(R)	83.2 _(R)
	Mbolom	82.0 _(R)	89.6 _(R)	64.7 _(R)	UN	46.60 _(R)
Mayo Oulo	Mayo oulo	92.5 _(PR)	93.0 _(PR)	95.8 _(PR)	69.0 _(R)	83.5 _(R)
	Doumou	ND	ND	81.7 _(R)	49.0 _(R)	64.50 _(R)
	Matra	ND	ND	ND	86.0 _(R)	ND
	Maboni	ND	ND	80.0 _(R)	61.0 _(R)	ND
	Dourbeye*	82.5 _(R)	98.6 _(S)	85.9 _(R)	75.0 _(R)	78.9 _(R)
	Bossoum*	79.0 _(R)	UN	100 _(S)	81.0 _(R)	75.3 _(R)
	Bala	84.6 _(R)	100 _(S)	90.00 _(PR)	86.0 _(R)	81.6 _(R)
Total	24	13	19	23	23	22

Resistance_(R): Mortality rates < 90%

Probable resistance_(PR): 90% ≥ Mortality rates ≤ 98%

Susceptible_(S): Mortality rates > 98%

*Sites displaying sporadic variations of resistance status

ND: No data

Oct.: October; Nov.: November

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.t003>

surveyed each year varied between 19 and 23 depending on the sample size of larvae collected from field breeding sites.

The geospatial pattern of *An. gambiae s.l.* resistance to deltamethrin in the prospected localities based on the WHO's classification is presented in Fig 4. In 2011, only one out of the 13 tested *An. gambiae s.l.* populations was found susceptible to deltamethrin (Ouro-garga; Garoua HD), while two populations exhibited possible resistance (Mayo-Oulo in the Mayo Oulo HD; and Loumbou in the Pitoea HD). Ten populations displayed resistance, with different ranges of mortality rates according to the HDs; i.e. 22–89.5%, 59–82% and 79–85% in the Garoua, Pitoea and Mayo Oulo HDs respectively.

Afterward, the status of deltamethrin resistance was variable from year to year in 11 localities including 2 localities of the Garoua HD (Mbilga and Ouro Garga), 5 localities of the Pitoea HD (Pene, Boulgou, Nassarao-Be, Lombou, and Be-Centre) and 4 localities of the Mayo Oulo HD (Mayo Oulo, Dourbeye, Bossoum and Bala). In 7 of the 11 localities, the resistance status

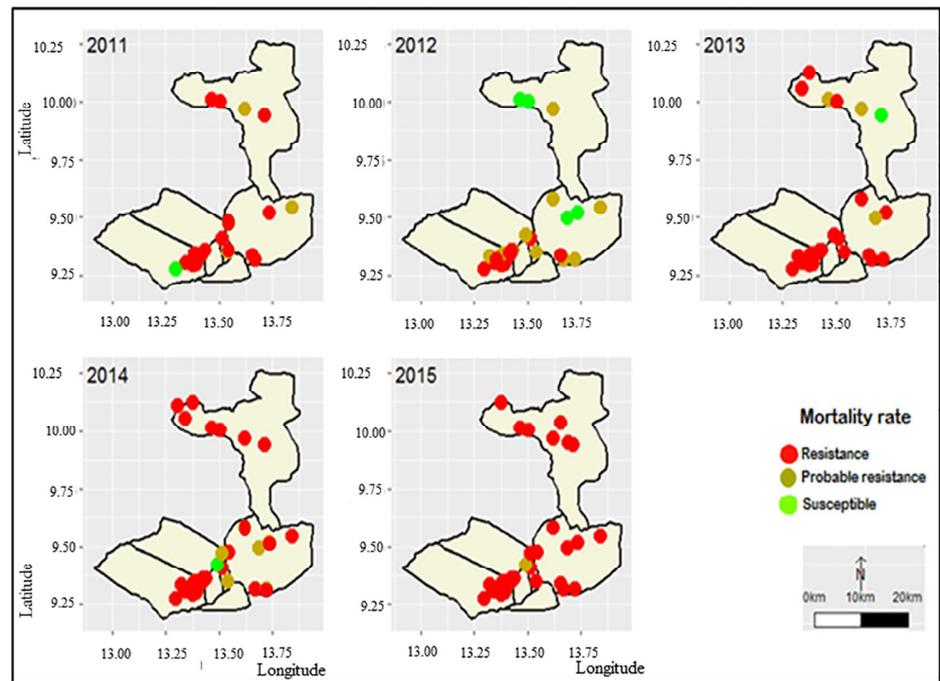


Fig 4. Spatial and temporal distribution of deltamethrin resistance in the study sites (2011–2015).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g004>

shifted from susceptible/possible resistance in 2012 (>90%) to confirmed resistance in 2013 (39–89% mortality rates), suggesting a broad evolvement of resistance at that period. In Ouro Garga (Garoua HD), resistance appeared earlier in 2012. In Bossoum (Mayo Oulo HD) the three resistance status (susceptible/possible resistance/resistance) were alternatively recorded from year to year. In most of the localities of the Pitoa HD, the status of resistance varied between possible and confirmed resistance. The 13 remaining mosquito populations mostly in the Garoua HD were found resistant during the whole study period, with mortality rates however decreasing in 11 populations from 46–86% in 2011 to 24–62% in 2015. Lastly in Kollere (Garoua HD) and Guizigare (Pitoa HD), the mortality rates all over the study period remained low (22–55%) and moderate (59–74%) respectively.

Fig 5 shows differential profiles of resistance according to the ecological features, based on mortality rates (TM24) and knockdown times for 50% (Tkd50) of tested mosquitoes. During each survey-year, deltamethrin resistance was observed to gradually increase from the rural (93–70% mortality rates) to peri-urban (77–52% mortality rates) and urban settings (mortality = 64–44%) ($JT = 5282, P < 0.0001$). The decrease in mortality rates was associated with a significant increase in Tkd50 ($JT = 5230, P < 0.0001$) across the settings, and years ($JT = 5636, P < 0.001$), corresponding to 24–38 minutes, 27–45 minutes and 38–78 minutes in rural, peri-urban and urban settings respectively.

Spatial autocorrelation of mortality measurements in each of the survey-years from 2012 to 2015 was detected for all the localities in the study HDs; suggesting association in deltamethrin resistance between neighboring clusters and years of data collection ($P < 0.0001$), except at the beginning of the study in 2011 ($P = 0.2296$) (Table 4).

When the yearly data from all the surveyed localities per HD were pooled, deltamethrin resistance frequencies were significantly increased ($P < 0.005$) (Table 5, Fig 6). In the Garoua

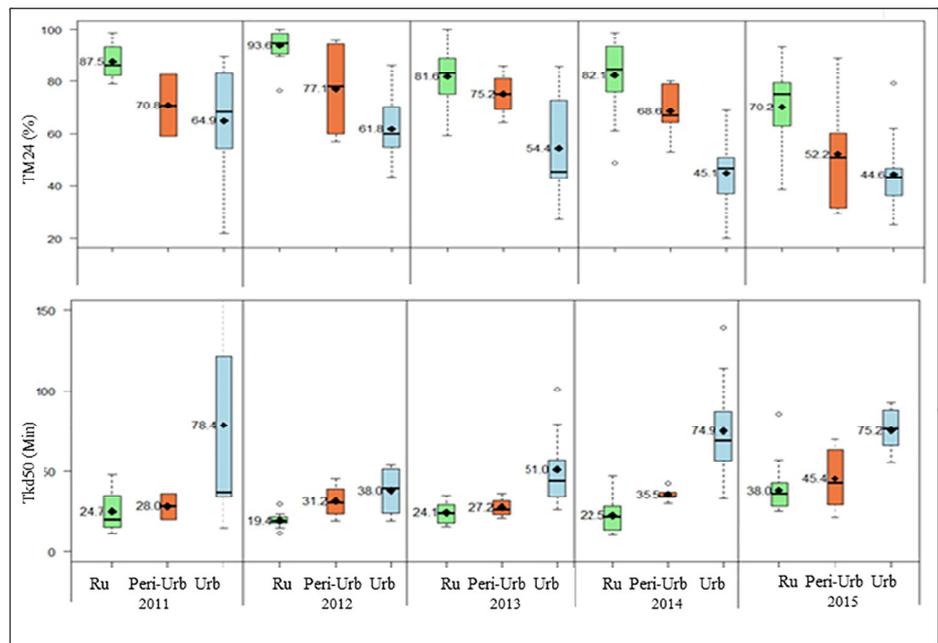


Fig 5. Spatial and temporal distribution of mortality rate (TM 24) and Tkd50 (knockdown times) according to the ecological features (2011–2015). Ru: rural settings; Peri-Urb: peri-urban settings; Urb: urban settings. Tkd50: time of knock-down for 50% tested mosquitoes; TM24: mortality rates 24 hours post exposure to insecticide.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g005>

HD, the mortality rates gradually decreased from 70% in 2011 to approximately 50% in 2015. However in the Pitoa and Mayo Oulo HDs, the decrease of mortality rates over the years was nonlinear. The highest mortalities in these HDs were recorded in 2012 (91–97%) and the lowest in 2014–2015 (65–72%).

Table 4. Spatial autocorrelation between localities through the years.

Variable	Year	Moran's Index		Standard deviation	P-value
		Observed	Expected		
TM24	2011	-0.0956331	-0.05263158	0.03579484	0.2296
	2012	-0.2512021	-0.03703704	0.02657929	<0.0001
	2013	-0.2253236	-0.03571429	0.02681102	<0.0001
	2014	-0.1495050	-0.02941176	0.02221648	<0.0001
	2015	-0.1654212	-0.02857143	0.02158000	<0.0001

TM24: mortality rate (%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.t004>

Table 5. Trends of overall district mortality rates from 2011 to 2015.

HD	2011 Mortality (95% CI)	2012 Mortality (95% CI)	2013 Mortality (95% CI)	2014 Mortality (95% CI)	2015 Mortality (95% CI)	P-value
Garoua	70.6 (55.9–85.3)	68.7 (60.3–77.1)	60.8 (51.0–70.6)	54.8 (46.4–63.3)	48.7 (40.2–57.3)	0.00015
Pitoa	83.5 (75.2–91.6)	91.5 (84.3–96.5)	79.1 (73.8–84.5)	87.3 (80.7–92.8)	65.5 (57.3–73.6)	0.0016
Mayo Oulo	84.6 (79.6–89.5)	97.2 (93.8–100.0)	88.9 (83.1–94.7)	72.4 (63.0–82.0)	77.3 (73.1–81.6)	0.0041

HD: Health District

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.t005>

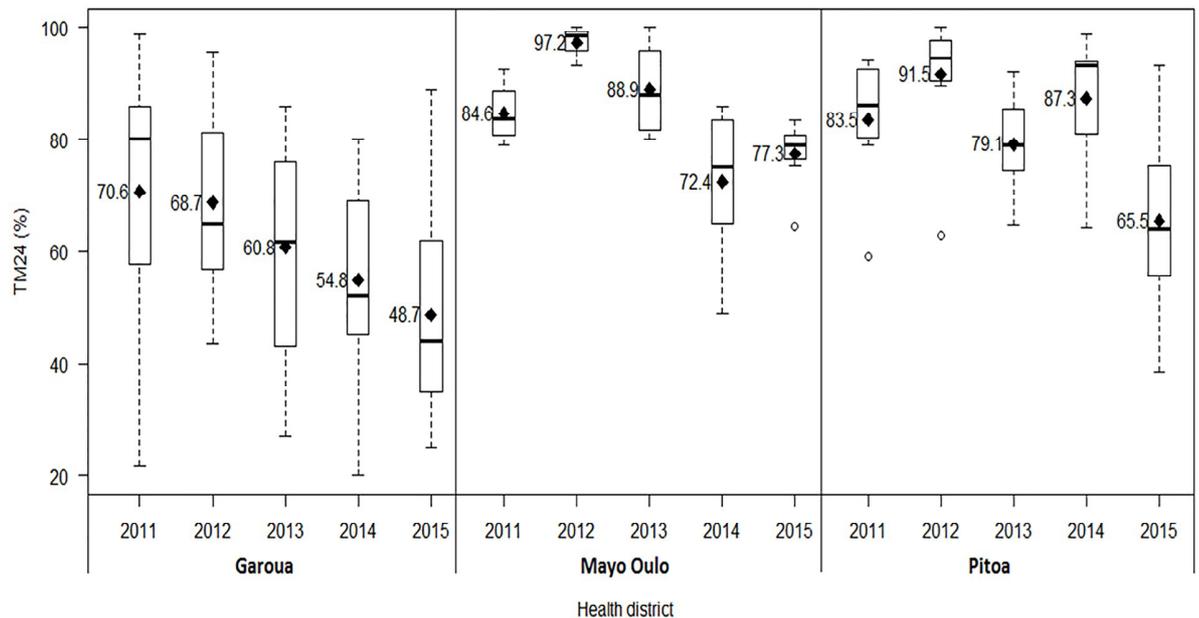


Fig 6. Temporal evolution of deltamethrin resistance in the study health districts (2011–2015). TM24: mortality rates 24 hours post exposure to insecticide.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g006>

Although the profiles of resistance were variable from one HD to another ($AD = 21.83, P < 0.0001$), a marked resistance increase was observed over the five years when considering the three HDs together ($JT = 5638, P < 0.001$).

Spatio-temporal evolution of *Kdr* 1014 allelic frequencies in *Anopheles gambiae s.l.*

Genotyping for the *Kdr* 1014 mutations was successfully performed on 2,077 mosquito specimens from 12 locations across the three HDs, including 913 specimens from the Garoua HD, 580 from the Pitoa HD and 584 from the Mayo Oulo HD (Table 2).

Both *Kdr* L1014F and L1014S alleles, as well as the wild type L1014L allele were found in *An. coluzzii* and *An. arabiensis*, while only the *Kdr* L1014F and the wild type L1014L alleles were found in *An. gambiae*. The *Kdr* L1014F allele was mostly carried by the *An. coluzzii* (64.87%), followed by *An. gambiae* (54.30%) and *An. arabiensis* (17.59%), while the *Kdr* L1014S occurred only in *An. coluzzii* and *An. arabiensis* at very low frequencies. The *Kdr* L1014F allele was widespread, with a higher frequency (31.5%) compared to the *Kdr* L1014S allele (2%).

There were marked differences in *Kdr* L1014F frequency between HDs ($AD = 5.175, P = 0.01431$), associated with an increase over the years ($JT = 620, P = < 0.001$); the highest frequencies being recorded in the Garoua HD (Fig 7).

Multiple factor analysis of resistance variations over the years

Multiple factor analysis of the data on *An. gambiae s.l.* mortality rates to deltamethrin, species distribution (*An. arabiensis*, *An. coluzzii*, *An. gambiae*) and the *Kdr* L1014F allelic frequencies over the 5 years study period were done for 12 localities where all the three data sets were available. The graphs of localities (individual factor map) and variables (correlation circle) show

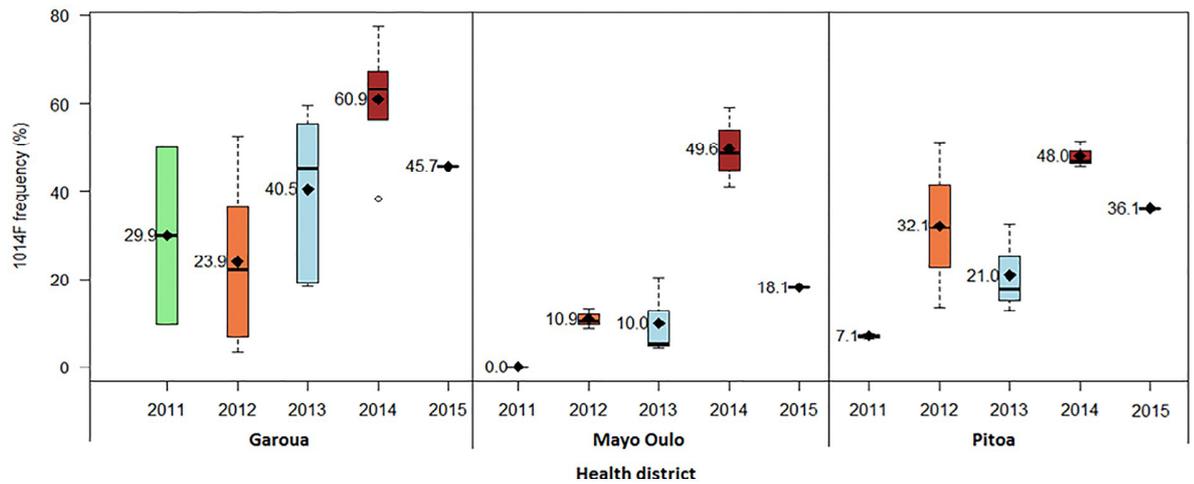


Fig 7. Variations in frequencies of knockdown resistance (*Kdr* L1014F) allele in *An. gambiae* s.l. populations (2011–2015).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g007>

the relationship between localities, the quality of the representation of the localities, as well as the correlation between localities and the dimensions (Fig 8).

Generally, localities (and even their interaction with years) from the same HD were closer to each other, and were quite separated from those belonging to other HDs. The correlation circle shows a strong positive linear correlation between the mortality rates (TM24) and

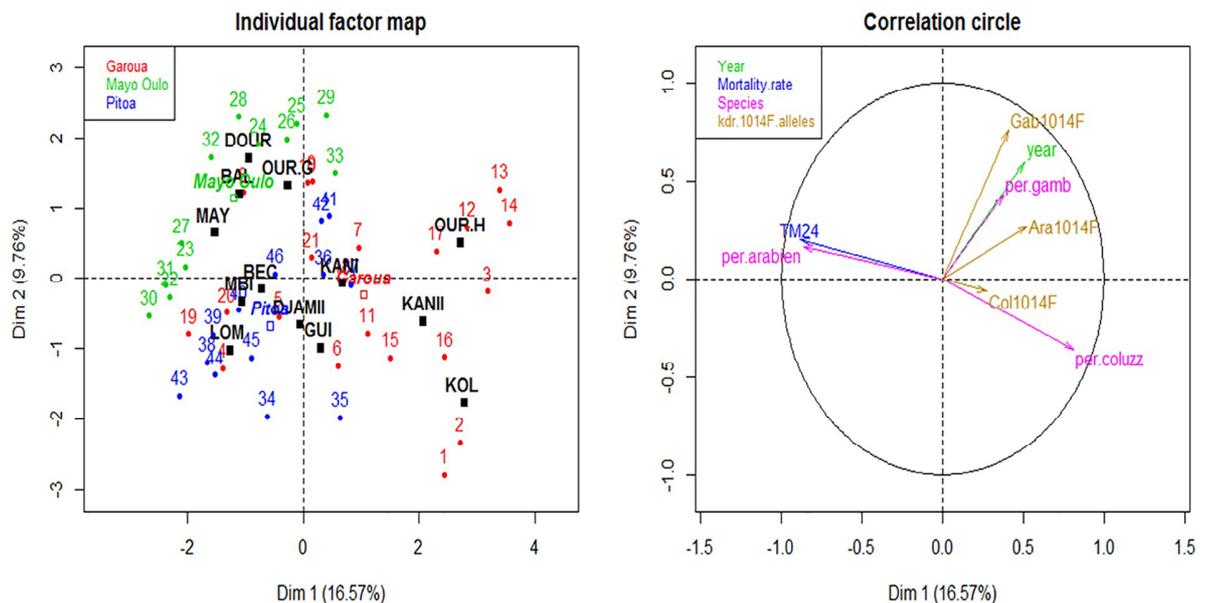


Fig 8. Multiple factor analysis (MFA): Representation of the individuals (localities) and variables on the first plane. Individual factor map showing the interaction between localities and years, coloured according to health districts (left). Correlation circle (right) is for the following sets of quantitative data: mortality rates, *Kdr* L1014F allele, species composition, and year. Health district was added as a supplementary variable. The analysis on the sets of data over the 5 years study period were done in localities where all the sets of data were available. TM24: mortality rates 24 hours post exposure to insecticides; per.arbien: percentage of *An. arabiensis*; per.coluzz: percentage of *An. coluzzii*; per.gamb: percentage of *An. gambiae*; col1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. coluzzii*; Col L1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. coluzzii*; Ara L1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. arabiensis*; Gab 1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. gambiae*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212024.g008>

occurrence of *An. arabiensis*. Conversely, a strong negative correlation was observed between TM24 and proportion of *An. coluzzii*, and a weak negative correlation between TM24 and the proportion of *An. gambiae*. Also, there was a negative correlation between TM24 and the frequencies of *Kdr* L104F allele in *An. coluzzii* (Col1014F) and *An. arabiensis* (Ara1014F) respectively, with a weaker negative correlation between TM24 and the frequencies of *Kdr* L104F allele in *An. gambiae* (Gab1014F). TM24 was also weakly negatively related to year. The frequency of variables Col1014F (*Kdr* L104F frequencies in *An. coluzzii*), followed by per.gamb (proportion of *An. gambiae*) and Ara1014F (*Kdr* L104F frequencies in *An. arabiensis*) contributed less to the construction of the first and second dimensions.

Discussion

Pyrethroid resistance in malaria vectors belonging to the *Anopheles gambiae* complex has become a major concern for malaria control in Cameroon, since it was first reported in 2003 [34]. So far, the trend of insecticide resistance was monitored through small-scale surveys or through retrospective and published data collected across the country Regions [19, 21, 35]. It is noteworthy that this study is the very first large scale 5-year longitudinal survey of insecticide resistance in malaria vectors from Cameroon. Data collected from 2011 to 2015 in 24 locations revealed a significant decrease in *An. gambiae s.l.* mortality rates to deltamethrin, suggesting increased frequency of resistance to this pyrethroid insecticide. However, there was a considerable heterogeneity in the resistance levels between localities and survey years. Such heterogeneity has also been reported in previous studies on spatial and temporal trends of insecticide resistance in field mosquito populations [36–39]. Considering the fact that pyrethroid insecticides have been commonly used in a number of the study sites and LLINs were distributed two times across the HDs at universal coverage in 2010 and 2015 in the study HDs, field populations of *An. gambiae s.l.* might be exposed to different patterns of selection pressure from one locality to another and from one year to another. Also, several other factors might influence the status of insecticide resistance, including the number of genes interacting to produce the phenotype of resistance, the dominance relationship of the alleles as well as the size and proportion of the population affected by insecticide treatments as suggested by Chareonviriyaphap et al. [40]. Furthermore, there is mounting evidence that when the level of resistance is high, mosquito mortality rates may not reflect changes in population resistance [41]. In this longitudinal study, the number of populations tested each year varied from 13 to 23, depending on the productivity of larval breeding sites. Some susceptibility test data were excluded from the analysis because fewer than 40 mosquitoes were tested. From the analyzed data, 10 out of the 13 populations tested at the beginning of the study in 2011 were found resistant to deltamethrin and the recorded mosquito mortality rates (60–90% in most of samples) revealed moderate to low levels of resistance in 7 of these populations, according to the stratification of Strode et al. [41] (Moderate: 25–80% mortality rate and < 25% *kdr* frequency; Low: >80% mortality rate and < 25% *kdr* frequency). During the 5 consecutive years of the study, the decrease of mortality rates alongside increase in knockdown times and the frequencies of *kdr* L1014F allele suggests significant changes toward high resistance as classified by Strode et al. [41] (<25% mortality rates, < 25% or >80% *kdr* frequency) in the three study HDs. This spatial and temporal development of deltamethrin resistance in *An. gambiae s.l.* could be linked to combined effects of environmental factors such as insecticide use in agriculture and in domestic hygiene tools such as ITNs, aerosol insecticide sprays, vaporizing mats, and mosquito coils [35, 42], as well as the factors inherent to the genetics and biology of the target vector species such as the mutations, migration and selection of resistance mechanisms [23]. Indeed, the extensive use of insecticides in both public health and cotton cultivation has been shown to

affect the susceptibility of local malaria vector populations [35]. Among the 24 surveyed settings, resistance was more frequent in urban settings than in peri-urban and rural cultivated settings. In urban settings including most of the study sites of the Graoua HD, the selection pressure might have originated mainly from LLINs which was the main insecticide based mosquito control intervention during the study period. In these areas, *An. arabiensis* occurred in the same proportions as the more anthropophilic sibling species *An. coluzzii*. The latter species would mostly get into contact with insecticide treated substrates in an attempt to acquire human blood meals in the face of insecticide treatment [43].

The multifactorial analysis revealed a strong positive linear correlation between the mortality rates to deltamethrin and occurrence of *An. arabiensis* conversely to a strong negative correlation between the mortality rates and the proportions of *An. coluzzii*, and the proportion of *An. gambiae*. Also, there was a negative correlation between mortality rates and the frequencies of *Kdr* L104F allele in *An. coluzzii* and *An. arabiensis* respectively. These data suggest that the increase in the frequencies *An. coluzzii*, *An. gambiae* and the *Kdr* L1014 mutations led to the increase of deltamethrin resistance in the study areas. In rural areas including most of the study sites in the Mayo Oulo and Pitoa HDs where *An. arabiensis* was the predominant species, the high plasticity of biting habit between human and alternative hosts including livestock might reduce the frequency of its contact with treated substrates and subsequent exposure to insecticide selection pressure. These could explain the positive correlation of *An. arabiensis* frequencies with susceptibility to deltamethrin. The differential responses of vector species to interventions might have influenced the distribution of pyrethroid resistance across the country, and impacted on the dynamics of malaria transmission as reported in Burkina Faso [44].

The current study update the information on the distribution of members of the *An. gambiae* complex across the three study HDs and distribution of two important target-site resistance alleles (*Kdr* L1014F and L1014S) in these populations. Overall, *An. arabiensis* appears to be the predominant species in the study areas, followed by *An. coluzzii* and *An. gambiae*. The distribution of *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae* in the study sites is consistent with previous work carried out in North Cameroon [34, 35, 45–47]. *An. arabiensis* is known to colonize tropical areas from West to East Africa characterized by an accentuated drought of precipitations; meanwhile *An. coluzzii* and *An. gambiae* are highly adaptive malaria vectors colonizing both tropical and equatorial areas [48]. The distribution of these two species is associated with many factors such as the quality of the water [49], climate, vegetation, degree of urbanization [47] and insecticide pressure [42]. Accordingly, data from this study revealed increasing prevalence of *An. coluzzii* in surveyed locations, suggesting its progressive adaptation and dispersion in the north region of Cameroon. In addition, biotic interactions between *An. coluzzii* and *An. gambiae* occurring at larval and adult stages such as competition, predation and parasitism can further determine the structure of the species populations and have an impact on the balance and local distribution of species as reported in Burkina Faso [50, 51]. The urbanization gradient of the three surveyed HD could also explain the increase of *An. coluzzii* in collected samples. The ability of *An. coluzzii* to adapt in polluted breeding sites with predominance of organic matters in the urban agglomerations of Cameroon has been highlighted by Tene Fossog *et al.* [52]. Accordingly and also due to high altitude on hills (≈ 470 m), *An. coluzzii* was counterbalanced by *An. gambiae* in the Mayo Oulo rural HD, *An. coluzzii* being mostly adapted to altitudes ≤ 430 m [53].

On the other hand, the resistance phenotype was associated with an increase of knockdown times, suggesting the *Kdr* 1014 mutations among the mechanisms involved in deltamethrin resistance. Indeed, both L1014F and L1014S *Kdr* alleles were evidenced in *An. coluzzii* as well as in *An. arabiensis*, although L1014F allele occurred at a much higher frequency in *An. coluzzii* and *An. gambiae* than in *An. arabiensis*, in agreement with the previous reports [54–59]. To

our knowledge, this is the first report of *kdr* L1014F allele at frequencies up to 65% in *An. coluzzii*, 54% *An. gambiae* and 18% *An. arabiensis* from North Cameroon and the first report of *Kdr* L1014S (2% frequency) in *An. coluzzii* and *An. arabiensis* from the same Region. The co-occurrence of both mutations in *An. coluzzii* and *An. gambiae* has widely been reported in the southern equatorial and Littoral Regions of Cameroon [21], but not in *An. arabiensis* which is the predominant malaria vector species in the Northern savanna Region. From 2011 to 2015, different trends of *kdr* L1014F frequencies were recorded in the three HDs, with variations from year to year. But in general, higher frequencies were recorded in 2014 (48–61%), followed by a decrease in 2015 (18–46%), versus 0–30% in 2011.

The reasons for these fluctuations are not clear, but the distribution of *kdr* 1014 mutations is known to differ among species of the *An. gambiae* complex including *An. gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* [60]. Many studies reported the *kdr* L1014F and L1014S mutations at high frequency within *An. gambiae* and *An. coluzzii* populations from the southern equatorial and littoral regions of Cameroon [21]. Over recent years, the frequencies of these mutations in specific settings significantly increased within both *An. coluzzii* and *An. gambiae* [21]. But very few was known about the prevalence and the spatial and temporal distribution of the *Kdr* L1014F and L1014S mutations in species of the *An. gambiae* complex in North Cameroon. Previous studies in Pitoa recorded the *Kdr* L1014F allele only in *An. coluzzii* at 34% frequency, and only in the heterozygous state. The *Kdr* L1014S allele was not found in any of the tested *An. arabiensis* nor in *An. coluzzii* specimens [5]. Chouaibou et al. [35] reported both *kdr* L1014F and L1014S alleles at very low frequencies (1/45, 1.1%) in *An. gambiae s.s.* specimens from Pitoa. From that time until 2011, no *Kdr* L1014 mutation has been reported in *An. arabiensis* from North Cameroon. The present study reveals that the *Kdr* L1014F has since spread across the three study HDs and is now observed at relatively high and similar frequencies (20–65%) across the southern equatorial and northern savanna regions of Cameroon. These findings are of great significance, since the spread of these mutations, in addition to metabolic resistance already reported in North Cameroon [54] may lead to a drastic increase of the frequencies and intensity of insecticide resistance in local malaria vector populations. The intensity of deltamethrin resistance in field samples of *An. gambiae s.l.* from Pitoa was found to play a major role in the gradual decrease of LifeNet bio-efficacy after serial washing, emphasizing the importance of monitoring insecticide resistance and its impact on vector control efficacy [5].

In this study, the allelic frequencies of *Kdr* L1014F varied within the three species with particularly high frequencies in *An. coluzzii*. Similar trend was recently observed in Manoka and Youpwe in the littoral region of Cameroon where *An. coluzzii* is the main malaria vector [61]. The rapid diffusion of the *Kdr* L1014F mutation in *An. coluzzii* and *An. gambiae* in Cameroon was suggested to have occurred by mutual introgression and via independent mutation events [23]. The origin of the *Kdr* L1014S mutation *An. coluzzii* and *An. arabiensis* from North Cameroon could also follow the same way of dissemination. In addition, transport of humans and goods across the country could favor the dissemination of mosquitoes carrying resistance alleles from one region to another. Sequence analysis of the intron-1 of the voltage-gated sodium channel gene flanking the *Kdr* locus may confirm whether the mutations recorded in *An. arabiensis*, *An. gambiae* and *An. coluzzii* from North Cameroon have evolved as *de novo* mutations or introgression from one species to another. The phenotypic outcomes of the co-occurrence of both L1014F and L1014S *Kdr* alleles, together with enzyme detoxification need also to be further examined.

Prior to this study, increased activity of cytochrome P450s monooxygenases was evidenced in *An. gambiae s.l.* populations from North Cameroon, using microplate enzyme assays on individual mosquitoes. This phenomena was mainly attributed to the selection of metabolic

genes through the use of different pesticides in crop protection [54]. Cytochrome P450s can mediate resistance to all classes of insecticides, increased enzyme activity can be brought about by gene amplification, upregulation, coding sequence mutations, or by a combination of above mentioned mechanisms. More precisely, metabolic genes including *CYP4G16*, superoxide dismutases *SOD2* and *SOD3*, glutathione S-transferase *GST51* and thioredoxin dependent peroxidase *TPX4* were found to be involved in the detoxification process of deltamethrin in wild populations of *An. arabiensis* from Pitoa [22]. Coupled with the increase in the *Kdr* L1014F frequencies recorded in the present study, there is evidence of multiple insecticide resistance mechanisms in surveyed *An. gambiae s.l.* populations. These data confirmed the occurrence of multiple insecticide resistance mechanisms previously reported in several *An. gambiae s.l.* populations from Cameroon [19]. In Niger, large-scale distribution of LLINs led to an increased frequency of *Kdr* L1014F [11]. The use of pyrethroid insecticides at the household level and in small vegetable cultivation areas in Mali has also been reported to drive the *Kdr* L1014F to a higher frequency [62]. At operational level, metabolic-based resistance mechanisms in *An. funestus* were directly incriminated to the failure of pyrethroid insecticides to control malaria in South Africa [63]. It is likely that the dynamics of the *Kdr* 1014F allele, together with metabolic-based resistance in the three species of the *An. gambiae* complex induce the decline of LLINs effectiveness in North Cameroon in agreement with Strode *et al.* [41]. Indeed, malaria transmission in the Garoua, Pitoa and Mayo Oulo HDs remains very high regardless the use of LLINs, and it is mainly led by species of the *An. gambiae* complex, followed by *An. funestus*, *An. rufipes*, *An. paludis* and *An. pharoensis* [64]. Although no evidence of an association between infection prevalence or clinical incidence of malaria with higher pyrethroid resistance in vectors has been demonstrated yet [65], the pattern of deltamethrin resistance and the persistence of malaria transmission in the study HDs call attention to the urgent need for a resistance management strategy to sustain malaria vector control in North Cameroon.

Conclusion

This study demonstrated rapid increase of deltamethrin resistance in *An. gambiae s.l.* populations from North Cameroon, associated with increasing occurrence of *An. coluzzii* among the sibling species of the *An. gambiae* complex and spread of the *Kdr* L1014F resistance allele. These data are essential for the development of vector surveillance and insecticide resistance management strategies. Trials of innovative vector control tools such as new generations of LLINs that use other insecticide classes or synergists are urgently needed in these areas to ascertain epidemiological and entomological impact in comparison to pyrethroid LLINs.

Supporting information

S1 Dataset. Overall species distribution and *Kdr* L1014F allelic frequencies across the study sites of the Garoua, Pitoa and Mayo Oulo health districts (2011–2015). TM24: TM24: mortality rates 24 hours post exposure to insecticides; per.arbien: percentage of *An. arabiensis*; per.coluzz:percentage of *An. coluzzii*; per.gamb: percentage of *An. gambiae*; col1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. coluzzii*; Col L1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. coluzzii*; Ara L1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. arabiensis*; Gab 1014F: allelic frequency of *Kdr* L1014F in *An. gambiae*. (XLSX)

S1 Table. Breakdowns of *Kdr* L1014F allelic frequencies in *An. arabiensis* from the three study Health districts (2011–2015). f (): allelic frequency (%); N_A : number of analyzed *An. arabiensis* specimens; p(HW): probability of the exact test for goodness of fit to Hardy-

Weinberg equilibrium; in bold: Significant value ($p(\text{HW}) < 0.05$, single test level); F_{is} is calculated according to Weir and Cockerham, 1984. Positive F_{is} indicates a deficit of heterozygotes and negative F_{is} indicates an excess of heterozygotes; ND: not determined because no polymorphism observed and/or $N < 30$.

(DOCX)

S2 Table. Breakdowns of *Kdr* L1014F allelic frequencies in *An. coluzzii* from the three study health districts (2011–2015). f (): allelic frequency (%); N_c : number of analyzed *An. coluzzii* specimens; $p(\text{HW})$: probability of the exact test for goodness of fit to Hardy-Weinberg equilibrium; in bold: Significant value ($p(\text{HW}) < 0.05$, single test level); F_{is} is calculated according to Weir and Cockerham, 1984. Positive F_{is} indicates a deficit of heterozygotes and negative F_{is} indicates an excess of heterozygotes; ND: not determined because no polymorphism observed and/or $N < 30$.

(DOCX)

S3 Table. Breakdowns of *Kdr* L1014F allelic frequencies in *An. gambiae* from the three study health districts (2011–2015). f (): allelic frequency (%); N_a : number of analyzed *An. gambiae* specimens; $p(\text{HW})$: probability of the exact test for goodness of fit to Hardy-Weinberg equilibrium; in bold: Significant value ($p(\text{HW}) < 0.05$, single test level); F_{is} is calculated according to Weir and Cockerham, 1984. Positive F_{is} indicates a deficit of heterozygotes and negative F_{is} indicates an excess of heterozygotes; ND: not determined because no polymorphism observed and/or $N < 30$.

(DOCX)

S1 Fig. Data on *An. gambiae s.l.* susceptibility to 0.05% deltamethrin in the localities of the three health districts from 2011 to 2015. (A): Garoua health district; (B): Pitoa health district; (C): Mayo Oulo health district.

(DOCX)

Acknowledgments

We wish to thank Laurelle Djieukap and Irina Bemba for assistance with DNA extraction, species identification and *Kdr* 1014 genotyping. We acknowledge the technical support of the National Malaria Control Programme (NMCP), Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) and the Biotechnology Center of University of Yaoundé I. We are indebted to the authorities of the Garoua, Pitoa and Mayo Oulo Health Districts, the local communities for their kind collaboration during field work. We are also grateful to Christophe Antonio-Nkondjio for critical review of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Herman Parfait Awono-Ambene, Jude D. Bigoga, Immo Kleinschmidt, Abraham Peter Mnzava, Martin James Donnelly, Etienne Fondjo, Josiane Etang.

Data curation: Stanislas Elysée Mandeng, Wolfgang Eyisap Ekoko, Jérôme Binyang, Michael Piaméu, Lili Ranaise Mbakop, Bertrand Nono Fesuh, Narcisse Mvondo, Raymond Tabue, Philippe Nwane, Jean Claude Toto.

Formal analysis: Stanislas Elysée Mandeng, Bertrand Nono Fesuh, Philippe Nwane.

Funding acquisition: Herman Parfait Awono-Ambene, Tessa Bellamy Knox, Josiane Etang.

Investigation: Stanislas Elysée Mandeng, Herman Parfait Awono-Ambene, Jude D. Bigoga, Wolfgang Eyisap Ekoko, Jérôme Binyang, Michael Piameu, Lili Ranaise Mbakop, Narcisse Mvondo, Raymond Tabue, Philippe Nwane, Jean Claude Toto, Josiane Etang.

Methodology: Stanislas Elysée Mandeng, Herman Parfait Awono-Ambene, Jude D. Bigoga, Wolfgang Eyisap Ekoko, Jérôme Binyang, Michael Piameu, Lili Ranaise Mbakop, Narcisse Mvondo, Raymond Tabue, Philippe Nwane, Rémy Mimpfoundi, Jean Claude Toto, Immo Kleinschmidt, Martin James Donnelly, Etienne Fondjo, Josiane Etang.

Project administration: Herman Parfait Awono-Ambene, Jude D. Bigoga, Tessa Bellamy Knox, Abraham Peter Mnzava, Etienne Fondjo, Josiane Etang.

Resources: Abraham Peter Mnzava.

Software: Bertrand Nono Fesuh.

Supervision: Herman Parfait Awono-Ambene, Rémy Mimpfoundi, Martin James Donnelly, Josiane Etang.

Validation: Jude D. Bigoga, Immo Kleinschmidt, Josiane Etang.

Visualization: Martin James Donnelly.

Writing – original draft: Stanislas Elysée Mandeng.

Writing – review & editing: Herman Parfait Awono-Ambene, Jude D. Bigoga, Wolfgang Eyisap Ekoko, Jérôme Binyang, Michael Piameu, Lili Ranaise Mbakop, Narcisse Mvondo, Raymond Tabue, Philippe Nwane, Rémy Mimpfoundi, Jean Claude Toto, Immo Kleinschmidt, Tessa Bellamy Knox, Abraham Peter Mnzava, Martin James Donnelly, Etienne Fondjo, Josiane Etang.

References

1. WHO. World Malaria Report. In WHO Global Malaria Programme, editor. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
2. WHO. World Malaria Report. In WHO Global Malaria Programme, editor. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017.
3. Ranson H, Lissenden N. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol.* 2016; 32: 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.010> PMID: 26826784
4. WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM). In: WHO/HTM/GMP/20125, editor. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
5. Etang J, Pennetier C, Piameu M, Bouraima A, Chandre F, Awono-Ambene P, et al. When intensity of deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.l. leads to loss of Long Lasting Insecticidal Nets bio-efficacy: a case study in north Cameroon. *Parasit Vectors.* 2016; 9: 132. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1420-x> PMID: 26951758
6. WHO (World Health Organization). WHO prequalifies indoor residual spray for vector control. Available from: <http://www.who.int/pq-vector-control/news-events/pq-fees-092017/en/>. Accessed 10 May 2018.
7. WHO (World Health Organization). Prequalification Vector Control. <http://www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/en/>. Accessed 10 May 2018.
8. Corbel V, N'Guessan R. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes-New insights into malaria vectors. Intech; 2013: pp. 579–633.
9. Glunt KD, Abilio AP, Bassat Q, Bulu H, Gilbert AE, Huijben S, et al. Long-lasting insecticidal nets no longer effectively kill the highly resistant *Anopheles funestus* of southern Mozambique. *Malar J.* 2015; 14: 298. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0807-z> PMID: 26242977
10. Ranson H, N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 2011; 27: 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004> PMID: 20843745

11. Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin J. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J*. 2008; 7: 189. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-189> PMID: [18817574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817574/)
12. Ndiath MO, Sougoufara S, Gaye A, Mazenot C, Konate L, Faye O, et al. Resistance to DDT and Pyrethroids and increased *ldr* mutation frequency in *An. gambiae* after the implementation of permethrin-treated nets in Senegal. *PLoS One*. 2012; 7: e31943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031943> PMID: [22384107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22384107/)
13. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*ldr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998; 7: 179–84. PMID: [9535162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9535162/)
14. Ranson H, Jensen B, Vulvule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*. 2000; 9: 491–97. PMID: [11029667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11029667/)
15. Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc R Soc*. 2002; 269: 2007–2016.
16. Rooker S, Guillemaud T, Bergé J, Pasteur N, Raymond M. Co-amplification of esterases A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*. 1996; 77: 555–561. PMID: [8939022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8939022/)
17. Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Leonormand T, Pasteur N. An overview of evolution of the overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos Trans R Soc B- Biol Sci*. 1998; 353: 1707–1711.
18. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45: 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371> PMID: [10761582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10761582/)
19. Nwane P, Etang J, Chouaibou M, Toto JC, Koffi A, Mimpfoundi R, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 41. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/41>. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-41> PMID: [23433176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23433176/)
20. Same-Ekobo A. Epidemiological aspects of malaria in Cameroon. *J Cam Acad Sci*. 2005; 5(S1): 3–16.
21. Antonio-Nkondjio C, Sonhafouo-Chiana N, Ngadjeu CS, Doumbe-Belisse P, Talipouo A, Djamouko-Djonkam L, et al. Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 472. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2417-9> PMID: [29017590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29017590/)
22. Müller P, Chouaibou M, Pignatelli P, Etang J, Walker ED, Donnelly MJ, et al. Pyrethroid tolerance associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Mol Ecol*. 2008; 7(4): 1145–1155.
23. Etang J, Vicente JL, Nwane P, Chouaibou M, Morlais I, Do Rosario VE, et al. Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Mol Ecol*. 2009; 18: 3076–3086.
24. WMO (World Meteorological Organization). World Weather Information Service-Douala. Douala, Cameroon: World Meteorological Organization; May 2018. Retrieved.
25. Service MW. Mosquito ecology, field sampling methods vector biology and control. 2nd ed. Liverpool: Liverpool School of Tropical Medicine; 1993.
26. Gillies MT, De Meillon B. The anophelinae of Africa south of the Sahara. *Pub South Afr Ins Med Res*. 1968; 54: 343.
27. Gillies MT, Coetzee M. Supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (afrotropical region). *Pub South Afr Inst Med Res*. 1987; 55: 143.
28. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes, 2nd edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016.
29. Collins FH, Mendez MA, Razmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 37: 37–41. PMID: [2886070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2886070/)
30. Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med Vet Entomol*. 2002; 16: 461–464. PMID: [12510902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12510902/)
31. Lynd A, Ranson H, McCall PJ, Randle NP., Black WC IV, Walker ED, et al. A simplified high-throughput method for pyrethroid knockdown resistance (*ldr*) detection in *Anopheles gambiae*. *Malar J*. 2005; 4: 1–16.
32. Finney DJ. Probit analysis. 3rd edition. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1971.

33. Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 2008; 8: 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x> PMID: [21585727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21585727/)
34. Etang J, Manga L, Chandre F, Guillet P, Fondjo E, Mimpfound R, et al. Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *J Med Entomol.* 2003; 40: 491–497. PMID: [14680116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14680116/)
35. Chouaïbou M, Etang J, Brevault T, Nwane P, Hinzoumbé CK, Mimpfoundi R, et al. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop Med Int Health.* 2008; 13: 476–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02025.x> PMID: [18248566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18248566/)
36. Foster GM, Coleman M, Thomsen E, Ranson H, Yangalbe-Kalnone E, Moundai T, et al. Spatial and temporal trends in insecticide resistance among malaria vectors in Chad highlight the importance of continual monitoring. *PLoS One.* 2016; 11:e0155746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155746> PMID: [27228026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27228026/)
37. Badolo A, Traore A, Jones CM, Sanou A, Flood L, Guelbeogo WM, et al. Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malar J.* 2012; 11:232. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-232> PMID: [22799568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22799568/)
38. Djegbe I, Boussari O, Sidick A, Martin T, Ranson H, Chandre F, et al. Dynamics of insecticide resistance in malaria vectors in Benin: first evidence of the presence of L1014S kdr mutation in *Anopheles gambiae* from West Africa. *Malar J.* 2011; 10:261. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-261> PMID: [21910856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21910856/)
39. Yahouedo GA, Cornélie S, Djegbe I, Ahlonsou J, Aboubakar S, Soares C, et al. Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasit Vectors.* 2016; 9:385. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1661-8> PMID: [27378358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27378358/)
40. Chareonviriyaphap T, Rongnoparut P, Juntarumporn P. Selection for pyrethroid resistance in a colony of *Anopheles minimus* species A, malaria vector in Thailand. *J Vector Ecol.* 2002; 27:222–9. PMID: [12546458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12546458/)
41. Strode C, Donegan S, Garner P, Enayati AA, Hemingway J. The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated Bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2014; 11:3–e1001619. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001619> PMID: [24642791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24642791/)
42. Nwane P, Etang J, Chouaïbou M, Toto JC, Kerah-Hinzoumbé C, Mimpfoundi R, et al. Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infect Dis.* 2009; 9: 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-163> PMID: [19793389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19793389/)
43. Busula AO, Takken W, Loy DE, Hahn BH, Mukabana WR, Verhulst NO. Mosquito host preferences affect their response to synthetic and natural odour blends. *Malar J.* 2015; 14: 133. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0635-1> PMID: [25889954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25889954/)
44. Dabiré KR, Diabaté A, Djogbenou L, Ouari A, N'Guessan R, Ouédraogo JB, et al. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J.* 2008; 7: 188. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-188> PMID: [18817564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817564/)
45. Chouaïbou M, Simard F, Chandre F, Etang J, Darriet F, Hougard JM. Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against *Anopheles funestus* and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* in North Cameroon. *Malar J.* 2006; 5: 77. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-77> PMID: [16961938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16961938/)
46. Wondji C, Simard F, Petrarca V, Etang J, Santolamazza F, Della Torre A, et al. Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J Med Entomol.* 2005; 42(6): 998–1005. PMID: [16465741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16465741/)
47. Simard F, Ayala D, Kamdem G, Pombi M, Etouna J, Ose K, et al. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* 2009; 9: 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-9-17> PMID: [19460146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460146/)
48. Coetzee M, Craig M, Le Sueur D. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol.* 2000; 9: 1657–1659. PMID: [11050560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11050560/)
49. Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maïga HM, Sankaré O, et al. Distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia.* 1998; 40(4): 477–511. PMID: [10645562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10645562/)
50. Diabaté A, Dabiré RK, Millogo N, Lehmann T. Evaluating the effect of postmating isolation between molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2007; 44: 60–64. PMID: [17294921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17294921/)

51. Gimonneau G, Bouyer J, Morand S, Besansky NJ, Diabate A, Simard F. A behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol*. 2010; 21(5): 1087–1092. <https://doi.org/10.1093/beheco/arq114> PMID: 22476108
52. Tene Fossog B, Antonio-Nkondjio C, Kengne P, Njiokou F, Besansky NJ, Costantini C. Physiological correlates of ecological divergence along an urbanization gradient differential tolerance to ammonia among molecular forms of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol*. 2013; 13: 1. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/13/1> PMID: 23294940
53. Tene Fossog B, Ayala D, Acevedo P, Kengne P, Abeso Mebuy IN, Makanga B, et al. Habitat segregation and ecological character displacement in cryptic African malaria mosquitoes. *Evol Appl*. 2015; 8: 326–345. <https://doi.org/10.1111/eva.12242> PMID: 25926878
54. Etang J, Manga L, Toto JC, Guillet P, Fondjo E, Chandre F. Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *J Vect Ecol*. 2007; 32(1): 123–133.
55. Etang J, Fondjo E, Chandre F, Brengues C, Nwane P, Chouaibou M, et al. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74: 795–797. PMID: 16687682
56. Ndjemai HNM, Patchoké S, Atangana J, Etang J, Simard F, Bilong Bilong CF, et al. The distribution of insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon: an update. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 2008; 103(11): 1127–1138.
57. Reimer L, Fondjo E, Patchoké S, Diallo B, Lee Y, Arash NG, et al. Relationship between kdr mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of *Anopheles gambiae*. *J Med Entomol*. 2008; 45(2): 260–266. PMID: 18402142
58. Nwane P, Etang J, Chouaibou M, Toto JC, Mimpfoundi R, Simard F. Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations in Cameroon: spread of the L1014F and L1014S mutations. *BMC Res Notes*. 2011; 4: 463. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/463>
59. Antonio-Nkondjio C, Tene Fossog B, Kopya E, Poumachu Y, Menze Djantio M, Ndo C, et al. Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malar J*. 2015; 14: 155. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0675-6> PMID: 25879950
60. Fanello C, Petrarca V, della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, et al. The pyrethroid knockdown resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 2003; 12: 241–245. PMID: 12752657
61. Mbida Mbida A, Etang J, Akono Ntonga P, Talipouo A, Awono-Ambene P, Oke-Agbo F, et al. 2016. Preliminary investigation on aggressive culicidae fauna and malaria transmission in two wetlands of the Wouri river estuary, Littoral-Cameroon. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(6): 105–110.
62. Cisse MBM, Keita C, Dicko A, Dengela D, Coleman J, Mihigo J, et al. Characterizing the insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in Mali. *Malar J* (2015) 14:327; <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0847-4> PMID: 26296644
63. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol*. 2000; 14: 181–189. PMID: 10872862
64. Tabue RN, Awono-Ambene P, Etang J, Atangana J, Antonio-Nkondjio C, Toto JC, et al. Role of *Anopheles (Cellia) rufipes* (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon: a cross-sectional survey. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 22. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1933-3> PMID: 28077167
65. Kleinschmidt I, Bradley J, Knox TB, Mnzava AP, Kafy HT, Mbogo C, et al. Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: a WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 640–649. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30172-5) PMID: 29650424

Article

Patterns of *Kdr*-L995F Allele Emergence Alongside Detoxifying Enzymes Associated with Deltamethrin Resistance in *Anopheles gambiae* s.l. from North Cameroon

Josiane Etang^{1,2,3,*} , Stanislas Elysée Mandeng^{1,4}, Philippe Nwane^{1,4}, Herman Parfait Awono-Ambene¹, Jude D. Bigoga⁵ , Wolfgang Eyisap Ekoko¹, Achille Jerome Binyang⁴, Michael Piameu^{1,6} , Lili Ranaisé Mbakop^{1,4}, Narcisse Mvondo⁴, Raymond Tabue^{5,7} , Rémy Mimpfoundi⁴, Jean Claude Toto¹, Immo Kleinschmidt^{8,9,10}, Tessa Bellamy Knox¹¹, Abraham Peter Mnzava¹², Martin James Donnelly¹³ and Etienne Fondjo¹⁴



Citation: Etang, J.; Mandeng, S.E.; Nwane, P.; Awono-Ambene, H.P.; Bigoga, J.D.; Ekoko, W.E.; Binyang, A.J.; Piameu, M.; Mbakop, L.R.; Mvondo, N.; et al. Patterns of *Kdr*-L995F Allele Emergence Alongside Detoxifying Enzymes Associated with Deltamethrin Resistance in *Anopheles gambiae* s.l. from North Cameroon. *Pathogens* **2022**, *11*, 253. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020253>

Academic Editor: Andrew Taylor-Robinson

Received: 13 January 2022

Accepted: 12 February 2022

Published: 15 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Institut de Recherche de Yaoundé (IRY), Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé 999108, Cameroon; mandengelysee@yahoo.fr (S.E.M.); philino07@yahoo.fr (P.N.); hpaawono@yahoo.fr (H.P.A.-A.); ewolfgang388@gmail.com (W.E.E.); piameujr@yahoo.fr (M.P.); mbalira@yahoo.fr (L.R.M.); jctotofr@yahoo.fr (J.C.T.)
 - ² Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, P.O. Box 2701, Douala 999108, Cameroon
 - ³ Institute for Insect Biotechnology, Justus Liebig University Gießen, 35394 Gießen, Germany
 - ⁴ Laboratory of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, P.O. Box 337, Yaoundé 999108, Cameroon; bjeromeachille@yahoo.fr (A.J.B.); nar6mv@yahoo.fr (N.M.); remy.mimpfoundi@yahoo.fr (R.M.)
 - ⁵ Laboratory for Vector Biology and Control, National Reference Unit for Vector Control, The Biotechnology Center, Nkolbisson-University of Yaounde I, P.O. Box 3851 Messa, Yaoundé 999108, Cameroon; judebigoga@yahoo.com (J.D.B.); trnraymon@yahoo.fr (R.T.)
 - ⁶ Ecole des Sciences de la Santé, Université Catholique d'Afrique Centrale, P.O. Box 1110, Yaoundé 999108, Cameroon
 - ⁷ National Malaria Control Programme, Ministry of Public Health, Yaoundé 999108, Cameroon
 - ⁸ MRC International Statistics and Epidemiology Group, Department of Infectious Disease Epidemiology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel St., London WC1E 7HT, UK; immo.kleinschmidt@lshtm.ac.uk
 - ⁹ Wits Research Institute for Malaria, School of Pathology, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg 2141, South Africa
 - ¹⁰ Southern African Development Community Malaria Elimination Eight Secretariat, 10 Platinum Street, Erf 490, Prosperita, Windhoek 10005, Namibia
 - ¹¹ World Health Organization Country Liaison Office, Port Vila 99514, Vanuatu; knoxt@who.int
 - ¹² African Leaders Malaria Alliance (ALMA), Dar es Salaam 11101, Tanzania; drabrahammnzava@gmail.com
 - ¹³ Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK; martin.donnelly@lstmed.ac.uk
 - ¹⁴ ABT ASSOCIATES, PMI VectorLink, Yaoundé 999108, Cameroon; fondjoetienne@yahoo.fr
- * Correspondence: josyet2@gmail.com; Tel.: +237-677-61-97-79

Abstract: Understanding how multiple insecticide resistance mechanisms occur in malaria vectors is essential for efficient vector control. This study aimed at assessing the evolution of metabolic mechanisms and *Kdr* L995F/S resistance alleles in *Anopheles gambiae* s.l. from North Cameroon, following long-lasting insecticidal nets (LLINs) distribution in 2011. Female *An. gambiae* s.l. emerging from larvae collected in Ouro-Houso/Kanadi, Be-Centre, and Bala in 2011 and 2015, were tested for susceptibility to deltamethrin + piperonyl butoxide (PBO) or SSS-tributyl-phosphoro-thrithioate (DEF) synergists, using the World Health Organization's standard protocol. The *Kdr* L995F/S alleles were genotyped using Hot Ligation Oligonucleotide Assay. Tested mosquitoes identified using PCR-RFLP were composed of *An. arabiensis* (68.5%), *An. coluzzii* (25.5%) and *An. gambiae* (6%) species. From 2011 to 2015, metabolic resistance increased in Ouro-Houso/Kanadi (up to 89.5% mortality to deltamethrin+synergists in 2015 versus <65% in 2011; $p < 0.02$), while it decreased in Be-Centre and Bala (>95% mortality in 2011 versus 42–94% in 2015; $p < 0.001$). Conversely, the *Kdr* L995F allelic frequencies slightly decreased in Ouro-Houso/Kanadi (from 50% to 46%, $p > 0.9$), while

significantly increasing in Be-Centre and Bala (from 0–13% to 18–36%, $p < 0.02$). These data revealed two evolutionary trends of deltamethrin resistance mechanisms; non-pyrethroid vector control tools should supplement LLINs in North Cameroon.

Keywords: *Anopheles gambiae* s.l.; deltamethrin; *Kdr* 995F/S alleles; synergists; insecticide resistance; malaria vector control; resistance management; northern Cameroon

1. Background

Since the discovery of chemical insecticides, there has been an increasing dependence on synthetic compounds for vector-borne diseases prevention [1], owing to their effectiveness and ease of use. Among the vector-borne diseases is malaria, an acute febrile illness caused by *Plasmodium* parasites transmitted by *Anopheles* mosquitoes [2]. Its mass prevention heavily relies on the use of pyrethroid insecticides in long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS) interventions [1,3]. During the last two decades, the rapid scaling-up of LLINs and IRS interventions has largely contributed to the decline of morbidity and mortality related to malaria [4]. In sub-Saharan Africa, malaria case incidence was reduced from 368 to 222 per 1000 population at risk between 2000 and 2019, but increased to 232 per 1000 in 2020, mainly because of disruptions to services during the COVID-19 pandemic. Malaria deaths in this region were also reduced by 36%, i.e., from 840,000 in 2000 to 534,000 in 2019, before increasing to 602,000 in 2020 [3].

However, whilst at least half of the African population is now sleeping under LLINs [5], pyrethroid resistance has become a common phenomenon in the most efficient vectors of *Plasmodium* parasites, especially those belonging to the *Anopheles gambiae* complex and the *An. funestus* group [6]. Insecticide resistance mechanisms are strongly selected following the use of chemicals in agriculture and public health interventions, leading to the reduction of the effectiveness of LLINs and IRS. To date, two types of pyrethroid resistance mechanisms are mostly recorded, being target site modifications and increased detoxification, allowing resistant mosquitoes to metabolize insecticides at a higher rate. The target site modifications result from single-base mutations in the voltage-gated sodium channel (*Vgsc*-L995S/F) gene—the target site for pyrethroids and DDT, leading to the knockdown resistance (*kdr*) L995F, L995S, and N1570Y mutations [7,8]. The L995F mutation, a leucine to phenylalanine change, has rapidly disseminated across three species of the *An. gambiae* complex, i.e., *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae* s.s. However, its distribution is not uniform either within or between these species. The reasons for this divergence remain unclear because little is known about the adaptive capacity that this mutation confers to wild mosquito populations under selection pressure in the field. On the other hand, metabolic resistance arises from increased detoxification of insecticides, by either of the three classes of metabolic enzymes, carboxylesterases (COEs), glutathione-S-transferases (GSTs), and cytochrome P450s [9]. Overexpression of several P450 monooxygenases has been associated with insecticide resistance, and those which have been validated as pyrethroid-metabolizers in vitro, and thus capable of causing resistance include CYP6M2, CYP6P3, and CYP6P4 [10–12]. Carboxylesterases can also play a role in pyrethroid metabolism, for example, when coupled with P450s [13,14]. Furthermore, pyrethroid resistance may also be mediated by glutathione S-transferases (GST) GST1-6 [15].

From previous research, multiple insecticide resistance mechanisms, including target site and metabolic mechanisms, have been documented in *Anopheles* mosquito species across many countries in Sub-Saharan Africa, including Cameroon [16–19]. However, it remains unclear whether these two major types of resistance mechanisms are similarly influenced by selective pressure in the field, or one mechanism might evolve faster and dominate the others. The resulting evolutionary trend of resistance mechanisms is of particular importance since there is evidence that the wide-scale implementation of IRS and LLINs is contributing to the selection of pyrethroid resistance in the major African malaria

vectors [20,21]. Understanding how multiple insecticide resistance mechanisms arise and the evolution of associated survival advantage in mosquito populations could help to better manage vector resistance to insecticides and sustain vector control interventions.

In Cameroon, malaria prevention relies on the wide use of LLINs. The deployment of complementary measures, such as IRS with insecticides of other classes than pyrethroids as recommended by WHO [22] is planned for the near future [23]. The National Malaria Control Program (NMCP) conducted the very first nationwide free LLIN distribution campaigns with 8 million LLINs in 2011 [24]. At that time, metabolic resistance and *Kdr*-based resistance to pyrethroids were already reported among *An. gambiae* s.l. populations from several regions [25,26]. In the North Region, pyrethroid resistance in *An. arabiensis* was found to be essentially mediated by enzyme-based detoxification [26,27]. Subsequent studies have reported *Kdr* L995F allele (at up to 61% frequencies) in *An. coluzzii*, *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis* from this region [28]. However, how the expansion of the *Kdr* L995F allele arose in mosquito populations already displaying upregulated metabolic genes has not been investigated. In other words, the arrangement, and operational mode of the *Kdr* L995F allele on top of metabolic mechanisms in local vector populations remains poorly understood. Considering the predominance of metabolic-based resistance mechanisms in *An. arabiensis* populations from North Cameroon in 2011, we set up to investigate the changes in the patterns of the *Kdr* resistance alleles and metabolic detoxication activities and the resulting phenotypes of pyrethroid resistance, following the wide distribution of LLINs in 2011. Besides, this region is subject to extensive use of different organophosphate and pyrethroid insecticides in cotton cultivation areas. We hypothesized that such a diversified selective pressure might have different impacts on the resistance mechanisms in place.

The current study aimed at assessing the patterns of the *kdr* 995F/S resistance alleles' emergence alongside cytochrome P450s and COEs detoxifying enzyme activities in pyrethroid-resistant *An. gambiae* s.l. from North Cameroon. This study is part of a multi-country project that assessed the impact of insecticide resistance on the effectiveness of LLINs or IRS interventions [29].

2. Results

2.1. Distribution of Mosquito Species across the Study Sites

Mosquitoes that were morphologically identified as belonging to the *An. gambiae* complex and used as control during deltamethrin susceptibility tests were identified down to species using molecular identification PCR-RFLP techniques. These include 200 mosquito specimens of the Kisumu laboratory reference strain and 352 field mosquitoes. Among these samples, 223 were randomly selected in 2011 (N = 100 for the Kisumu strain and 123 from the field) and 329 in 2015 (N = 100 for the Kisumu strain and 229 from the field).

The samples of the Kisumu reference were solely composed of the *An. gambiae* species; while three species of the *An. gambiae* complex, namely *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae* were recorded in field mosquito samples (Figure 1). In general, *An. arabiensis* was the dominant species, representing 73.2% and 52.4% of the samples collected in 2011 and 2015, respectively. This dominance was also reflected in each study site, except in Ouro-Houso/Kanadi where *An. coluzzii* became the dominant species in 2015 (58%).

The distribution of the three species varied from site to site and from one period to another. In Be-Centre and Bala located in sub-urban (Pitoa HD) and rural (Mayo-Oulo HD) areas, respectively, *An. gambiae* which was not recorded in 2011 appeared in 2015, at 17% and 6% frequencies, respectively. Furthermore, *An. coluzzii* was recorded in Bala only in 2015 (11% frequency) though absent in 2011, highlighting the progressive increase of species diversity in rural and semi-urban areas. However, in Ouro-Houso/Kanadi located in an urban area (Garoua HD), the three species were recorded both in 2011 and in 2015, but with a decreasing frequency for *An. arabiensis* and increasing frequencies for *An. coluzzii* and *An. gambiae*.

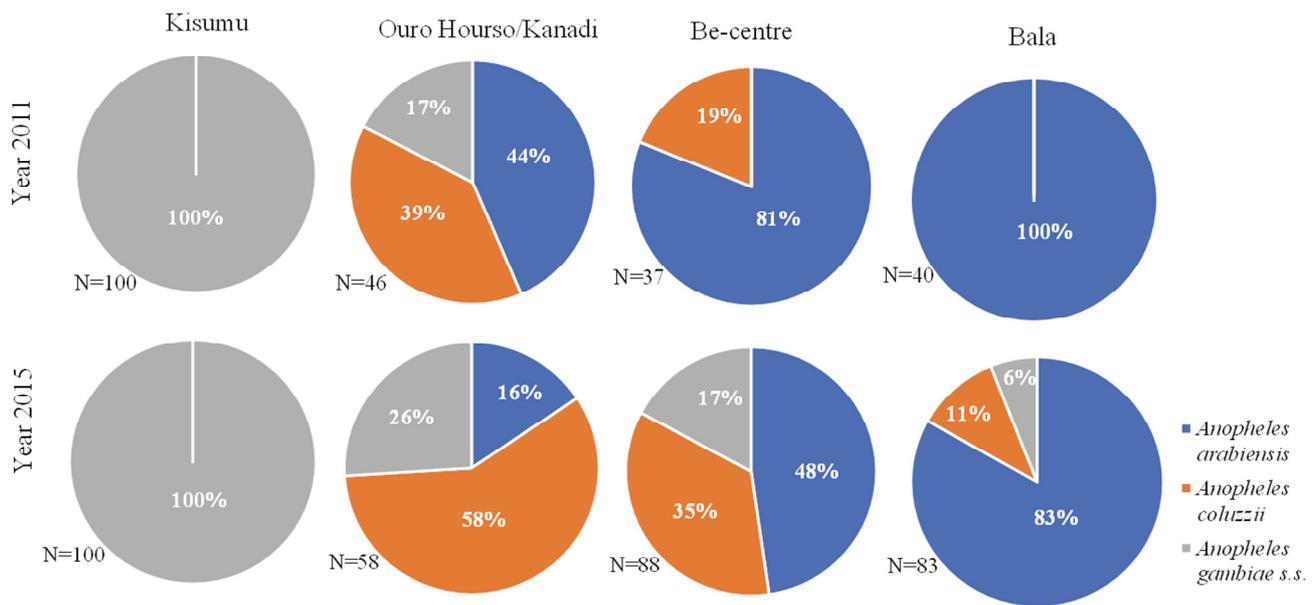


Figure 1. Species distribution among *Anopheles gambiae* s.l. populations collected in 2011 and 2015.

2.2. Deltamethrin Resistance Profiles

A total of eight deltamethrin susceptibility tests were carried out, four in 2011 and four in 2015 i.e., one assay with each mosquito strain per year. The knockdown times (kdt) during exposure to deltamethrin and the mortality rates 24 h post-exposure are provided in Table 1 and Figure 2, respectively.

Table 1. Knockdown times and resistance status of *Anopheles gambiae* s.l. samples exposed to 0.05% deltamethrin.

Locality and District	Year	N	Tkd50 (CI), min	Tkd95 (CI), min	Resistance Status
Kisumu Reference strain	2011	86	9.5 (8.4–10.8)	17.3 (15.7–19.4)	S
	2015	86	9.4 (7.4–11.8)	18.6 (14.7–19.7)	S
Ouro-Houso/Kanadi Garoua district	2011	93	51.5 (30.7–64.2)	>60	R
	2015	100	>60	>60	R
Be-Centre Pitoa district	2011	82	23.5 (20.7–26.1)	>60	SR
	2015	95	37.4 (32.3–44.0)	>60	R
Bala Mayo-Oulo district	2011	75	41.2 (37.0–45.3)	>60	R
	2015	87	27.6 (25.9–29.3)	>60	R

Resistance status was defined according to the WHO criteria [30]; i.e., mortality rates less than 90% were indicative of resistance, mortality rates between 90% and 97% suggested suspected resistance to be confirmed, while mortality equal to or greater than 98% indicated susceptibility. N: sample size; Tkd50 and Tkd95: knockdown times for 50% and 95% of the tested population; CI: confidence interval at 95%; min: minute; R: resistant; S: susceptible; SR: suspected resistance.

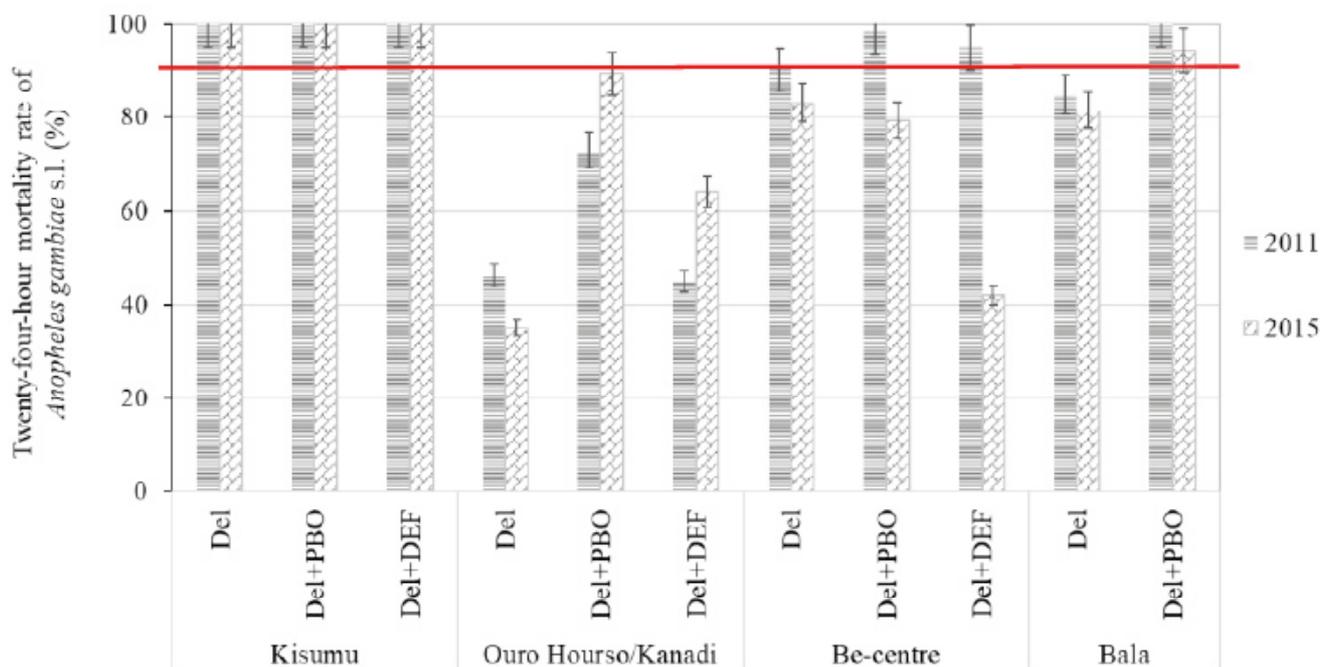


Figure 2. Twenty-four-hour mortality rates (with a confidence interval at 95%) of *Anopheles gambiae* s.l. following exposure to 0.05% deltamethrin with or without 4% Piperonyl butoxide (PBO) and 7% SSS-tributyl-phosphoro-thrithioate (DEF) in 2011 and 2015. The resistance status was defined according to the WHO criteria [30]; i.e., mortality rates less than 90% were indicative of resistance, mortality rates between 90% and 97% suggested suspected resistance to be confirmed, while mortality equal to or greater than 98% indicated susceptibility. The red line at 90% mortality rate indicates the threshold for confirmed insecticide resistance. Comparisons of mosquito mortality rates to deltamethrin with versus without synergists were performed using the Mantel–Haenszel chi-square test.

The k_{dt} for 50% mosquitoes (k_{dt50}) of the Kisumu susceptible strain ($N = 172$) were below 10 min; the corresponding k_{dt95} were below 20 min and the 24-h mortality rates were 100%.

However, field mosquito populations ($N = 532$) displayed variable trends of k_{dt} and mortality rates. In Ouro-Houso/Kanadi, the k_{dt50} was over 50 min in 2011 and in 2015, corresponding to >5-fold those of the Kisumu susceptible strain. In Be-Centre, the k_{dt50} increased from 23.5 min in 2011 to 37 min in 2015, suggesting a decrease of deltamethrin kd effect. In Bala, it conversely decreased from 41 min in 2011 to 28 min in 2015, suggesting an increase of deltamethrin kd effect. The non-overlapping k_{dt50} confidence intervals in Be-Centre and Bala between 2011 and 2015, suggest that the observed variations of knockdown effects were more than mere sampling variations. For all assays with field-collected mosquitoes, k_{dt95} were >60 min in 2011 and in 2015. Overall mortality rates were significantly lower in Ouro-Houso/Kanadi (40.1%) compared to Be-Centre (86.4%) and Bala (83.4%) ($p < 0.001$), suggesting high resistance frequencies in urban areas (Ouro-Houso/Kanadi) compared to sub-urban (Be-Centre) and rural areas (Bala). More specifically, the resistance status was regularly confirmed in *An. gambiae* s.l. samples from Ouro-Houso/Kanadi (<50% mortality) and Bala (82–85% mortality). However, in Be-Centre, resistance suspected in 2011 (90% mortality) was confirmed in 2015 (83% mortality).

2.3. Metabolic Resistance Indicators: Effects of Synergists on Deltamethrin Resistance

The piperonyl butoxide (PBO) and SSS-tributyl-phosphoro-thrithioate (DEF) synergists were used for the detection of P450 and COE detoxifying enzymes' involvement in deltamethrin resistance. A total of 14 susceptibility tests were carried out with deltamethrin-synergist combinations, whereby mosquitoes ($N = 1807$) were exposed to PBO ($N = 619$) or DEF ($N = 484$) synergists prior to deltamethrin susceptibility tests. Four assays were con-

ducted with mosquitoes of the Kisumu reference susceptible strain and 10 assays with wild *An. gambiae* s.l. samples. In Ouro-Houso/Kanadi and Be-Centre, the 3 test configurations (deltamethrin, PBO+deltamethrin, and DEF+deltamethrin) were successfully carried out; while in Bala, tests with DEF+deltamethrin were not carried out because of the scarcity of mosquito larvae in breeding sites.

Different profiles of synergistic effects of PBO and DEF were observed in the kdt and mortality rates; data are shown in Table 2 and Figure 3, respectively. The suppression of kdt (kdt_{50}) as a result of pre-exposure of mosquitoes to synergists was not systematically associated with an increase of their mortality rates (Mrt) to deltamethrin and vice versa.

2.3.1. Effects of Synergists on Mosquito Knockdown to Deltamethrin

With the Kisumu laboratory strain of *An. gambiae*, no significant difference of kdt was observed between the tests with deltamethrin alone and those with deltamethrin-PBO or -DEF combinations. The rates of kdt_{50} induced by synergists were less than 10% (Table 2).

Table 2. Knockdown times and resistance status of *Anopheles gambiae* s.l. samples to deltamethrin with and without synergists.

Locality and District	Year	Insecticide	N	Kdt ₅₀ (CI) (min)	Kdt ₉₅ (CI) (min)	Kdts ₅₀ (%)	Resistance Status
Kisumu Reference strain	2011	Del	86	9.5 (8.4–10.8)	17.3 (15.7–19.4)	-	S
		Del+PBO	88	9.2 (7.8–10.8)	18.4 (17.2–20.4)	3.2	S
		Del+DEF	82	8.8 (7.1–9.3)	16.8 (14.5–20.3)	7.4	S
	2015	Del	86	9.4 (7.4–11.8)	18.6 (14.7–19.7)	-	S
		Del+PBO	90	8.9 (6.8–10.3)	19.4 (16.2–21.3)	5.3	S
		Del+DEF	84	8.6 (7.1–10.7)	18.8 (15.5–20.6)	8.5	S
Ouro-Houso/Kanadi Garoua district	2011	Del	93	51.5 (30.7–64.2)	>60	-	R
		Del+PBO	81	28.7 (21.0–35.0)	>60	44.3	R
		Del+DEF	70	59.1 (47.3–24,854.6)	>60	<0	R
	2015	Del	100	>60	>60	-	R
		Del+PBO	68	40.3 (35.4–46.8)	>60	55.5	R
		Del+DEF	74	52.4 (45.2–68.7)	>60	30.0	R
Be-Centre Pitoa district	2011	Del	82	23.5 (20.7–26.1)	>60	-	SR
		Del+PBO	70	10.8 (6.6–14.6)	41.8 (28.4–94.4)	54.0	S
		Del+DEF	86	6.8 (4.3–8.8)	24.7 (18.6–42.3)	71.1	SR
	2015	Del	95	37.4 (32.3–44.0)	>60	-	R
		Del+PBO	82	14.9 (12.0–17.7)	>60	60.2	R
		Del+DEF	88	>60	>60	<0	R
Bala Mayo Oulo district	2011	Del	75	41.2 (37.0–45.3)	>60	-	R
		Del+PBO	51	38.1 (26.1–101.2)	50 (23.0–249.0)	7.5	S
	2015	Del	87	27.6 (25.9–29.3)	>60	-	R
		Del+PBO	89	26.3 (24.6–28.0)	>60	4.7	SR

N: sample size; Del: deltamethrin; PBO: piperonyl butoxide; Kdt₅₀ and Kdt₉₅: knockdown times for 50% and 95% of the tested population; Kdts₅₀: percent of knockdown time suppression; CI: confidence interval at 95%; min: minute; Tkd50R: time ratio required for knocking down 50% of individuals; R: resistant; S: susceptible; SR: suspected resistance.

With *An. gambiae* s.l. samples from Ouro-Houso/Kanadi, the Kdt₅₀ of the synergist+deltamethrin combination assays were mostly reduced compared with deltamethrin alone, except with DEF in 2011 (59 min); however, they remained above 40 min. Relative reductions in knockdown times, kdt_{50} , varied between 30% and 56%, except with DEF in 2011 ($kdt_{50} < 0$). The kdt_{95} were all greater than 60 min, suggesting no detectable effect of synergists on this variable.

With *An. gambiae* s. l. samples from Be-Centre, pre-exposure to PBO and DEF synergists generally resulted in a significant reduction of kdt_{50} from 23–37 min to less

than 15 min with corresponding kdt_{50} rates between 54% and 71%. The kdt_{95} were also decreased from >60 min to 25–42 min only in 2011, but not in 2015. More specifically, there was no synergistic activity of DEF on deltamethrin kdt in 2015 (kdt_{50} rate < 0%), and both kdt_{50} and kdt_{95} remained >60 min.

With *An. gambiae* s. l. samples from Bala, the use of PBO synergist did not induce any significant reduction of kdt_{50} , either, in 2011 (38 min) or in 2015 (26 min); the kdt_{95} remained >50 min and the kdt_{50} relative reductions were less than 10%.

2.3.2. Effects of Synergists on Mosquito Mortality to Deltamethrin

The mortality rates of the Kisumu reference strain of *An. gambiae* to deltamethrin with or without synergists were always 100% (Figure 2).

With field mosquito samples, pre-exposure to PBO synergist significantly increased their mortality to deltamethrin, both in 2011 and in 2015 ($6.8 < X^2 < 49.5$; $df = 1$; $p < 0.02$), except in a few cases. When comparing mortality rates between 2011 and 2015, two trends were observed in the synergistic effects of PBO and DEF. In the Ouro-Houso/Kanadi urban area, there was an increase in PBO and DEF synergistic effects over the time. The mortality induced by deltamethrin when combined with either of the synergists were significantly increased in 2015 (73% for PBO-deltamethrin and 89.5% DEF-deltamethrin) compared with those recorded in 2011 (64% for PBO-deltamethrin and 45% for DEF-deltamethrin) ($X^2 = 6.0$; $df = 1$; $p < 0.02$). Conversely, the effects of synergists obviously declined over the years in the Be-Centre sub-urban and Bala rural areas, with mortality rates lower in 2015 (42–94%) than in 2011 (>95%) ($X^2 = 61.7$; $df = 1$; $p < 0.001$).

In terms of resistance status (Table 2), *An. gambiae* s.l. samples from Ouro-Houso/Kanadi maintained their “confirmed resistance” status, regardless of pre-exposure to synergists either in 2011 or in 2015. Similarly, when mosquito samples from Be-Centre were pre-exposed to DEF, the resistance status remained “suspected resistance” and “confirmed resistance” in 2011 and 2015, respectively. However, the reversion of resistance status (from “suspected resistance” to “susceptible”) following pre-exposure to synergists observed in Be-Centre in 2011, was no longer effective in 2015. Furthermore, a regression of PBO synergistic effect on the reversion of resistance status was observed in Bala, from complete reversion in 2011 (“confirmed resistance” to “susceptible”), to partial reversion in 2015 (i.e., “confirmed resistance” to “suspected resistance”).

2.4. Genotypic and Allelic Frequencies at the *Kdr* 995 Locus

The L995F *Kdr* mutation was found in the three species of the *An. gambiae* complex, namely *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae*, but at variable genotypic and allelic frequencies (Figure 3). However, the *kdr* L995S mutation was not recorded in any of analyzed specimens.

Both homozygous *Kdr* 995L/L (susceptible) and *Kdr* 995F/F (resistant), as well as the heterozygous *Kdr* 995L/F genotypes, were found in the three study sites. In Ouro-Houso/Kanadi, the genotypic frequencies of homozygous resistant decreased from 25–40% in 2011 to 9–20% in 2015; this decrease was observed in each of the three sibling species. Conversely, there was an increase of heterozygote frequencies from 5–63% in 2011 to 22–79% in 2015. In Be-Centre, the homozygous resistant genotype observed mainly in *An. coluzzii* in 2011 at 42.8% frequency was no longer recorded in 2015, neither in this species nor in the two other sibling species. Instead, the frequencies of heterozygotes in the three species increased from 0–29% in 2011 to 64–87% in 2015. Simultaneously, there was a reduction in the frequency of susceptible homozygotes. Furthermore, the frequency of heterozygotes in mosquito samples from Bala increased from 0% in 2011 to between 24–89% in 2015. In this study site, homozygous resistant mosquitoes were only observed in the *An. gambiae* species in 2015, with up to 20% genotypic frequencies.

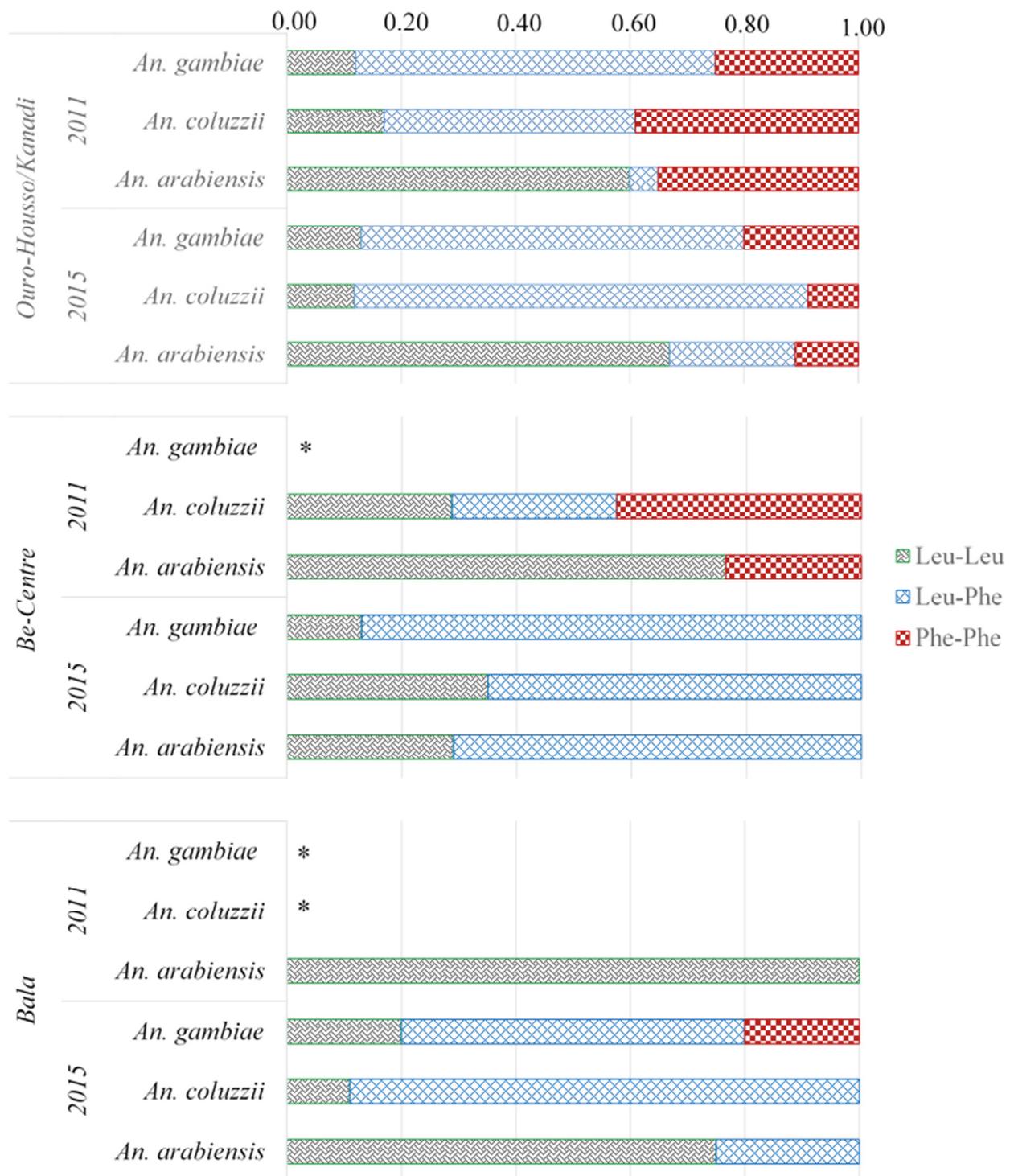


Figure 3. Frequency distribution of the different genotypes (per species) at position 995 of the *Kdr* locus among field-collected *An. gambiae* s.l. populations. Leu: Leucine position at position 995 (encoded by allele L995L); Phe: Phenylalanine position at position 995 (encoded by allele L995F); * Not determined because this species was not found.

The *Kdr* L995F allelic frequencies in analyzed samples of *An. gambiae* s.l. are summarized in Table 3. We displayed the *Kdr* L995F frequencies for each of the three identified species (*An. arabiensis*, *An. coluzzii*, and *An. gambiae*), as well as the overall frequencies at the level of *An. gambiae* s.l. complex (i.e., pooled sampled including the three species).

Table 3. Allelic frequencies (per species) at the *Kdr* 995 locus in field *Anopheles gambiae* s.l. samples in 2011 and 2015.

Locality and District	Year	Species	N	Fs L995F (%)	Fc L995F (%)	p Value
Ouro-Houso/Kanadi Garoua district	2011	<i>An. arabiensis</i>	20	37.50a	50.00	0.88
		<i>An. coluzzii</i>	18	61.11c		
		<i>An. gambiae</i>	8	56.25g		
	2015	<i>An. arabiensis</i>	9	22.22a	45.69	
		<i>An. coluzzii</i>	34	48.53c		
		<i>An. gambiae</i>	15	53.33g		
Be-Centre Pitoa district	2011	<i>An. arabiensis</i>	30	3.33a	13.5	0.02
		<i>An. coluzzii</i>	7	57.14c		
		<i>An. gambiae</i>	0	-		
	2015	<i>An. arabiensis</i>	42	35.71a*	35.80	
		<i>An. coluzzii</i>	31	32.26c		
		<i>An. gambiae</i>	15	43.33		
Bala Mayo-Oulo district	2011	<i>An. arabiensis</i>	40	0.00a	0.00	0.01
		<i>An. coluzzii</i>	0	-		
		<i>An. gambiae</i>	0	-		
	2015	<i>An. arabiensis</i>	69	12.32a*	18.10	
		<i>An. coluzzii</i>	9	44.44		
		<i>An. gambiae</i>	5	50.00		

N: sample size; SS: homozygote susceptible; SR: heterozygote; RR: homozygote resistant; Fs: allelic frequencies of *Kdr* 995F of each species *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae* (s.s.); Fc: overall allelic frequencies of the *Kdr* L995F for the three identified species of the *An. gambiae* complex; a: non-significant difference in the *Kdr* L995F allelic frequency in *An. arabiensis*; c: non-significant difference in the *Kdr* L995F allelic frequency in *An. coluzzii*; g: non-significant difference in the *Kdr* L995F allelic frequency in *An. gambiae*; a*: significant difference in the *Kdr* L995F allelic frequency in *An. arabiensis*.

Either in *An. arabiensis*, *An. coluzzii* or in *An. gambiae*, the allelic frequencies of *kdr* L995F decreased between 2011 and 2015 in Ouro-Houso/Kanadi, although the difference was not significant ($p \geq 0.35$). Conversely, they increased from 3.33% to 35.71% and from 0.00% to 13.32% in *An. arabiensis* from Be-Centre and Bala, respectively ($0.003 \leq p \leq 0.04$). Due to the scarcity of *An. coluzzii* and/or *An. gambiae* in mosquito samples from Be-Centre and Bala in 2011, it was not possible to assess the changes in the *Kdr* 995F allelic frequencies in 2015. When pooling the samples of the three species, *An. gambiae* s.l. samples from Ouro-Houso/Kanadi displayed a non-significant decrease of *kdr* L995F allelic frequency from 50% in 2011 to 45.7% in 2015 ($p = 0.88$). By contrast, the frequency of this resistant allele significantly increased between 2011 and 2015 in the two other study sites, i.e., from 13.5 to 35.8%, and from 0 to 18.1% in Be-Centre and Bala, respectively ($0.01 \leq p \leq 0.02$).

2.5. Interactions between Metabolic and *kdr* 995F Resistance Mechanisms

To further explore the interplay between insecticide resistance mechanisms in the studied *An. gambiae* s.l. populations, we compiled and considered the data on the *kdts*₅₀ and *Mrt.* to deltamethrin with or without synergists and the frequencies of the *Kdr* L995F resistance allele.

We found two patterns of multiple resistance mechanisms development, involving mainly P450s and the *Kdr* L995F mutation, associated to COEs to a lesser extent (Table 4). In Ouro-Houso/Kanadi and Bala, the “confirmed resistance” status remained unchanged between 2011 and 2015; however, the resistance mechanisms that evolved over the years were different between the two study sites. In the presence of the *Kdr* L995F mutation as the primary resistance mechanism in Ouro-Houso/Kanadi, an increase of *kdts*₅₀ and *Mrt.* to deltamethrin following pre-exposure of mosquitoes to PBO and DEF in 2015 as compared with 2011, suggest an upsurge of detoxification by P450s and COEs. In contrast, in the presence of P450s as the primary resistance mechanism in *An. gambiae* s.l. from Bala, the mechanism of resistance that emerged was the *Kdr* L995F allele.

Table 4. Putative insecticide resistance mechanisms in wild *An. gambiae* s.l. samples in 2011 and 2015.

Locality	Year	Species and <i>Kdr</i> L995F freq.	PBO Effect		DEF Effect		<i>Kdr</i> L995F Allele	Resistance Status
			Kdts ₅₀	Mrv.	Kdts ₅₀	Mrv.		
Ouro-Houso/Kanadi	2011	Aa **, Ac **, Ag **	+	+	-	-	+++	R
	2015	Aa *, Ac **, Ag **	++	++	+	+	++	R
Be-Centre	2011	Aa *, Ac ***	++	+	++	+/-	++	RP
	2015	Aa **, Ac **, Ag **	++	-	-	-	+++	R
Bala	2011	Aa	+/-	+	N/A	N/A	-	R
	2015	Aa *, Ac **, Ag **	+/-	+	N/A	N/A	+++	R

Aa: *Anopheles arabiensis*, Ac: *Anopheles coluzzii*; Ag: *Anopheles gambiae*; kdts₅₀: knockdown time suppression; Mrv: mortality reversion; * presence of *Kdr* L995F at <25% frequency; ** presence of *Kdr* L995F at 25–40% frequency; *** presence of *Kdr* L995F at >50% frequency; +freq: Frequency; -: not detected; +/-: possible role in resistance to be confirmed; +: minor role in resistance; ++: Moderate role in resistance; +++: Major role in resistance; N/A: not applicable; R: confirmed resistance; SR: suspected resistance.

More interestingly, with the *An. gambiae* s.l. samples from Be-Centre, where the resistance status changed from “suspected” to “confirmed” resistance between 2011 and 2015, the effects of synergists in terms of kdts₅₀ (with DEF) and restoration of Mrt (with PBO) were rather regressive, in parallel with an increase in the frequency of the *Kdr* L995F allele.

3. Discussion

In sub-Saharan Africa, three malaria vector species belonging to the *An. gambiae* complex, namely *An. gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* are mostly exhibiting multiple insecticide resistance mechanisms. However, little is known about the circumstances and speed of development of multiple resistance mechanisms in the field. When there is selection pressure, there may be interactions between the different mechanisms in place. Here, we report an apparent regression of metabolic resistance in favor of the *Kdr* L995F mutation in *An. gambiae* s.l. from semi-urban and rural areas in North Cameroon between 2011 and 2015. Conversely, there is an increase of metabolic detoxification over the *Kdr* L995F allele in urban areas. These findings are considered to help decision-makers when having to prioritize complementary malaria vector control interventions in Cameroon. One limitation of this study is that, because of the low numbers of mosquito larvae collected from breeding sites, the sample size of *An. gambiae* s.l. used as control during susceptibility tests and subsequently for species identification and *Kdr* L995F/S genotyping was not large. This might have affected the data on species distribution. For the same reason, we were not able to conduct tests with DEF+deltamethrin in Bala in either of the two study years.

Nevertheless, the presence of *An. gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* species in Ouro-Houso/Kanadi, Be-Centre, and Bala is in agreement with previous studies [31–33]. Moreover, we noted an increase in species diversity over time and variable distribution patterns of the three species across the study sites. In 2015, *An. coluzzii* became a major malaria vector species in Ouro-Houso/Kanadi and Be-Centre. Additionally, *An. gambiae* which was not recorded in Be-Centre and Bala in 2011 appeared there in 2015. It is possible that environmental factors, such as the types of mosquito breeding water bodies, their surroundings, and the origin of water, in combination with the ability of mosquito species to develop insecticide resistance, lead to the emergence and predominance of one taxonomic group rather than the others. *An. coluzzii* and *An. gambiae* are highly adaptive malaria vectors colonizing both tropical and equatorial areas [33], while *An. arabiensis* is known to colonize tropical areas from West to East Africa. The low proportion of *An. gambiae* s.s. in the three study sites could also be explained by the fact that larvae were collected in September and November, at the end of the rainy season. This species prefers small, temporal, and clean water bodies formed by the accumulation of rainwater, whereas *An. coluzzii* is usually found in permanent and semi-permanent breeding sites, such as those resulting from human activities in urban areas [34,35]. The urbanization gradient of the surveyed areas could also explain the increase of *An. coluzzii* in samples from Be-Centre and Bala in 2015. The ability of *An. coluzzii* to adapt in polluted breeding sites with

a predominance of organic matters in the urban agglomerations of Cameroon has been highlighted by Tene Fossog et al. [36].

Data on the evolution of deltamethrin resistance between 2011 and 2015 highlights a change in the resistance status from “suspected” to “confirmed” resistance in Be-Centre; while in Ouro-Houso/Kanadi and Bala, the resistance observed in 2011 was reconfirmed in 2015, with declining mortality rates. The rapid increase of insecticide resistance in *An. arabiensis*, *An. gambiae* s.s. and *An. coluzzii* populations from northern Cameroon have largely been demonstrated in previous studies [28,37–39]. Therefore, our analysis focused on the evolution and interaction between the underlying mechanisms, with particular attention to the *Kdr* L995F mutation and the reversion of resistance by PBO and DEF, as indicators of metabolic resistance conferred by P450s oxidases and COEs. The incomplete recovery of deltamethrin susceptibility after pre-exposure of mosquitoes to synergist PBO and DEF that was seen in most of the assays suggests a partial involvement of P450 and COE genes in the process of deltamethrin resistance. We found that, in addition to the reversion of mortality rates, the synergists also induced the suppression of kdt. The kdt_{50} appeared to be a reliably sensitive indicator of metabolic resistance; it has revealed the increase in the activity of P450s and COEs in Ouro-Houso/Kanadi between 2011 and 2015, as well as the decrease of COE activity in Be-Centre. However, the relationship between the kdt_{50} induced by synergists and the *Kdr* L995F resistance allele which induces an increase in kdt remains to be explored. Furthermore, *An. gambiae* s.l. mortality rate to deltamethrin + DEF in Be-Centre in 2015 was significantly lower than that recorded with deltamethrin alone. In essence, we would expect the deltamethrin + DEF mortality rate to be comparable to that of deltamethrin without DEF, in case COEs have no impact on resistance status. However, this was not the case; DEF rather acted as a deltamethrin resistance stimulus. Similar results have been recorded in previous studies [16], but the reasons for these effects are not clear. Further investigations are needed to better understand the interactions between insecticides and synergists. On top of metabolic-based deltamethrin resistance in Be-Centre and Bala, there were significant variations in the frequencies of the *Kdr* L995F allele among the three species of the *An. gambiae* complex. However, the recorded frequencies of the *Kdr* L995F (13–50%) remain lower than those previously reported in *An. gambiae* s.l. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon (up to 90% frequency). Although the *Kdr* L995S allele was not found in the samples, previous studies revealed that the latter mutation originally described in East Africa has already migrated to Central and West Africa [38–40].

The increase of P450 and COE activities and *Kdr* L995F frequencies recorded in this study can result from the wide use of insecticides in agriculture, public health, and domestic hygiene. The role of agricultural use of insecticides on the selection of *An. gambiae* s.l. resistance to insecticides is well documented [37,40]. Furthermore, the two nationwide LLINs distribution campaigns launched in Cameroon in 2011 and 2015, could have increased the selection pressure on local malaria vector populations. Before the LLIN distribution campaign in 2011, the coverage of vector control (ITNs/IRS) in rural areas of Cameroon was estimated at 10% [41]; net use was also very low in rural areas [42]. Indeed, the selection pressure originating from high LLIN coverage on top of pyrethroids used in urban agriculture and domestic hygiene in Graoua HD settings could explain the high resistance frequencies recorded in the Ouro-Houso/Kanadi urban area, compared with the Be-Centre sub-urban and Bala rural areas [28].

Selection pressure is a major force in evolution [43]. It can take many forms and can affect one, or several loci at the same time and act at different levels with different effects and interactions. Previous studies have anticipated a complex interplay between *Kdr*- and metabolic-based resistance mechanisms in *An. gambiae* s.l. from Cameroon [16]. The current study shows that deltamethrin resistance in semi-urban and rural areas of North Cameroon is now driven mainly by the *Kdr* L995F allele, in addition to P450 and COE detoxification. This is an example of the developmental process of multiple resistance mechanisms in the malaria vectors of the *An. gambiae* complex, which may also happen in other malaria vector

species and in other African countries. The increasing frequencies of *Kdr* 995L/F heterozygotes and the subsequent increase in the *Kdr* L995F allelic frequencies in the presence of metabolic resistance enzymes (P450s and COEs) suggests a recent acquisition and possible overdominance of this resistance gene in the surveyed *An. gambiae*, *An. arabiensis* and *An. coluzzii* populations. This leads to the question of whether *Kdr* 995L/F heterozygous mosquitoes have higher fertility than their homozygous counterparts. Such heterozygote advantages could explain the increase of their frequencies from generation to generation despite ongoing selection pressure in the surveyed locations. Previous studies revealed that *Kdr* heterozygous males of *An. coluzzii* collected from mating swarms in Burkina Faso were more likely to successfully mate than homozygote resistant ones, illustrating a deleterious effect of homozygote resistant *Kdr* allele on *An. coluzzii* paternity success. Furthermore, these male mosquitoes were more competitive compared to homozygous-susceptible ones, indicating a heterozygous fitness advantage [44]. Other laboratory studies showed that the *Kdr* L995F allele positively affects *An. gambiae* life traits in terms of larval survivorship, pupation rate, and blood-feeding success, especially in heterozygote individuals [45]. Still, the fitness effects of *Kdr* L995F allele in natural populations of *An. gambiae* are to further be investigated.

On the operational side, early reduction in ITN effectiveness (i.e., after only 3 months of use) was previously associated with metabolic-based pyrethroid resistance in *An. gambiae* s.l. from North Cameroon [46]. The rapid increase in the frequency of *Kdr* L995F beside metabolic-based pyrethroid resistance can accelerate the decline of the effectiveness of LLINs in this region. Further studies are needed to understand the evolutionary trends of multiple insecticide resistance mechanisms in other regions of Cameroon and design the national strategic plan for resistance management in the coming years.

4. Materials and Methods

4.1. Study Period and Sites

The study was conducted during the rainy seasons, between September and October during two non-consecutive years (2011 and 2015), in 3 locations across three health districts (HD) of the North Cameroon Region (Figure 4), namely Ouro-Houso/Kanadi ($9^{\circ}18' N$; $13^{\circ}24' E$) in the Garoua HD, Be-Centre ($9^{\circ}24' N$; $13^{\circ}31' E$) in the Pitoa HD and Bala ($9^{\circ}46' N$; $13^{\circ}44' E$) in the Mayo Oulo HD. Garoua is the capital city of the North Cameroon Region; Pitoa and Mayo Oulo are located 18 km in the North-East and 90 km in the North of Garoua, respectively. The 3 study sites are located alongside the Bénoué River basin. The climate in these areas is tropical Sudanese characterized by two seasons: one dry season extending from November to May and one rainy season from June to October, with an average annual rainfall between 700–1000 mm and a mean annual temperature of $28.1^{\circ}C$ [47].

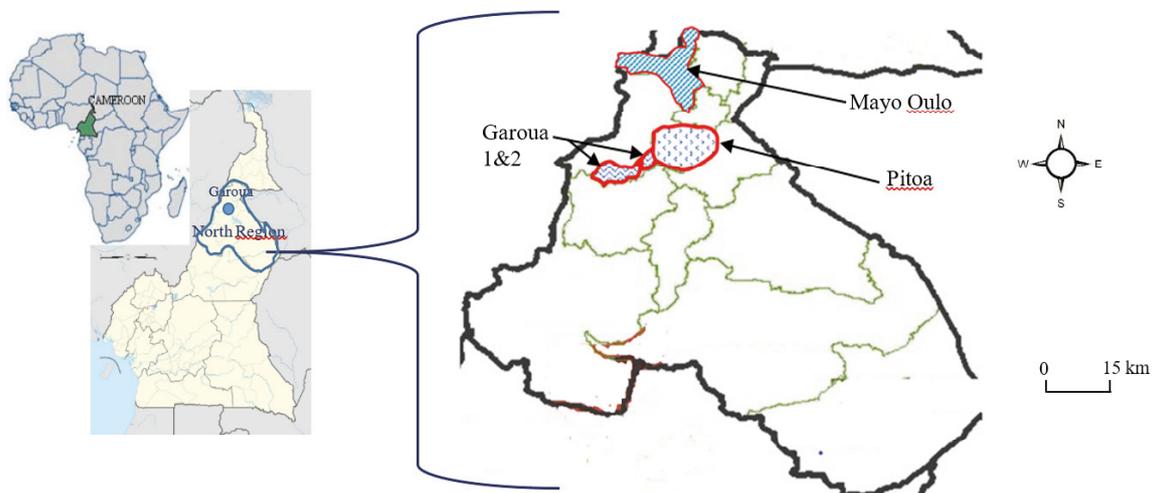


Figure 4. Map of the North Cameroon Region showing the study health districts.

The 3 study sites display different ecological features, including one urban area (Ouro-Houso/Kanadi), one peri-urban setting (Be-Centre), and one rural area (Bala). These sites have been classified according to the rates of built-up land (RBL), i.e., RBL > 50% for urban areas, RBL < 40% for rural areas; 40 < RBL < 50 for peri-urban areas proximate to the city. Crop growing activities are prominent in these HDs, with irrigated rice fields and intensive cotton farming in Pitoa, maize, and peanut cultivation in Mayo-Oulo; while corn, tomatoes, and eggplant are mainly grown in Garoua. The proportions of households owning at least one LLIN (mainly PermaNet 2.0 containing 1.4g/kg \pm 25% deltamethrin) was 60–71%, and the LLINs utilization was 43–54% following the 2011 free LLIN distribution campaign [48]. Before the LLIN distribution campaign, the overall proportion of households owning at least one LLIN in the North Cameroon Region was estimated at 48%; however, net utilization was very low (\approx 13%) [41,42].

Malaria transmission in the study areas is seasonal with a yearly peak of transmission between September and October. Three species of the *An. gambiae* complex (*An. arabiensis*, *An. coluzzii*, *An. gambiae*) and *An. funestus* are responsible for most of the *Plasmodium* parasite transmission, with entomological inoculation rates (EIR) up to 1.2 infective bites/person/night (ib/p/n). *An. arabiensis* and *An. coluzzii* are the most infectious vector species in these areas. Other species, such as *An. pharoensis* and *An. rufipes* play secondary roles in the transmission [49]. *Plasmodium* infection rates in children under five years old were estimated at 48%, 26%, and 18%, in Pitoa, Garoua, and Mayo Oulo HD, respectively. *Plasmodium falciparum* accounts for most of the infections (91.6%), with *P. malariae* at a very low frequency (2.37%) [50].

4.2. Mosquito Collection and Processing

Mosquito larvae and pupae were collected from temporary and permanent water bodies (pools, footprints, flooded rice paddies, riverbeds, puddles in the corn and cotton fields) across the three study sites, using the dipping technique [51]. Collected immature mosquitoes were brought to local insectaries, fed with TetraMindBaby[®] (fry food for larvae), and reared until adult emergence. Adults were fed with 10% glucose solution. They were identified using morphological identification reference keys [52,53], and only female *An. gambiae* s.l. were selected for use in deltamethrin susceptibility tests and molecular analyses.

4.3. Bioassays

With mosquito samples from each study site, three assays were conducted:

1. One assay with sub-samples of mosquitoes not exposed to synergists prior to susceptibility tests, for establishing their resistance status to deltamethrin;
2. Two assays with sub-samples of mosquitoes pre-exposed to synergists for one hour, i.e., piperonyl butoxide (PBO, Sigma Milwaukee, WI) and SSS-tributyl-phosphorothrithioate (DEF, Sigma Milwaukee, WI), for detection of increased activity of two detoxifying enzymes, namely cytochrome P450 oxidases and carboxylesterases, respectively.

Filter papers impregnated with 0.05% deltamethrin were supplied by the Vector Control Research Unit of University Sains Malaysia (Penang, Malaysia). Synergist impregnated papers, i.e., 4% PBO and 0.25% DEF were prepared by the research team at the Malaria Research Laboratory of the Organization for the Coordination of Endemic Disease Control in Central Africa (OCEAC) (Yaoundé, Cameroon).

All bioassays (following exposure to synergists or not) were performed with unfed female mosquitoes aged 3–4 days, under ambient room temperature ranging (25–28 °C) and 70–80% relative humidity, using WHO susceptibility test kits and a standard protocol for adult mosquitoes [30]. Each complete set of bioassays was performed with five batches of 20–25 unfed females, four batches were exposed to insecticide-impregnated filter papers and one batch was exposed to untreated filter paper as a control.

During exposure to insecticides, the number of mosquitoes knocked down was recorded at 5 min intervals. After 1 h exposure, mosquitoes were transferred to holding tubes and provided with cotton pads soaked with 10% sugar solution. The mortality rates were determined 24 h post-exposure.

At each field survey, susceptibility tests were also conducted with 3–5-day-old unfed females of the Kisumu susceptible reference colony of *An. gambiae* maintained in the OCEAC Laboratory of Malaria Research, for more than 25 years.

Mosquitoes used as control batches during susceptibility tests, as well as dead and survivor mosquitoes 24 hours post contact with deltamethrin were kept separately at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for molecular identification of species and *Kdr* genotyping. Each mosquito was individually stored desiccated in labeled Eppendorf tubes.

5. Species Identification and *Kdr* Genotyping

Total DNA of mosquitoes used as control batches during susceptibility tests was extracted using the CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) method [54]. Then mosquito species were identified using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [55]. The *Kdr* L995F and L995S alleles were genotyped using hot oligonucleotide ligation assay (HOLA) as described by Lynd et al. [56].

6. Data Analysis

The knockdown times for 50% and 95% mosquitoes (Kdt_{50} and Kdt_{95}) during exposure to deltamethrin were estimated using a log-probit model [57] and analyses were performed using the WIN DL (version 2.0, 1999) software. The rate of suppression of knockdown time by synergists ($Kdts$) was calculated according to the equation of Thomas et al. [58], which is: $Kdts_{50}$ suppression (%) = $[1 - (Kdt_{50}$ in presence of synergist/ Kdt_{50} in absence of synergist)] $\times 100$, with effective values above 10%.

The resistance status was defined according to the WHO criteria [30]; i.e., mortality rates less than 90% were indicative of resistance, mortality rates between 90% and 97% suggested suspected resistance to be confirmed, while mortality equal to or greater than 98% indicated susceptibility. Allelic frequencies at the *Kdr* 995 locus were calculated using Genepop Online (Version 4.5.1) [59]. Comparisons of mosquito mortality rates to deltamethrin with versus without synergists and the *Kdr* L995F/S allelic frequencies were performed using the Mantel–Haenszel chi-square test.

7. Conclusions

Data from this study show two evolutionary trends of *An. gambiae* s.l. resistance mechanisms to deltamethrin. In the Ouro-Houso/Kanadi urban area, there was a slow emergence of metabolic-based resistance while the frequency of the *Kdr* resistance L995F allele was regressing. Conversely in the Be-Centre peri-urban and Bala rural areas, there was a significant increase of the *Kdr* L995F frequencies, in parallel with the regression of metabolic-based resistance. Combined interventions including PBO bed nets or bed nets impregnated with new insecticides, such as chorphenapyr (class: pyrolle), IRS with clothianidin-containing products (class: neonicotinoid), or any other complementary interventions (larvicides) should be considered for the management of insecticide resistance in this region.

Author Contributions: Conceptualization, J.E., H.P.A.-A., J.D.B., I.K., A.P.M., M.J.D. and E.F.; data curation, S.E.M., W.E.E., A.J.B., M.P., L.R.M., N.M., R.T., P.N. and J.C.T.; funding acquisition, J.E., H.P.A.-A., T.B.K. and A.P.M.; investigation, J.E., S.E.M., H.P.A.-A., J.D.B., W.E.E., A.J.B., M.P., L.R.M., N.M., R.T., P.N., J.C.T. and I.K.; methodology, J.E., S.E.M., H.P.A.-A., J.D.B., W.E.E., A.J.B., M.P., L.R.M., N.M., R.T., P.N., R.M., J.C.T., I.K., M.J.D. and E.F.; project administration, J.E., H.P.A.-A., J.D.B., T.B.K., A.P.M. and E.F.; formal analysis, S.E.M., and P.N.; supervision, J.E., H.P.A.-A., R.M. and M.J.D.; validation, J.E., H.P.A.-A., J.D.B. and I.K.; resources, T.B.K. and A.P.M.; visualization, M.J.D.; writing—original draft, S.E.M. and J.E.; writing—review and editing, J.E., H.P.A.-A., J.D.B., W.E.E.,

A.J.B., M.P., L.R.M., R.T., P.N., R.M., J.C.T., I.K., T.B.K., A.P.M., M.J.D. and E.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding was provided by the Bill and Melinda Gates Foundation (Grant Number: 484991.01). This research forms part of a multi-country study coordinated by the Global Malaria Programme of the World Health Organization. The funders had no role in study design, data collection, a decision to publish, or the preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the Cameroon National Ethics Committee of Cameroon under the reference number FWA IRB00001954 and approved through the authorization number 102/CNE/SE/09.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during the current study are included in this published article.

Acknowledgments: We are grateful to all the residents Ouro-Houssou/Kanadi, Be-Centre, and Bala who gave permission to enter their compounds for mosquito larvae collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- van den Berg, H.; Bezerra, H.S.S.; Al-Eryani, S.; Chanda, E.; Nagpal, B.N.; Knox, T.B.; Velayudhan, R.; Yadav, R.S. Recent trends in global insecticide use for disease vector control and potential implications for resistance management. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
- World Health Organization. Vector-Borne Diseases. 2020. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (accessed on 27 December 2021).
- World Health Organization. World Malaria Report 2021: An in-Depth Update on Global and Regional Malaria Data and Trends. p. 263. Available online: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021> (accessed on 11 January 2022).
- Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Cameron, E.; Bisanzio, D.; Mappin, B.; Dalrymple, U.; Battle, K.; Moyes, C.L.; Henry, A.; Eckhoff, P.A.; et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **2015**, *526*, 207–211. [CrossRef]
- Bertozzi-Villa, A.; Bever, C.A.; Koenker, H.; Weiss, D.J.; Vargas-Ruiz, C.; Nandi, A.K.; Gibson, H.S.; Harris, J.; Battle, K.E.; Rumisha, S.F.; et al. Maps and metrics of insecticide-treated net access, use, and nets-per-capita in Africa from 2000–2020. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3589. [CrossRef] [PubMed]
- Riveron, J.M.; Tchouakui, M.; Mugenzi, L.; Menze, B.D.; Chiang, M.C.; Wondji, C.S. *Insecticide Resistance in Malaria Vectors: An Update at a Global Scale*; Chapter Towards Malaria Elimination; Manguin, S., Ed.; Intech Open: London, UK, 2018; pp. 149–175.
- Martinez Torres, D.; Chandre, F.; Williamson, M.S.; Darriet, F.; Berge, J.B.; Devonshire, A.L.; Guillet, P.; Pasteur, N.; Pauron, D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Ins. Molec. Biol.* **1998**, *7*, 179–184. [CrossRef] [PubMed]
- World Health Organization. *Global Report on Insecticide Resistance in Malaria Vectors: 2010–2016*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018. Available online: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo> (accessed on 27 December 2021).
- Hemingway, J.; Ranson, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* **2000**, *45*, 371–391. [CrossRef] [PubMed]
- Müller, P.; Warr, E.; Stevenson, B.J.; Pignatelli, P.M.; Morgan, J.C.; Steven, A. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000286. [CrossRef]
- Stevenson, B.J.; Bibby, J.; Pignatelli, P.; Muangnoicharoen, S.; O’Neill, P.M.; Lian, L.Y.; Muller, P.; Nikou, D.; Steven, A.; Hemingway, J.; et al. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **2011**, *41*, 492–502. [CrossRef]
- Vontas, J.; Katsavou, E.; Mavridis, K. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2020**, *170*, 104666. [CrossRef]
- Vulule, J.M.; Beach, R.F.; Atieli, F.K.; McAllister, J.C.; Brogdon, W.G.; Roberts, J.M.; Mwangi, R.W.; Hawley, W.A. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med. Vet. Entomol.* **1999**, *13*, 239–244. [CrossRef]
- Chandor-Proust, A.; Bibby, J.; R’Egent-Kloekner, M.; Roux, J.; Guittard-Crilat, E.; Poupardin, R.; Riaz, M.A.; Paine, M.; Dauphin-Villemant, C.; Reynaud, S.; et al. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem. J.* **2013**, *455*, 75–85. [CrossRef]
- Lumjuan, N.; Rajatileka, S.; Changsom, D.; Wicheer, J.; Leelapat, P.; Prapanthadara, L.A.; Somboon, P.; Lycett, G.; Ranson, H. The role of the *Aedes aegypti* epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 203–209.

16. Nwane, P.; Etang, J.; Chouaïbou, M.; Toto, J.C.; Koffi, A.; Mimpfoundi, R.; Simar, F. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon, Central Africa. *Paras. Vect.* **2013**, *6*, 41. [CrossRef] [PubMed]
17. Kisinza, W.N.; Nkya, T.E.; Kabula, B.; Overgaard, H.J.; Massue, D.J.; Mageni, Z. Multiple insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from Tanzania: A major concern for malaria vector control. *Malar. J.* **2017**, *16*, 439. [CrossRef] [PubMed]
18. Oumbouke, W.A.; Pignatelli, P.; Barreaux, A.M.G.; Tia, I.Z.; Koffi, A.A.; Alou, L.P.; Sternberg, E.D.; Thomas, M.B.; Weetman, D.; N'Guessan, R.; et al. Fine scale spatial investigation of multiple insecticide resistance and underlying target-site and metabolic mechanisms in *Anopheles gambiae* in central Côte d'Ivoire. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15066. [CrossRef]
19. Idowu, O.A.; Taiwo, A.A.; Olatunbosun, O.A.; Olukayode, A.; Oluwakemi, A.; Romoke, J.T.; Abdullahi Idowu, G.; Taiwo, A.S. Multiple insecticide resistance mechanisms in urban population of *Anopheles coluzzii* (Diptera: Culicidae) from Lagos, South-West Nigeria. *Acta Tropica* 2021, in press. [CrossRef]
20. Czeher, C.; Labbo, R.; Arzika, I.; Duchemin, J.-B. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar. J.* **2008**, *7*, 189. [CrossRef]
21. Kleinschmidt, I.; Bradley, J.; Knox, T.B.; Mnzava, A.P.; Kafy, H.T.; Mbogo, C.; Ismail, B.A.; Bigoga, J.D.; Adechoubou, A.; Raghavendra, K.; et al. Implications of Insecticide Resistance Consortium, Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: Trends in pyrethroid resistance during a WHO-coordinated multi-country prospective study. *Paras. Vect.* **2018**, *11*, 550.
22. World Health Organisation. *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM)*; WHO: Geneva, Switzerland, 2012. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44846> (accessed on 14 February 2022).
23. FY-PMI. *The PMI VectorLink Cameroon Annual Entomology Report*; The PMI VectorLink Project; Abt Associates: Rockville, MD, USA, 2020; p. 74.
24. Institut National de la Statistique (INS); ICF. *Enquête Démographique et de Santé du Cameroun 2018. Indicateurs Clés*. Yaoundé, Cameroun, et Rockville, Maryland, USA, 2019. 2019, p. 60. Available online: <http://cdnss.minsante.cm/sites/default/files/eds18.pdf> (accessed on 14 February 2022).
25. Etang, J.; Fondjo, E.; Chandre, F.; Morlais, I.; Brengues, C.; Nwane, P.; Chouaïbou, M.; Djemai, A.; Simard, F. First report of the kdr mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 795–797. [CrossRef]
26. Etang, J.; Manga, L.; Toto, J.C.; Guillet, P.; Fondjo, E.; Chandre, F. Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *J. Vect. Ecol.* **2007**, *32*, 123–133. [CrossRef]
27. Müller, P.; Chouaïbou, M.; Pignatelli, P.; Etang, J.; Walker, E.D.; Donnelly, M.J.; Simard, F.; Ranson, H. Pyrethroid tolerance is associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Mol. Ecol.* **2008**, *17*, 1145–1155. [CrossRef]
28. Mandeng, S.E.; Awono-Ambene, H.P.; Bigoga, J.D.; Eyisap Ekoko, W.E.; Binyang, J.; Piameu, M.; Mbakop, L.R.; Fesuh, B.N.; Mvondo, N.; Tabue, R.; et al. Spatial and temporal development of deltamethrin resistance in malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex from North Cameroon. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212024. [CrossRef] [PubMed]
29. Kleinschmidt, I.; Mnzava, A.P.; Kafy, H.T.; Mbogo, C.; Bashir, A.I.; Bigoga, J.; Adechoubou, A.; Raghavendra, K.; Knox, T.B.; Nkuni, Z.J.; et al. Design of a study to determine the impact of insecticide resistance on malaria vector control: A multi-country investigation. *Malar. J.* **2015**, *14*, 282. [CrossRef] [PubMed]
30. World Health Organization. *Test Procedures: For Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*; WHO: Geneva, Switzerland, 2018; p. 56.
31. Wondji, C.; Simard, F.; Petrarca, V.; Etang, J.; Santolamazza, F.; Della Torre, A.; Fontenille, D. Species and populations of the *Anopheles gambiae* complex in Cameroon with special emphasis on chromosomal and molecular forms of *Anopheles gambiae* s.s. *J. Med. Entomol.* **2005**, *42*, 998–1005. [CrossRef]
32. Chouaïbou, M.; Etang, J.; Brévault, T.; Nwane, P.; Kérah Hinzoumbé, C.; Mimpfoundi, R.; Simard, F. The dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop. Med. Int. Health.* **2008**, *13*, 476–486. [CrossRef] [PubMed]
33. Simard, F.; Ayala, D.; Kamdem, G.C.; Pombi, M.; Etouana, J.; Ose, K.; Fotsing, J.M.; Fontenille, D.; Besansky, N.J.; Costantini, C. Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: The ecological side of speciation. *BMC Ecol.* **2009**, *9*, 17. [CrossRef]
34. Gimonneau, G.; Pombi, M.; Choisy, M.; Morand, S.; Dabiré, R.K.; Simard, F. Larval habitat segregation between the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso. *Med. Vet. Entomol.* **2011**, *26*, 17.
35. Etang, J.; Mbida Mbida, A.; Ntonga Akono, P.; Binyang, A.J.; Eboumbou Moukoko, C.E.; Lehman, L.G. *Anopheles coluzzii* larval habitat and insecticide resistance in the island area of Manoka, Cameroon. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 217. [CrossRef] [PubMed]
36. Tene Fossog, B.; Antonio-Nkondjio, C.; Kengne, P.; Njiokou, F.; Besansky, N.J.; Costantini, C. Physiological correlates of ecological divergence along an urbanization gradient: Differential tolerance to ammonia among molecular forms of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol.* **2013**, *13*, 1. [CrossRef]
37. Nwane, P.; Etang, J.; Chouaïbou, M.; Toto, J.C.; Mimpfoundi, R.; Awono-Ambene, H.P.; Kérah Hinzoumbé, C.; Simard, F. Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infect Dis.* **2009**, *9*, 163. [CrossRef]

38. Ndjemai, H.N.M.; Patchoké, S.; Atangana, J.; Etang, J.; Simard, F.; Bilong Bilong, C.F.; Reimer, L.; Cornel, A.; Lanzaro, G.C.; Fondjo, E.; et al. The distribution of insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.l* populations from Cameroon: An update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 1127–1138. [[CrossRef](#)]
39. Nwane, P.; Etang, J.; Chouaibou, M.; Toto, J.C.; Mimpfoundi, R.; Simard, F. Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae s.s.* populations in Cameroon: Spread of the L1014F and L1014S mutations. *BMC Res. Notes* **2011**, *4*, 463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Diabaté, A.; Baldet, T.; Chandre, F.; Akogbéto, M.; Guiguemde, T.R.; Darriet, F.; Brengues, C.; Guillet, P.; Hemingway, J.; Small, G.J.; et al. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae s.l.* in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *67*, 617–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wounang, R.; Ketchoum Ngahane, G.C. Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples (EDS-MICS). *Paludisme* **2011**, *11*, 187–204. Available online: <http://onsp.minsante.cm/sites/default/files/publications/28/FR260.pdf> (accessed on 3 November 2021).
42. Bowen, H. Cameroon Malaria Knowledge, Attitudes, and Practices Progress from 2011 to 2012. Malaria No More, Final Evaluation Report, New York, NY 10016, USA, 2012, p. 45. Available online: <https://www.cominit.com/content/cameroon-malaria-knowledge-attitudes-and-practices-progress-2011-2012> (accessed on 14 February 2022).
43. Andrews, C.A. Natural Selection, Genetic Drift, and Gene Flow Do Not Act in Isolation in Natural Populations. *Nat. Educ. Knowl.* **2010**, *3*, 5.
44. Platt, N.; Kwiatkowska, R.M.; Irving, H.; Diabate, A.; Dabire, R.; Wondji, C.S. Target site resistance mutations (kdr and RDL), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Heredity* **2015**, *115*, 243–252. [[CrossRef](#)]
45. Medjigbodo, A.A.; Djogbenou, L.S.; Djihinto, O.Y.; Akoton, R.B.; Abbey, E.; Kakossou, R.M.; Sonounameto, E.G.; Salavi, E.B.J.; Djossou, L.; Badolo, A. Putative pleiotropic effects of the knockdown resistance (L1014F) allele on the life-history traits of *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* **2021**, *20*, 480. [[CrossRef](#)]
46. Etang, J.; Chouaibou, M.; Toto, J.C.; Faye, O.; Manga, L.; Samè-Ekobo, A.; Awono-Ambene, P.; Simard, F. A preliminary test of the protective efficacy of Permethrin-treated bed nets in an area of *Anopheles gambiae* metabolic resistance to pyrethroids in North Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *101*, 881–884. [[CrossRef](#)]
47. World Meteorological Organization (WMO). *World Weather Information Service-Douala*; World Meteorological Organization: Douala, Cameroon, 2018; Retrieved.
48. Ekoko, W.E.; Awono-Ambene, H.P.; Bigoga, J.; Mandeng, S.E.; Piameu, M.; Nvondo, N.; Toto, J.C.; Nwane, P.; Patchoke, S.; Mbackop, L.R.; et al. Patterns of Anopheline feeding/resting behaviour and *Plasmo-dium* infections in North Cameroon, 2011–2014: Implications for malaria control. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 297. [[CrossRef](#)]
49. Tabue, R.N.; Awono-Ambene, P.; Etang, J.; Atangana, J.; Antonio-Nkondjio, C.; Toto, J.C.; Leke, R.G.F.; Fondjo, E.; Mnzava, A.P.; Knox, T.B.; et al. Role of *Anopheles (Cellia) rufipes* (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon: A cross-sectional survey. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 22. [[CrossRef](#)]
50. Tabue, R.; Alungamoh, B.N.; Zeukeng, F.; Esemu, L.F.; Fodjo Yetgang, A.B.; Kouambeng, C.; Awono-Ambene, H.P.; Fondjo, E.; Achu, D.; Leke, R.G.; et al. Case definition of clinical malaria in children from three health districts in the region of North Cameroon. *Biomed. Res. Int.* **2019**, 9709013. [[CrossRef](#)]
51. Lumsden, W.H.R.; Service, M.W. Mosquito Ecology. Field Sampling Methods. *J. Appl. Ecol.* **1977**, *14*, 651. [[CrossRef](#)]
52. Gillies, M.T.; De Meillon, B. The anophelinae of Africa south of the Sahara. *Pub. South. Afr. Inst. Med. Res.* **1968**, *54*, 343.
53. Gillies, M.T.; Coetzee, M. Supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (afrotropical region). *Pub. South Afr. Inst. Med. Res.* **1987**, *55*, 143.
54. Collins, F.H.; Mendez, M.A.; Razmussen, M.O.; Mehaffey, P.C.; Besansky, N.J.; Finnerty, V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1987**, *37*, 37–41. [[CrossRef](#)]
55. Fanello, C.; Santolamazza, F.; Della Torrè, A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complexe by PCR-RFLP. *Med. Vet. Entomol.* **2002**, *16*, 461–464. [[CrossRef](#)]
56. Lynd, A.; Ranson, H.; McCall, P.J.; Randle, N.P.; Black, I.V.W.C.; Walker, E.D.; Donnelly, M.J. A simplified high-throughput method for pyrethroid knockdown resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* **2005**, *4*, 1–16. [[CrossRef](#)]
57. Finney, D.J. *Probit Analysis*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1971.
58. Thomas, A.; Kumar, S.; Pillai, M.M.K. Pyperonyl butoxide as a counter measure for deltamethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say. *Entomon* **1991**, *18*, 1–10.
59. Rousset, F. GENEPOP '007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* **2008**, *8*, 103–106. [[CrossRef](#)]