

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE

LABORATORY OF PARASITOLOGY AND ECOLOGY

Efficacité des traitements larvicides pour le contrôle des anophèles vecteurs de paludisme dans la ville de Yaoundé

Mémoire

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des Organismes
Animaux**

Option : Parasitologie et Ecologie

Par

NGOUNGORE NJANKOUO Fatimat Anina

Matricule : 13O2104

Licenciée ès Sciences



Sous la direction de

et

la supervision de

ANTONIO-NKONDJIO Christophe, Ph.D, HDR

MONY Ruth épouse NTONE, Ph.D

Chargé de Recherche

Maître de Conférences

OCEAC, Cameroun

Université de Yaoundé I

Année 2020

DEDICACE

*Je dédie humblement ce mémoire à mes
parents :
feu papa NJANKOUO Issah et maman
NDAMBOKET Adija épouse NJANKOUO.*

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le résultat de la collaboration entre l'Université de Yaoundé I et l'Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) à Yaoundé.

Je rends grâce **au Dieu tout puissant**, de m'avoir accordé tout au long de cette année écoulée, la force, le courage, la patience et la santé nécessaire pour l'accomplissement ce travail.

Je tiens à remercier vivement et très sincèrement :

- le Secrétaire Exécutif de l'OCEAC, **Dr Manuel-Nso OBIANG**, pour m'avoir autorisé à effectuer un stage académique dans l'institution dont il a la charge;
- mon directeur **Dr ANTONIO NKONDJIO Christophe** pour m'avoir accueillie et guidée mes premiers pas dans le monde de la recherche scientifique en m'offrant les conditions idéales de travail. Sa simplicité et sa rigueur m'ont toujours motivée ;
- mon superviseur **Pr MONY Ruth épouse NTONE** pour ses orientations, ses conseils, ses multiples encouragements tout au long de ce travail. Votre personnalité a toujours été une source d'inspiration pour moi ;
- **Dr AWONO AMBENE Parfait**, chef de Service Recherche à l'OCEAC pour son accueil au sein du laboratoire de recherche sur le paludisme et ses conseils ;
- le Welcome Trust fund, pour le financement de cette étude ;
- **Pr KEKEUNOU Sévilor**, pour les orientations, les conseils, les multiples encouragements témoignés à mon égard. Il a bien voulu me recommander pour un stage à l'OCEAC, c'est à lui que je dois tout ce que j'ai appris pendant cette période ;
- **Pr BILONG BILONG Charles Felix**, Chef de Département de Biologie et Physiologie Animales, pour les enseignements et conseils reçus ;
- **aux enseignants** du Département en particulier **Pr NJIOKOU Flobert**, **Pr FOMENA Abraham** et **Dr MBENOUN Paul** pour les conseils et la qualité des enseignements reçus ;
- le technicien de laboratoire **M. AGBOR Jean Pierre** pour l'apprentissage et l'assistance au laboratoire ;
- mes aînés et camarades de la « **Team Antonio** » et ceux qui m'ont soutenu dans les manipulations, les lectures et analyses statistiques. Il s'agit de **M. BAMOU Roland**, **M. KOPYA Edmond**, **M. MOUCHILI Souleman**, **M. TALIPOUO Abdou**, **M. TCHAMEN Borel**, **M. BEN BECHIR Cherif**, **M. NGANGUE Idriss Nasser**, **M. DJAMOUKO Landre**, **Mlle NKAHE Diane Leslie**, **Mlle DOUMBE BELISSE**

Patricia, Mlle NGADJEU Sandra, Mlle NANA Stella, Mlle KALA Nelly, Mlle CHIANA Nadège

- **l'équipe des temporaires** sollicitée lors des phases de traitements dans les différents quartiers, grand merci pour le coup de main ;
- **mon papa** qui durant son vivant a toujours mis en jeu tous les moyens nécessaires pour m'offrir une bonne éducation, je ne trouverai jamais les mots exacts pour lui exprimer tout mon amour et toute ma fierté. Il n'est pas là aujourd'hui pour voir la soutenance de sa fille mais qu'il sache qu'il est et restera dans mon cœur pour tout le reste de ma vie. Qu'Allah lui accorde son paradis.
- **ma maman** pour la vie qu'elle m'a donnée, pour le rôle de papa qu'elle joue, pour son amour et son affection à mon égard ; sache que ce travail est le fruit de grands sacrifices que tu as consenti pour moi. Aucune expression ne suffirait pour exprimer l'amour et l'admiration que j'éprouve à ton égard, puisse ce mémoire être les prémices de la joie qui apaisera tous tes sacrifices. Qu'Allah fasse de toi une des femmes du paradis.
- mes frères et sœur **NSANGOU NJANKOUO Ibrahim Salem, ABDEL PAGNA FOIKWET Karim et PEMBOURA NJANKOUO Assna Linda** pour les multiples encouragements, le soutien tant moral que financier et surtout l'amour et l'affection à mon égard ;
- **Dr NGOUHOUO MFONDI Ibrahim** pour son soutien tant moral que financier et surtout pour l'affection à mon égard. Ses encouragements, ses conseils m'ont permis de me sentir bien et de mener à bout ce travail. Aucun mot ne serait assez suffisant pour le remercier ;
- **ma famille** en particulier **DAOUDA JAWARA, NJELI Amid, NGOUEN Abdel Rahman, MOHAMED Beloumi et NGOUNGOURE Salamatou** pour le soutien moral et la sympathie à mon égard ;
- mes amies, **Dr TSOGNAM Adissa, MELEGWO Sandra, MAMBE Hagar, MAFEUKOU Elodie et MOUCHILI Boureidah** pour les encouragements, toutes les expériences partagées et pour l'amour que vous me portez ;
- mes amies de promotion Syncytium, **NGONGANG LAMO Sonia , NDJEUNIA MBIAKOP Paulette, TANGUEP Joëlle et FOKA Antonia** pour les encouragements et les rapports fraternels qui ont régné entre nous durant notre parcours académique ;
- tous mes camarades de la « **Promotion Syncytium** » pour les encouragements ;
- **ceux qui de près ou de loin** ont contribué à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
SOMMAIRE	iv
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	viii
RESUME.....	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	3
I.1- Généralités sur les vecteurs du paludisme	3
I.1.1- Position systématique des anophèles	4
I.1.2- Diversité des anophèles et notion de complexe d'espèces : le complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l. White, 1958.....	5
I.1.3- Cycle de développement	5
I.1.4- Cycle biologique des anophèles.....	9
I.1.5- Bio-écologie des anophèles	10
I.2- Distribution géographique des anophèles en Afrique et au Cameroun.....	11
I.3- Généralités sur les agents pathogènes du paludisme	12
I.3.1- Position systématique du genre <i>Plasmodium</i>	12
I.3.2- Espèces de <i>Plasmodium</i> parasites de l'homme.....	12
I.3.3- Cycle de développement des plasmodies.....	12
I.4- Mesures de lutte anti-vectorielle.....	14
I.4.1- Lutte anti-larvaire	14
I.4.2- Lutte anti-imago.....	15
I.5- Généralités sur le larvicide vectoMax G.....	16
I.5.1- <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> sérotype H14 souche AM65-52	16
I.5.2 <i>Bacillus sphaericus</i> souche 2362, ABTS 1743	18
I.5.3.-Mode d'action du vectoMax G	19
I.5.4-Paramètres influençant l'efficacité des bacilles.....	19
CHAPITRE II : SITE D'ETUDE, MATERIEL ET METHODES.....	21

II.1. Site d'étude	21
II.2- Matériel	22
II.2.1- Matériel biologique	22
II.2.2- Autres matériel	22
II.3- Méthodes	23
II.3.1- Prospection des gîtes larvaires.....	23
II.3.2- Traitement des gîtes larvaires.....	23
II.3.3- Evaluation des gîtes larvaires	23
II.3.4- Collecte et conservation des larves.....	24
II.3.5- Analyses de laboratoire.....	24
II.3.6- Analyse statistique des données	27
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	29
III.1- Résultats	29
III.1.1- Caractérisation physique, biologique et environnementale des gîtes larvaires d'anophèles.....	29
III.1.2- Distribution des gîtes larvaires d'anophèles dans les quartiers traités et témoins.....	30
III.1.3- Efficacité des traitements larvicides sur les gîtes d'anophèles.....	30
III.1.4 – Evaluation de l'impact des traitements sur la dynamique de colonisation des gîtes larvaires avant et après les traitements dans les quartiers traités et témoins	32
III.1.5 – Evaluation de l'impact des traitements larvicides sur la distribution saisonnière des gîtes larvaires à anophèle avant et après l'intervention dans les quartiers traités et témoins	33
III.1.6- Evaluation de l'impact des traitements larvicides sur la composition du complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	34
III.1.7- Distribution des membres du complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l en fonction des quartiers	36
III.2- Discussion	37
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERPECTIVES	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Distribution globale des anophèles dans le monde.	3
Figure 2: Schéma d'un œuf d'anophèle.....	6
Figure 3: Caractérisation morphologique d'anophèle.....	7
Figure 4: Schéma de la nymphe d'anophèle.....	8
Figure 5: Caractérisation morphologique d'un moustique adulte	8
Figure 6: Cycle biologique des anophèles.....	10
Figure 7: Distribution des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l. en Afrique.....	11
Figure 8: Cycle biologique des plasmodies.....	14
Figure 9: Schéma de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	17
Figure 10: Schématisation du cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	18
Figure 11: Schéma de <i>Bacillus sphaericus</i> en cours de sporulation, montrant la spore (forme de résistance) et le cristal protéique contenant les toxines actives sur les larves de moustiques.....	19
Figure 12: Mode d'action de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> et <i>Bacillus sphaericus</i>	19
Figure 13: Localisation des sites traités et des sites témoins dans la ville de Yaoundé.	22
Figure 14: Collecte des larves par la méthode de « dipping ».....	24
Figure 15: Programme d'amplification de la PCR SINE pour identification des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> s.l.....	26
Figure 16: Variation des pourcentages moyens des gîtes positifs à anophèles avant et après les traitements en fonction des mois.....	31
Figure 17: Variation des pourcentages moyens des gîtes positifs à anophèles avant et après les traitements en fonction des quartiers traités.....	32
Figure 18: Variation des pourcentages moyens des gîtes positifs à anophèles avant et après l'intervention du biolarvicide.	32
Figure 19: Variation de la fréquence saisonnière des gîtes larvaires	34
Figure 20: Variation de la fréquence des gîtes peuplés des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l avant et après la lutte anti-larvaire dans les quartiers traité.....	35
Figure 21: Variation de la fréquence des gîtes peuplés des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l avant et après la lutte anti-larvaire dans les quartiers témoins.....	35
Figure 22: Composition du complexe <i>Anopheles gambiae</i> s.l.	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Préparation du milieu réactionnel (mix).....	26
Tableau II: Caractéristiques générales de gîtes larvaires retrouvés avec les larves d'anophèles dans les quartiers traités et témoins.	29
Tableau III: Distribution des gîtes larvaires en fonction du statut traité et témoin des sites.	30
Tableau IV: Comparaison de la fréquence des gîtes dans les sites traités et témoins avant et pendant l'intervention.	33

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Bsph : *Bacillus sphaericus*

Bti : *Bacillus thuringiensis israelensis*

BUCREP : Bureau Central de Recensement et d'Etude de la Population

DDT: Dichloro,Diphenyl Trichloroethane

DNTPs : diNucléotides TriPhosphates

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

GPS: Global Positionning System

MILDA : Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action

OCEAC : Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale

PCR : Polymerase Chain Reaction

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paire de base

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

SINE-PCR : Short INterspersed Element-PCR

TAE : Tris-Acétate-EDTA

RESUME

La lutte contre les vecteurs du paludisme devient de moins en moins efficace du fait de l'expansion de leur résistance aux insecticides, du changement du comportement de piqure et de repos des moustiques, et de la faible utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides. Cette situation nécessite des mesures complémentaires afin d'améliorer le contrôle de cette maladie. La lutte anti-larvaire peut constituer une intervention complémentaire capable d'améliorer l'efficacité des mesures actuelles mais, jusqu'à présent, très peu d'essais de cette méthode ont été menés sur le continent. Dans le cadre de la présente étude, nous évaluons l'efficacité de la lutte anti-larvaire, à l'aide du larvicide vectoMax G, dans le contrôle des populations de moustiques dans la ville de Yaoundé.

Cette étude a été réalisée sur une période de 13 mois (novembre 2018 à novembre 2019) dans 14 quartiers de la ville de Yaoundé dont sept appartenant au groupe témoin et sept au groupe traité. Dans les quartiers traités, toutes les mares d'eau avec ou sans larves ont subi une application du vectoMax G (combinant les espèces lâchées de *Bacillus thuringiensis israelensis* et de *Bacillus sphaericus*) une fois tous les 14 jours. Les évaluations des sites étaient réalisées 24 à 48 heures après chaque traitement et une fois par mois dans les sites témoins. La recherche des larves dans les mares était effectuée par la technique du dipping. Au cours des prospections larvaires, les paramètres suivants étaient relevés : la présence et la densité des larves ainsi que leurs stades de développement. Les larves d'anophèles étaient collectées dans au moins cinq gîtes par quartier au cours des descentes. Elles étaient conservées dans de l'alcool 100% pour des identifications morphologiques et moléculaires par la technique de PCR.

Les résultats ont montré que l'application du larvicide vectoMax G dans les mares d'eau a significativement diminué la présence et la densité des larves d'anophélins. Des taux de réduction de plus de 90% ont été relevés dans les quartiers Essos, Shell Obili, Mendong et Mvog-Besti. Une forte réduction des gîtes colonisés par des larves de moustiques a été relevée en saison sèche par rapport à la saison des pluies. *Anopheles gambiae* s.s. et *Anopheles coluzzii* ont été les deux membres du complexe *Anopheles gambiae* s.l retrouvés dans nos sites d'étude. Les traitements larvicides n'ont eu aucun impact sur la distribution de ces deux espèces avec des fréquences supérieures à 85%, *An. coluzzii* étant l'espèce prédominante dans les quartiers traités et témoins avant et pendant les traitements.

Cette étude a montré l'efficacité de la lutte anti-larvaire à l'aide du biolarvicide vectoMax G qui devrait désormais être intégré parmi les interventions à préconiser dans le cadre de la prévention du paludisme au Cameroun.

Mots clés : anophèle, paludisme, distribution, lutte anti-larvaire, *Bacillus thuringiensis israelensis*(Bti), *Bacillus sphaericus* (Bsph), Yaoundé.

ABSTRACT

Vector control is becoming less effective due to the expansion of insecticides resistance, changes in mosquito biting and resting behaviour, and the low use of insecticide-treated nets. This situation requires additional measures to improve malaria control. Larviciding may be a complementary intervention capable of improving the effectiveness of current measures, but to date very few larviciding control trials have been conducted in Africa. In this study, we assessed the effectiveness of larval control, using vectoMax G larvicide in controlling mosquito populations in the city of Yaounde.

This study was carried out over a 13 months period (november 2018 to november 2019) in 14 clusters in the city of Yaoundé, seven of which belonged to the control group and seven to the treated group. In treated clusters, all water bodies with or without larvae were treated with vectoMax G (combining the released species of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*) once every two weeks. Quality control of treatments were conducted 24 to 48 hours after treatment. Checking of water bodies were conducted in control clusters as well, once a month. Larval collection was done using the dipping method. During larval surveys, the presence and density of larvae and their stages of development were recorded. Anopheles larvae were collected from at least five breeding sites per clusters. They were preserved in 100% alcohol for morphological and molecular identifications by the PCR technique.

The results showed that the use of vectoMax G larvicide in water bodies significantly decreased the presence and density of anopheline larvae. Reduction rates of more than 90% were observed at Essos, Shell Obili, Mendong and Mvog-Besti. A high reduction in the number of mosquito breeding sites was recorded in the dry season compared to the rainy season. *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles coluzzii* were the two members of the *Anopheles gambiae* s.l. complex found in our study sites. Larviciding had no impact on the distribution of these two species. With frequencies greater than 85%, *An. coluzzii* remained the predominant species in treated and control areas before and during treatment.

This study showed the effectiveness of larval control using VectoMax G biolarvicide, which should now be included in the interventions to be advocated in the context of malaria prevention in Cameroon.

Keywords: anopheles, malaria, distribution, larval control, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, Yaounde.

La situation sanitaire actuelle des pays tropicaux est dominée par les maladies à transmission vectorielle, parmi lesquelles le paludisme, transmis par les moustiques du genre *Anopheles* Meigen, 1818, est l'affection parasitaire la plus répandue dans le monde et l'un des principaux problèmes de santé publique qui touchent principalement l'Afrique subsaharienne (OMS, 2011). La moitié de la population mondiale vit en zone endémique. En 2018, 228 millions de cas et 405 000 décès dûs au paludisme ont été enregistrés en Afrique ; les couches les plus atteintes sont les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (OMS, 2019). Le Cameroun reste particulièrement concerné avec 2 133 523 cas d'infection palustre ayant conduit à 3263 décès en 2018. Cette maladie représente 25,9% des motifs de consultations dans les formations sanitaires, 31,5% de décès chez les enfants de moins de 5 ans et 49% des motifs d'hospitalisations (PNLP, 2019).

Pour réduire le fardeau de cette affection, l'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) est la principale méthode de lutte préconisée (Minsante, 2012). Cet outil a contribué à réduire la morbidité palustre entre 2000 et 2015 (OMS, 2013 ; Bhatt *et al.*, 2015). Toutefois, malgré cette réduction, une forte augmentation des cas de paludisme a été enregistrée à travers le monde, soulignant la nécessité de renforcer la prise en charge et la prévention de cette maladie.

En effet, les études menées jusqu'ici ont signalé une expansion rapide de la résistance aux insecticides [DichloroDiphenylTrichloroethane (DDT), pyréthriinoïdes et carbamates] chez les vecteurs de paludisme, un changement de leur comportement de piquûre et de repos et même de la composition de leurs peuplements (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017 ; Doumbe-Belisse *et al.*, 2018 ; Bamou *et al.*, 2019) limitant ainsi l'efficacité des MILDA. Cette situation relève la nécessité de rechercher des mesures complémentaires aux MILDA afin de renforcer la lutte contre le paludisme. Parmi ces mesures complémentaires possibles, la lutte anti-larvaire est une intervention jusqu'ici très peu implémentée en Afrique où, pourtant elle est particulièrement indiquée en zone urbaine (OMS, 2013). Différentes stratégies à l'instar de l'aménagement de l'environnement, l'utilisation des prédateurs, des régulateurs de croissances ou des bactéries peuvent servir dans le cadre de la lutte anti-larvaire. Les bactéries entomopathogènes comme *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) Berliner, 1915 et *Bacillus sphaericus* (*Bsph*) Strain, 1593 utilisées comme larvicides ont démontré une bonne efficacité contre les larves d'anophèles et de culicidés (Meilleur *et al.*, 2010 ; Kandyata *et al.*, 2012 ; Diédhiou *et al.*, 2017 ; Derua *et al.*, 2018 ; Derua *et al.*, 2019). Le vectoMax G est une nouvelle formulation biolarvicide qui combine les deux bactéries suscitées et qui est actuellement

utilisée dans la ville de Yaoundé dans le cadre d'un programme de lutte anti-larvaire. Du fait que jusqu'à présent aucune étude à large échelle n'a évalué l'efficacité de la lutte anti-larvaire à l'aide de biolarvicide sur la faune anophélienne du Cameroun, nous ne disposons pas d'informations sur l'impact de ladite lutte sur la distribution de ces insectes. Nous ne savons pas si cette lutte pourrait réduire significativement les densités de moustiques atteignant l'âge adulte et la transmission du paludisme à l'homme. Dans le cadre du présent mémoire, nous évaluons l'impact de l'action combinée de *Bacillus thuringiensis israelensis* et de *Bacillus sphaericus* (vectoMax G) sur la distribution des larves des anophèles vecteurs de paludisme dans la ville de Yaoundé. Plus spécifiquement il s'agit d'évaluer l'impact des traitements larvicides :

- sur la réduction de fréquence des larves d'anophèles dans les mares d'eau ;
- sur la distribution saisonnière des larves d'anophèles;
- sur la distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l dans la ville de Yaoundé.

Ce mémoire est organisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à la revue de la littérature ; le second chapitre expose le matériel et les méthodes utilisés, enfin le troisième chapitre présente les résultats acquis et les discute. Une conclusion dans laquelle sont dégagées quelques perspectives et recommandations est proposée à la fin du document.

I.1- Généralités sur les vecteurs du paludisme

Les anophèles sont les seuls insectes vecteurs du paludisme humain (Rhodain *et al.*, 1985). Le genre *Anopheles* a été établi en 1818 par Johann Wilhelm Meigen, entomologiste allemand célèbre pour ses travaux révolutionnaires sur les Diptères. Au 21^e siècle on dénombre plus de 500 espèces d'anophèles dans le monde (Harbach, 2012) mais seulement une soixantaine assure plus la transmission des plasmodies humaines. Les anophèles sont présents un peu partout dans le monde (figure 1) à l'exception des zones polaires (Alaska, Sibérie, Antarctique), des îles du Pacifique central ou occidental, de quelques îles isolées des océans Atlantique et Indien, ainsi que les Falkland du sud du Chili et de l'Argentine (Carnevale *et al.*, 2009).

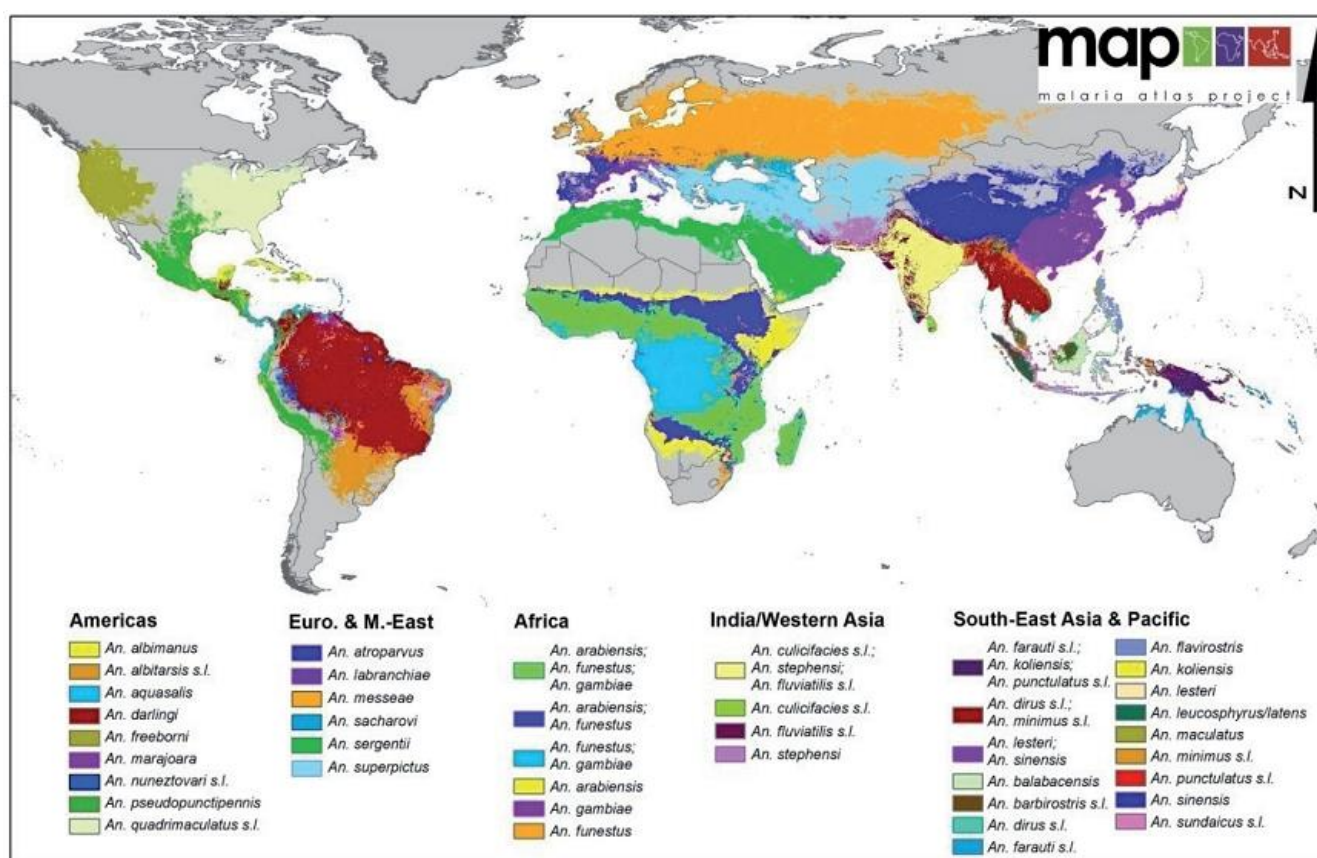


Figure 1: Distribution globale des anophèles dans le monde (Sinka *et al.*, 2012).

Au Cameroun, plus de 50 espèces d'anophèles ont été signalées, ce qui rend cette faune l'une des plus diversifiées d'Afrique (Hervy *et al.*, 1998). De toutes ces espèces, seules seize sont reconnues comme vecteurs principaux et/ou secondaires du paludisme et sont impliquées dans la transmission permanente ou occasionnelle de ses agents pathogènes (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006, 2019 ; Tabue *et al.*, 2014 ; Awono-Ambene *et al.*, 2018). Les taxa considérés comme vecteurs principaux du paludisme sont : *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus*,

An. nili et *An. moucheti* (Wondji *et al.*, 2005). Ceux qui sont des vecteurs secondaires ou assurent une transmission occasionnelle ou temporaire sont : *An. ovengensis*, *An. paludis*, *An. ziemanni*, *An. coustani*, *An. pharoensis*, *An. marshallii*, *An. rufipes*, *An. carnevalei*, *An. hancocki*, *An. lesoni* et *An. wellcomei* (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 ; Tabue *et al.*, 2014, 2017, Awono-Ambene *et al.*, 2018).

I.1.1- Position systématique des anophèles

D'après Harbach (2004) et Gillot (2005), la position systématique des anophèles peut se résumer comme suit :

- **Embranchement des Arthropodes Latreille, 1829 :**
 - Présence d'appendices articulés
 - Présence d'une symétrie bilatérale
- **Sous-embranchement des Hexapodes Blainville, 1816 :**
 - Corps divisé en 3 tagmes (tête-thorax-abdomen)
 - Présence de 3 paires de pattes thoraciques
- **Classe des Insectes Linnaeus, 1758 :**
 - Pièces buccales visibles à l'extérieur
 - Présence de l'organe de Johnston sur le scape antennaire
- **Sous-classe des Ptérygotes Lang, 1888 :**
 - Présence d'ailes au moins à un stade de leur développement post-embryonnaire
- **Section des Oligonéoptères :**
 - Champ jugal avec une seule nervure longitudinale simple
 - Ebauche alaires visible qu'à l'avant dernier stade
- **Ordre des Diptères (Linné, 1758) :**
 - Présence d'une paire d'ailes portées par le mésothorax, les ailes postérieures étant transformées en balanciers
 - Pièces buccales de type piqueur-suceur
- **Sous-ordre des Nématocères (Latreille, 1825) :**
 - Antennes longues et multiarticulées
 - Pronotum séparé du mésonotum par une suture transverse
- **Famille des Culicidae Meigen, 1818 :**
 - Bord postérieur des ailes frangé d'écailles
 - Corps recouvert d'écailles filiformes
- **Sous-famille des Anophelinae (Théobald, 1905) :**
 - Scutellum régulièrement courbé au bord postérieur

- Trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête
- **Tribu des Anophelini**
- **Genre *Anopheles* (Meigen, 1918) :**
 - Présence ou non de touffes latérales sur l'abdomen
 - Taches formées par des écailles claires et sombres sur la costa

I.1.2- Diversité des anophèles et notion de complexe d'espèces : le complexe *Anopheles gambiae* s.l. White, 1958

Certaines espèces d'anophèles appartiennent à des groupes ou complexes d'espèces (Reid, 1965). On désigne par complexe d'espèces, un ensemble de taxa morphologiquement identiques mais qui diffèrent par des caractéristiques génétiques (Fontenille *et al.*, 2003). Le genre *Anopheles* compte sept complexes dont le plus important sur le plan épidémiologique est *Anopheles gambiae* s.l. Theobald, 1902. Ce complexe compte actuellement neuf espèces jumelles (Coluzzii *et al.*, 2002 ; Coetzee *et al.*, 2013) dont la distribution en Afrique est fonction de leur écologie et qui sont :

- *Anopheles melas* (zones côtières de l'Afrique de l'Ouest et Centrale) et *An. merus* (zones côtières de l'Afrique de l'Est) qui se retrouvent dans les eaux saumâtres ;
- *Anopheles bwambiae* qui vit dans les sources minérales de la forêt de Semliki en Uganda ;
- *Anopheles gambiae* s.s., *An. coluzzii* et *An. arabiensis* qui exploitent une multitude de gîtes naturels ou anthropiques, *An. quardriannulatus* et *An. amharicus* qui évoluent dans les eaux douces d'Afrique tropicale (Fontenille *et al.*, 2003) ;
- *Anopheles comorensis* qui se retrouve dans les gîtes naturels de Comores et Madagascar (Ayala *et al.*, 2019).

Anopheles gambiae s.s., *An. arabiensis* (Fontenille *et al.*, 2003 ; Sinka *et al.*, 2012) et *An. coluzzii* (Coetzee *et al.*, 2013) sont les 3 espèces du complexe *An. gambiae* s.l. qui sont reconnues comme vecteurs majeurs du paludisme en Afrique.

I.1.3- cycle de développement

Les anophèles sont des insectes à métamorphose complète ou holométaboles (Holstein, 1949) car les stades immatures diffèrent complètement de l'adulte. Leur développement est marqué par deux phases successives : une phase aquatique qui concerne l'œuf, les larves et la nymphe (stades pré imaginaires) et une phase aérienne représentée par l'adulte (stade imaginal).

I.1.3.1- Œuf

Lors de la ponte, l'anophèle femelle libère de 50 à 300 œufs ; ceux-ci ont une forme allongée, mesurent chacun 0,5 millimètre de longueur et ont une couleur blanchâtre qui brunit avec le temps. Ces œufs pondus isolément possèdent généralement 2 flotteurs latéraux (figure 2). L'œuf comprend 3 membranes :

- **la membrane interne** qui entoure le vitellus et l'embryon ;
- **l'endochorion** qui durcit peu après la ponte et peut être coloré en brun foncé ;
- **l'exochorion** qui présente différentes ornements.

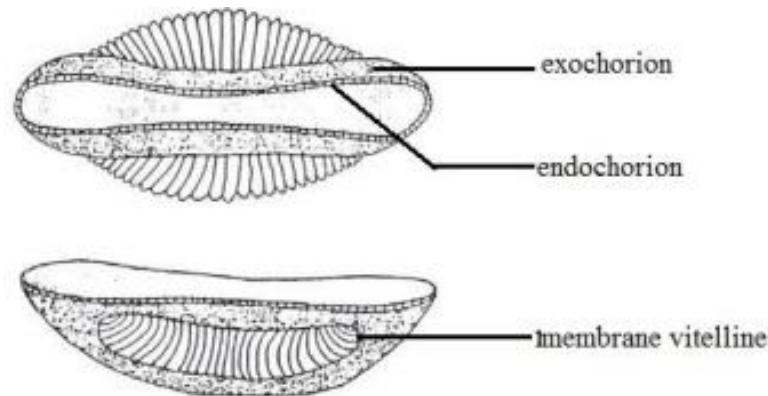


Figure 2: Schéma d'un œuf d'anophèle (Russel *et al.*, 1963).

Les œufs d'anophèles ne résistent généralement pas à la dessiccation et éclosent dans les 48 heures qui suivent l'oviposition, après le développement complet de l'embryon.

I.1.3.2- Larve

L'éclosion de l'œuf libère une larve de stade 1 qui reste en position horizontale à la surface de l'eau, grâce à ses soies palmées dorsales. Celle-ci mesure 1 à 2 mm et subit 3 mues au cours de son développement ; elle passe ainsi par 4 stades larvaires de tailles différentes mais morphologiquement semblables (L1, L2, L3 et L4). Une larve possède 3 parties bien distinctes (figure 3) :

- **la tête** qui porte 2 antennes, 2 gros yeux composés et une paire de brosses buccales. On y note également la présence de nombreuses soies, notamment les soies clypéales utilisées pour l'identification ;
- **le thorax** est formé de 3 segments coalescents (le prothorax, le mésothorax et le métathorax) chacun portant de nombreuses soies. Il est relié à la tête par une membrane au niveau du cou, qui permet ainsi une rotation à 180° de la tête lors de l'alimentation ;
- **l'abdomen** comprend 9 segments bien visibles ; chacun porte différentes ornements, notamment la plaque tergale et les plaques accessoires, les soies, simples ou branchues ou palmées utilisées en taxinomie.

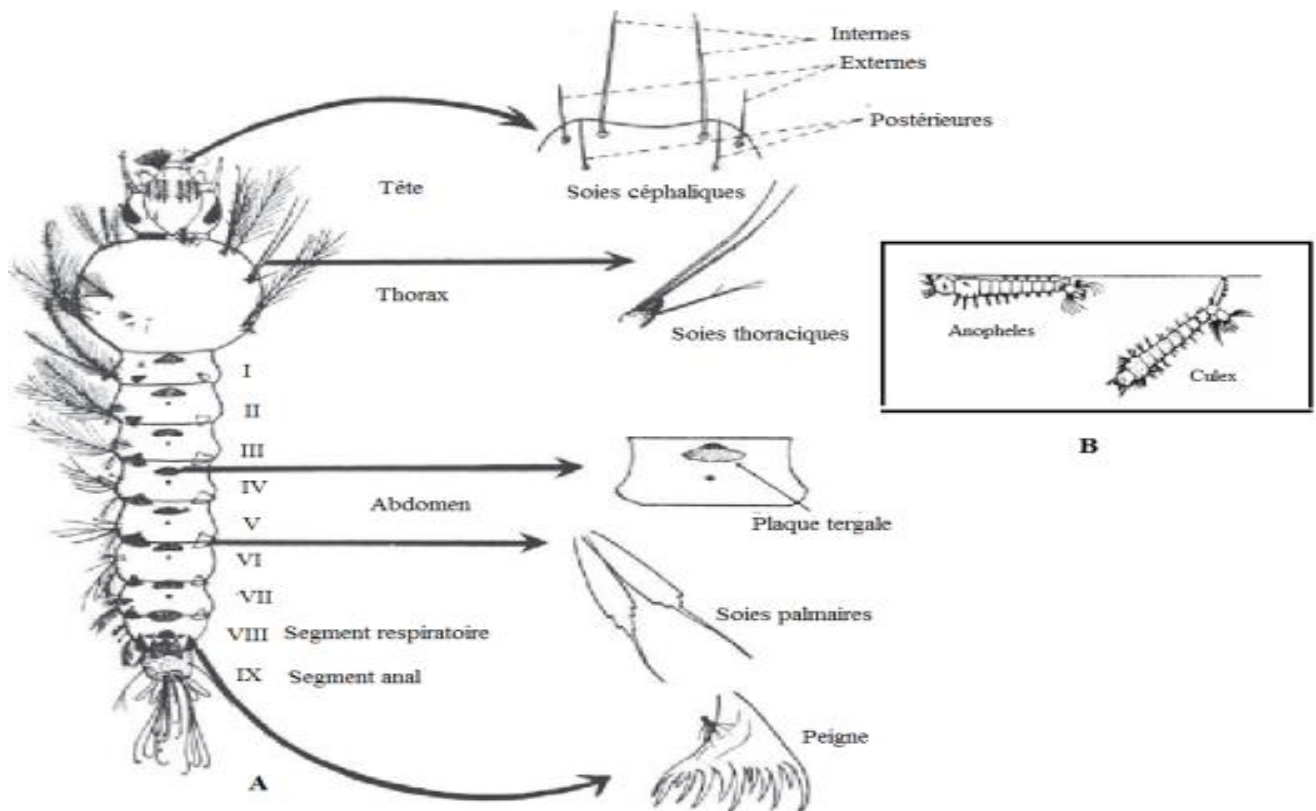


Figure 3: Caractérisation morphologique d'anophèle ; A : Larve d'anophèle, B : Position de la larve d'Anopheles et de Culex à la surface de l'eau (Holstein, 1949).

I.1.3.3- Nymphe

A la fin de la quatrième mue, la larve L4 se transforme en une nymphe en forme de virgule. Cette nymphe ne se nourrit pas ; elle représente le dernier stade de transition au cours duquel l'insecte subit des profondes transformations morphologiques qui permettent son adaptation en milieu aérien. Les deux principales parties d'une nymphe sont (figure 4) :

- **le céphalothorax** volumineux, qui résulte de la coalescence de la tête et du thorax. Il porte des ébauches d'yeux, 2 trompes qui affleurent la surface de l'eau et qui permettent à la nymphe de respirer l'oxygène de l'air ;
- **l'abdomen** qui est formé de 10 segments dont 8 sont bien visibles, terminés par 2 palettes natatoires.

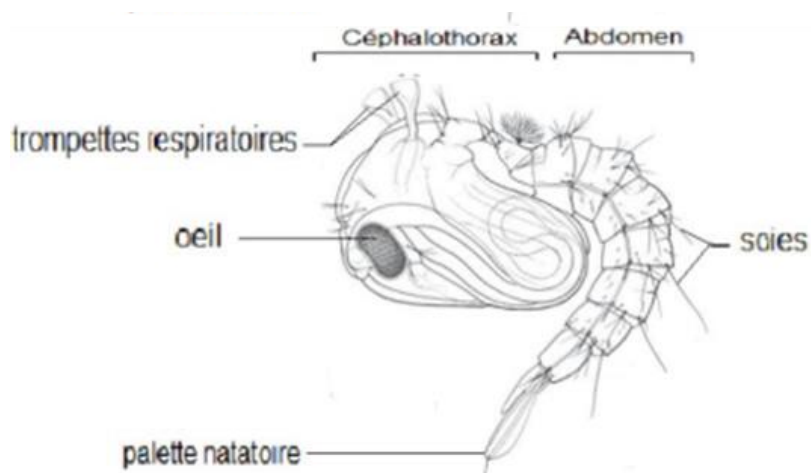


Figure 4: Schéma de la nymphe d'anophèle (Gillies & De Meillon, 1968).

I.1.3.4- Adulte

Le moustique adulte ou imago présente un corps divisé en 3 parties : la tête, le thorax et l'abdomen (figure 5).

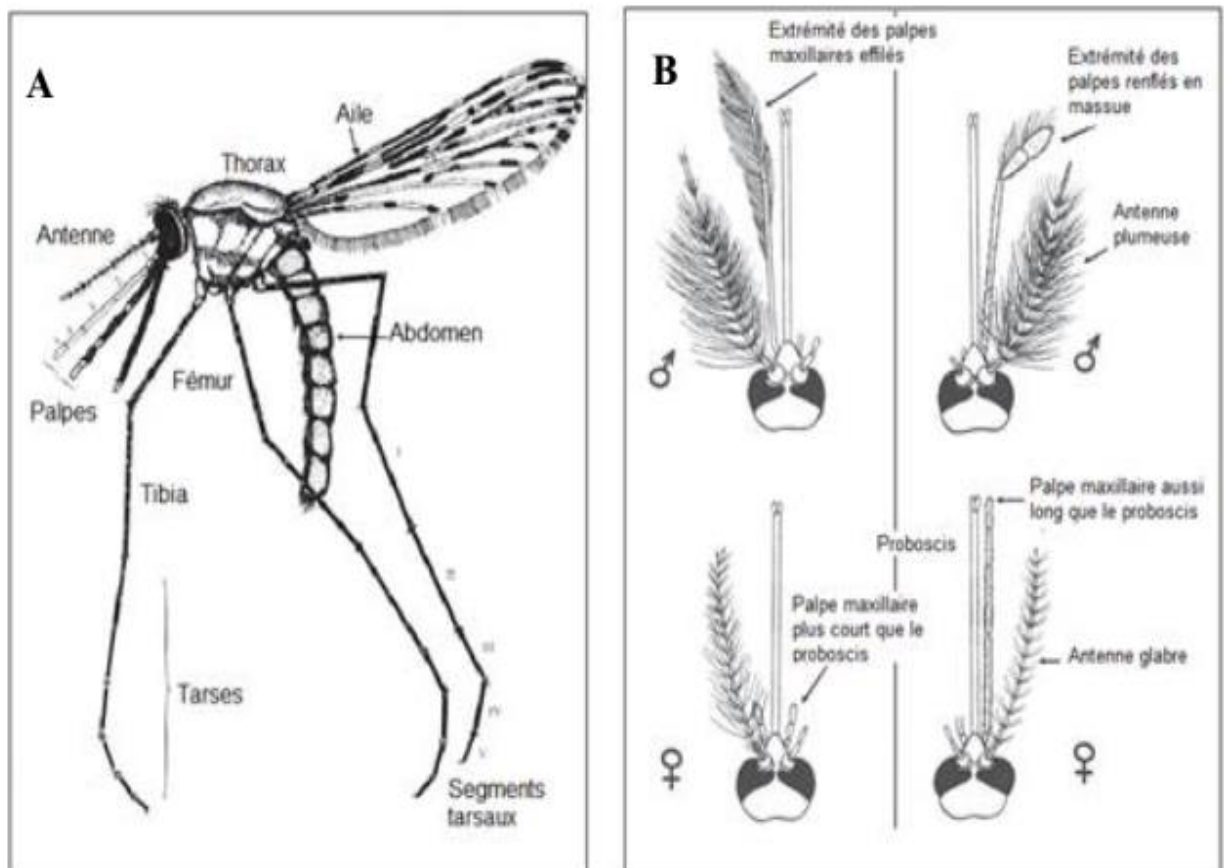


Figure 5: Caractérisation morphologique d'un moustique adulte ; A : adulte femelle d'anophèle ; B: schéma des têtes de mâles et de femelles de Culicinae (à gauche) et d'Anophelinae (à droite) en vue dorsale (Holstein, 1949).

La tête ou tagme sensoriel porte 2 gros yeux composés avec de nombreuses ommatidies, 2 antennes formées de 15 articles différenciant les mâles des femelles, un appareil buccal de type suceur pour le mâle et de type vulnérant pour les femelles, 2 palpes maxillaires formés de 5 articles.

Le thorax ou tagme locomoteur porte de nombreuses plaques chitineuses sur les faces dorsale (tergites), ventrale (sternites) et latérale (pleurites), 2 paires de stigmates latéraux pour la

respiration, 3 paires de pattes longues et fines, 1 paire d'ailes, de nombreuses soies et écailles dont la forme et la disposition sont utilisées pour reconnaître les espèces. Ce thorax est segmenté en 3 parties visibles : le prothorax, le mésothorax et le métathorax de tailles inégales.

L'abdomen ou tagme viscéral comprend 10 segments dont au moins 7 sont bien visibles et sont constitués de 2 plaques chitineuses rigides, des écailles en nombre variable et presque tous les organes du moustique (Carnevale *et al.*, 2009).

I.1.4- Cycle biologique des anophèles

Ce cycle de vie d'un moustique comporte deux phases (figure 6) :

- la phase aérienne est marquée par 2 comportements : la reproduction et la dispersion. Après accouplement (une fois durant toute sa vie), la femelle d'anophèle part en quête d'un hôte vertébré tous les 2 à 3 jours sur lequel elle prendra un repas sanguin qui servira au développement des œufs. Après digestion à l'abri du sang pendant quelques jours, la femelle gravide se met à la recherche d'un gîte adéquat pour la ponte des œufs (qui se déroule généralement au crépuscule) et le développement des larves (Carnevale *et al.*, 2009). Le temps que mettent les œufs pour éclore dépend en grande partie de la température ; à environ 30°C les œufs éclosent en 2 à 3 jours, à 16°C le développement de œufs peut prendre 7 à 14 jours (Jacob *et al.*, 2012) ;
- la phase aquatique concerne les stades pré-imaginaux à savoir œuf, les larves et la nymphe. 24 à 48 heures après la ponte des œufs, leur éclosion survient et on obtient des larves qui se nourrissent de micro-organismes. Ayant un siphon respiratoire très court, ces dernières prennent une position parallèle à la surface de l'eau pour pouvoir respirer. On distingue 4 stades larvaires (L1 à L4) entrecoupés par des mues qui définissent la phase de croissance qui dure 8 à 16 jours. La phase nymphale, elle dure environ 2 jours et fait suite à la phase larvaire marquée par une métamorphose ; elle conduit à l'émergence d'un adulte qui, une fois la cuticule solidifiée, part à la recherche de nutriments, principalement du nectar de fleur. Le passage de l'œuf à l'adulte d'anophèle peut durer de 7 jours à 31°C à 20 jours à 20°C.

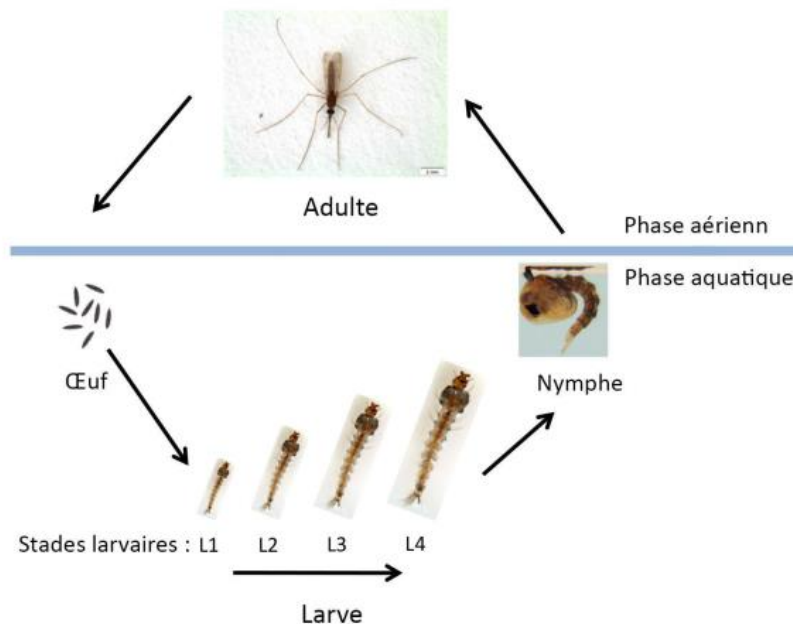


Figure 6: Cycle biologique des anophèles (Jacob *et al.*, 2012).

I.1.5- Bio-écologie des anophèles

Chez les moustiques en général, on distingue une bio-écologie larvaire et une bio-écologie des adultes.

➤ Bio-écologie des larves

La biologie des larves d'anophèles est conditionnée par 3 éléments majeurs : la durée de la vie larvaire qui varie en fonction de l'espèce et de la température ambiante, la présence d'oxygène dans le gîte et le type de gîte larvaire (Carnevale *et al.*, 2009).

Le type d'environnement aquatique auquel le développement larvaire du moustique s'adapte varie d'une espèce à une autre et au sein de la même espèce (Jacob *et al.*, 2012). Les anophèles se développent :

- dans les eaux douces (*An. gambiae* s.s.) ou saumâtres (*An. melas* et *An. merus*) ;
- dans les sites permanents ensoleillés (*An. gambiae* s.s. , *An. coluzzii* et *An. arabiensis*) ;
- dans les eaux stagnantes (*An. gambiae* s.s., *An. funestus*, etc) ou dans de grandes rivières (*An. nili* , *An. darlingi* et *An. moucheti*) ;
- dans les gîtes sans végétation dressée (*An. gambiae* s.s.) ou avec végétation dressée (*An. funestus*, *An. pharoensis*, *An. albimanus* et *An. sudaicus* s.l.) ou encore avec présence d'algues filamenteuses vertes (*An. pseudopunctipennis*) ;
- dans les flaques d'eaux temporaires ensoleillées (gîte typique d'*An. gambiae* s.s.).

Les larves de moustiques ont pour la plupart une alimentation constituée de phytoplancton, de bactérioplancton et de particules organiques en suspension dans l'eau du gîte. La larve s'alimente grâce aux battements de ses soies buccales qui créent un courant suffisant pour aspirer les aliments.

➤ Bio-écologie des adultes

Deux comportements principaux caractérisent les moustiques adultes : l'alimentation et la reproduction. Chez la femelle, on note un comportement de dispersion à la recherche de l'hôte vertébré, du site de repos et du gîte de ponte (Carnevale *et al.*, 2009).

Les individus femelles et mâles se nourrissent de jus sucrés. Les mâles ne piquent pas et n'ont donc pas de rôle vecteur. L'accouplement s'effectue le 2^e ou le 3^e jour avant ou après le repas sanguin dont la prise est nécessaire pour la maturation des ovaires. Les mâles deviennent sexuellement mûres après le 3^e jour de vie imaginale (Charlwood *et al.*, 2002 ; Diabaté *et al.*, 2006).

Les anophèles qui se nourrissent sur l'homme sont dits anthropophiles par opposition aux zoophiles qui se nourrissent sur les animaux. Les repas de sang peuvent être pris à l'intérieur des maisons ou à l'extérieur ; on parle alors respectivement de comportement endophage ou exophage (Adja *et al.*, 2015).

I.2- Distribution géographique des anophèles en Afrique et au Cameroun

En Afrique, les anophèles sont présents dans presque tout le continent (figure 7).

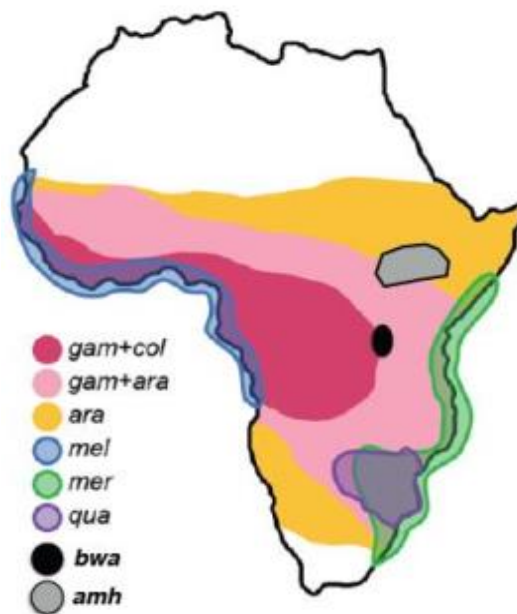


Figure 7: Distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l. en Afrique (Fontaine *et al.*, 2015).

Légende: amh = *An. Amharicus* ; gam = *An. gambiae* s.s; ara = *An. Arabiensis*; mel = *An. Melas* ; bwa = *An. Bwambae*; mer = *An. merus* col = *An. coluzzii* ; qua = *An. quadriannulatus*

Au Cameroun, au sein du complexe *An. gambiae* s.l qui est le plus répandu, la fréquence d'*An. gambiae* s.s baisse progressivement quand on quitte la zone forestière du Sud pour la zone

sahélienne de l'extrême Nord et inversement pour *An. arabiensis*. Dans la région du Littoral, on note une prédominance d'*An. coluzzii* (Wondji *et al.*, 2005).

I.3- Généralités sur les agents pathogènes du paludisme

Les agents pathogènes du paludisme sont *Plasmodium* spp. ; le premier a été découvert en Algérie par LAVERAN en 1880 (Carnevale *et al.*, 2009). C'est un protozoaire de très petite taille (1 à 2µm selon les formes). La coloration au May-Grünwald-Giemsa montre qu'il est formé d'un cytoplasme bleu pâle entourant une vacuole nutritive claire, un noyau rouge et de l'hémozoïne (M'Bouyé, 2010). Plus de 150 espèces de *Plasmodium* ont été décrites à ce jour, elles infectent des mammifères, des oiseaux et des reptiles (Mehlhorn, 2000).

I.3.1- Position systématique du genre *Plasmodium*

Les agents pathogènes du paludisme appartiennent au :

Phylum : Apicomplexa

Classe : Sporozoa

Sous classe : Coccidia

Ordre: Eucoccidiidae

Sous ordre: Haemosporina

Famille: Plasmodiidae

Genre: *Plasmodium* (Laveran, 1880)

I.3.2- Espèces de *Plasmodium* parasites de l'homme

Malgré un grand nombre d'hôtes, en général les agents du paludisme ont tendance à être spécifiques à leur hôte. Cinq espèces : *P. falciparum* (Welch,1897), *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *P. ovale* (Stephens,1922), *P. malariae* (Laveran,1880) et *P. knowlesi* (Knowles & Das Gupta,1931), (Singh *et al.*, 2004) sont reconnues pathogènes pour l'homme. *Plasmodim falciparum* est très largement distribué en Afrique subsaharienne où il est responsable de la grande majorité des cas de paludisme ; *Plasmodium vivax* est très répandu à travers le monde ; *P. ovale* et *P malariae* sont présents en Afrique mais à des faibles proportions (Butcher *et al.*, 1970 ; M'Bouyé, 2010).

I.3.3- Cycle de développement des plasmodies

Ce cycle de développement dixène (figure 8) implique un hôte intermédiaire chez qui se déroule la multiplication asexuée (l'homme) et un hôte définitif (l'anophèle femelle) chez qui se déroule la multiplication sexuée (M'Bouyé, 2010).

➤ Cycle asexué chez l'homme

L'homme est contaminé lors du repas de sang d'un anophèle femelle infesté. De milliers de sporozoïtes sont injectés dans son sang. Ceux-ci sont transportés (par le sang) vers les hépatocytes, où ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » des formes multinucléées qui, après 7 à 15 jours de maturation en fonction de l'espèce éclatent et libèrent de milliers de mérozoïtes dans le sang (10 000 à 30 000 mérozoïtes en fonction des espèces). Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intra-hépatiques restent quiescents (hypnozoïtes) ; ils sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après la piqure du moustique, ce qui explique ainsi les reviviscences tardives relatives à ces deux espèces. Très rapidement les mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges. Cette pénétration du mérozoïte dans l'érythrocyte et sa maturation en trophozoïtes puis en schizontes prend 24, 48 ou 72 heures (en fonction de l'espèce) elle conduit à la destruction du globule rouge hôte et à la libération de 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ces mérozoïtes pénètrent dans de nouveaux globules rouges et débutent un nouveau cycle de réplication. Après un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes subissent une maturation d'une dizaine de jours, accompagnée d'une différenciation sexuée ; ils se transforment en gamétocytes à potentiel mâle ou femelle, qui restent en circulation dans le sang pendant 10 à 15 jours.

➤ Cycle sexuée chez l'anophèle femelle

Les gamétocytes ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté se transforment en gamètes mâles et femelles qui fusionnent pour donner un œuf libre, mobile appelé ookinète. L'ookinète quitte la lumière du tube digestif, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste. Les cellules parasitaires se multiplient à l'intérieur de cet oocyste, produisent des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes, prêtes à être inoculées avec la salive du moustique lors d'un autre repas sanguin sur un hôte vertébré. La durée du développement sporogonique des *Plasmodium* varie en fonction des conditions climatiques : entre 9 et 20 jours pour *P. falciparum* (entre respectivement 30°C et 20°C), un peu plus rapide pour *P. vivax* aux températures équivalentes, et plus long pour *P. malariae*.

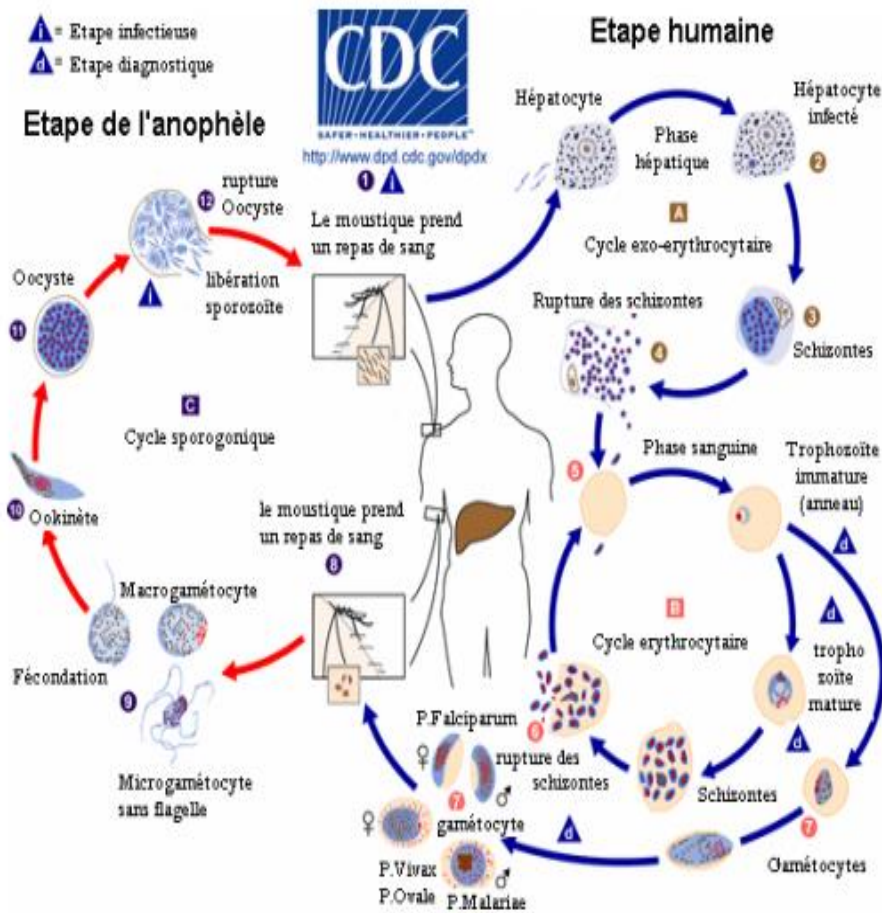


Figure 8: Cycle biologique des plasmodies (OMS, 2009).

I.4- Mesures de lutte anti-vectorielle

En l'absence de vaccin opérationnel contre le paludisme, la lutte anti-vectorielle est l'un des moyens efficaces de prévenir cette maladie (Townson *et al.*, 2005 ; OMS, 2012). Certaines méthodes dans ce domaine visent principalement à réduire la densité des populations de vecteurs par la lutte anti-larvaire et à réduire le contact homme-vecteurs par la lutte contre les adultes (Pages *et al.*, 2006).

I.4.1- Lutte anti-larvaire

Elle vise à détruire tous les différents stades aquatiques des moustiques (œufs, larves et nymphes). D'après WHO, (2013), il existe 3 approches dans la lutte anti-larvaire qui sont :

- la modification et la manipulation environnementale. Il s'agit de la destruction des gîtes temporaires (mares, empreintes de pas) et artificiels (pneus, pots de fleurs), de la mise en œuvre de travaux de drainage et de l'hygiène péri-domestique ;
- le contrôle biologique qui utilise soit des prédateurs comme le poisson larvifère *Gambusia affinis* (Bouallam *et al.*, 1998), soit d'autres insectes (*Toxorhynchites* sp.), soit encore des parasites

nématodes, protozoaires, champignons, ou des bactéries pathogènes entomopathogènes telles que *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* ;

- le contrôle chimique qui repose sur l'utilisation de larvicides chimiques tels que le malathion, le téméphos, le methoxychlore et le méthyl-dursban. Malgré l'existence de plusieurs méthodes, la lutte anti-larvaire est limitée par des difficultés d'ordre opérationnel telles que les préférences écologiques de certaines espèces du complexe *Anopheles gambiae* (Carnevale, 1995). En effet, les espèces de ce complexe peuvent accomplir leur cycle préimaginal dans des biotopes très variés tels que des petites flaques temporaires comme les empreintes de pas, les trous d'emprunt de terre, les vastes zones rizicoles qui sont propices au développement des larves (Coosemans, 1985). Une telle multiplicité des gîtes n'est pas favorable à la lutte anti-larvaire qui, de plus, exige une technicité de la part des acteurs et n'agit que sur la réduction de la densité des vecteurs, mais pas sur leur longévité qui est pourtant un important paramètre épidémiologique (Carnevale, 1995).

I.4.2- Lutte anti-imago

La lutte contre les moustiques adultes passe par trois volets :

- la lutte chimique qui est réalisable à travers l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action ou MILDA, les pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides à effets rémanents ou PID et l'utilisation des répulsifs cutanés. Les insecticides dont on se sert dans la lutte chimique appartiennent à quatre classes : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthriinoïdes (WHOPES, 2011) ; ils ont principalement pour cibles les récepteurs du système nerveux des insectes (Enayati & Hemingway, 2010) ;
- la lutte physique qui consiste (1) à dresser des barrières entre le moustique et l'hôte telles que le port de vêtements longs, l'utilisation de grillages aux ouvertures des habitations ou (2) à éliminer les gîtes à moustiques ;
- la lutte génétique qui implémente la technique de l'insecte stérile (TIS) ou l'introduction, chez le vecteur, des gènes délétères au *Plasmodium* (Catterucia *et al.*, 2003).

Cependant, l'émergence de la résistance des vecteurs aux insecticides (Ranson *et al.*, 2011 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017), le changement de comportements de piqure et de repos des moustiques (Sokhna *et al.*, 2013 ; Bamou *et al.*, 2019), et la faible utilisation des moustiquaires dans les ménages sont autant de facteurs qui entravent la lutte anti-imago et qui concourent à justifier le recours à de mesures additives telles que la lutte anti-larvaire dans le contrôle du paludisme (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2018).

I.5- Généralités sur le larvicide vectoMax G

Le vectoMax G est un larvicide biologique qui combine l'action de *Bacillus thuringiensis israelensis* stéréotype H14 souche AM65-52 et de *Bacillus sphaericus* souche 2362, ABTS 1743. Depuis plusieurs années, les bactéries entomopathogènes *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) et *Bacillus sphaericus* (*Bsph*) sont utilisées dans le cadre de la lutte contre les larves d'anophèles, de culex et aèdes (Federici *et al.*, 2003, Poopathi *et Tyagi*, 2004, Park *et al.*, 2008 et Tabti, 2017). La variété de toxines produites par ces bactéries est telle qu'aucun moustique n'a jamais été retrouvé résistant à ces organismes. *Bacillus thuringiensis* est toxique envers les larves de *Culex* spp, *Anopheles* spp, *Mansonia* spp et *Aedes* spp mais a une rémanence de très courte durée ; quant à *Bacillus sphaericus* il n'est efficace que sur les larves de *Culex* spp et d'*Anopheles* spp mais il peut régénérer dans la nature ce qui lui permet de persister plus longtemps. Le larvicide vectoMax G combine les avantages des deux bactéries pour en faire un outil très performant.

I.5.1- *Bacillus thuringiensis israelensis* sérotype H14 souche AM65-52

I.5.1.1- Caractéristiques générales

Découvert en été 1976 dans une petite mare du désert du fleuve du Néguev (Goldberg et Margalit, 1977), *Bti* a été caractérisé en 1978 (De Barjac, 1978 ; Balam, 2010). C'est un bacille Gram positif, aérobic et sporulé que l'on retrouve dans pratiquement tous les sols, dans l'air, dans l'eau, dans les creux d'arbres et marais salés (Siegel, 2001), et à la surface des feuilles ou des débris des végétaux (Jensen *et al.*, 2003). À l'état végétatif, *Bti* est un bâtonnet de 5 µm de long sur 1µm de large, pourvu de flagelles (Balam, 2010) confère figure 9.

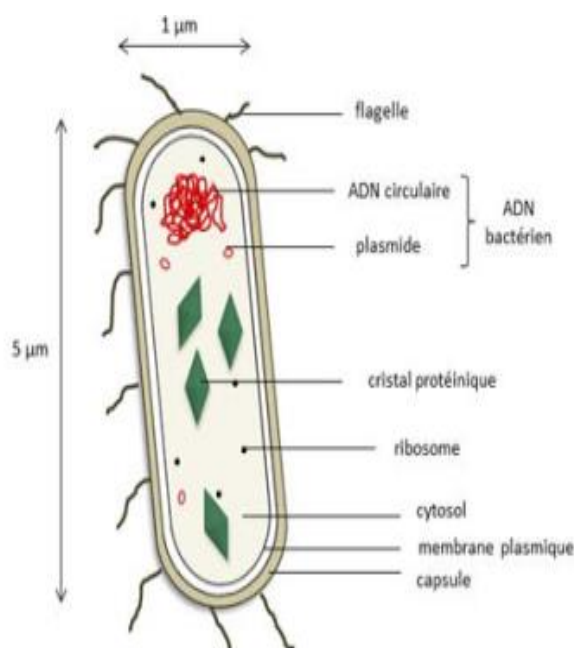


Figure 9: Schéma de *Bacillus thuringiensis israelensis* ([http:// philbio.fr/category/tout-sur-les-bt/quest-ce-quun-bt](http://philbio.fr/category/tout-sur-les-bt/quest-ce-quun-bt)).

Cette bactérie appartient au règne des Bacteria, embranchement des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Bacillacea, famille des Bacillaceae et au genre *Bacillus* (Cohn, 1872) dont les espèces sont des bacilles rectilignes ou presque rectilignes à extrémités carrées ou arrondies (Tabti, 2017). *Bacillus thuringiensis israelensis* fait partie du groupe dénommé *Bacillus cereus* où on retrouve 5 autres espèces à savoir : *B. anthracis*, *B. cereus* s.s, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* *B. weihenstephanensis*, qui présentent tous des caractères phénotypiques proches et sont génétiquement apparentés (Tabti, 2017). Ce bacille diffère des autres de son groupe par sa capacité à synthétiser et à excréter des cristaux mortellement toxiques pour certains insectes (Hofte & Whiteley, 1989 ; Martin, 1994). Cette espèce se subdivise en 82 sous-espèces dont la classification est basée sur les antigènes de leur flagelle H (De Barjac & Frachon, 1990).

I.5.1.2- Cycle vital

Le cycle de vie de *Bti* se caractérise par 2 phases à savoir : la division cellulaire végétative et le développement des spores (Mappe, 2017). Ces deux étapes impliquent des changements à la fois dans la morphologie et dans la biochimie de la cellule (figure 10).

Lorsque les nutriments sont suffisants et les conditions environnementales convenables pour la croissance, la spore germe et produit une cellule végétative. La cellule végétative se divise en 2 cellules filles uniformes par la formation d'un septum de division initié à mi-chemin le long de la membrane plasmique. Durant cette phase de croissance végétative, les cellules de *Bti* utilisent les sucres comme source de carbone et d'énergie pour la synthèse des protéines et autres métabolites.

Les cellules continuent à se multiplier jusqu'à ce qu'un des nutriments (sucres, acides aminés ou phosphate) ou le dioxygène dissous devienne insuffisant pour la croissance végétative (Liu & Tzeng, 2000). Dans ces conditions, la bactérie sporule en produisant une spore et une inclusion cristalline qui seront libérées lors de l'éclatement de la cellule. La sporulation est une manifestation physiologique de la bactérie soumise à des conditions environnantes difficiles.

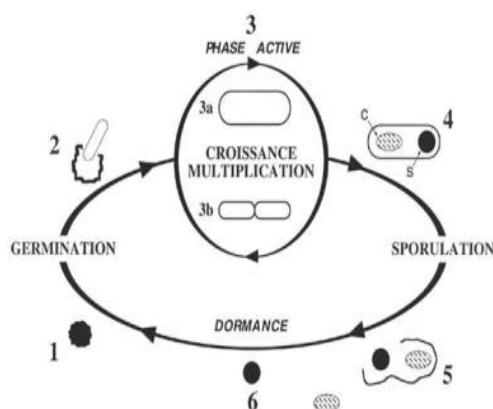


Figure 10: Schématisation du cycle de vie de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Lacoursière & Biosvert, 2004).

Légende : 1) Germination : réhydratation de la spore, 2) Germination : production de la cellule végétative, 3) Croissance et multiplication des cellules végétatives, 4) Sporulation : formation de la spore (s) et de l'inclusion cristalline (c), 5) Lyse : éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et de l'inclusion cristalline, 6) Période de dormance : la spore résiste aux conditions défavorables.

I.5.2 *Bacillus sphaericus* souche 2362, ABTS 1743

I.5.2.1- Caractéristiques générales

Bacillus sphaericus est un bacille Gram-positif, aérobic strict, mésophile, à métabolisme oxydatif, qui forme une spore sphérique et déformante en position terminale (figure 11). La souche 2362 a été isolée pour la première fois en 1981 à partir de mouches noires adultes *Simulium damnosum* au Nigeria (Sinègre *et al.*, 1990). Elle est retrouvée dans les sols, les sédiments marins et dans l'eau douce (Park *et al.*, 2008).

En ce début du 21^e siècle, on compte plus de 300 souches de *Bsph* qui proviennent de différentes sources et dont 17 présentent des toxicités différentes (Su, 2008). Parmi celles-ci, trois ont fait l'objet de recherches intensives car elles présentaient des toxicités plus élevées pour certaines espèces de larves de moustiques (Zahiri *et al.*, 2004 ; Su, 2008). Le cycle de vie de *Bsph* est le même que celui de *Bti*.

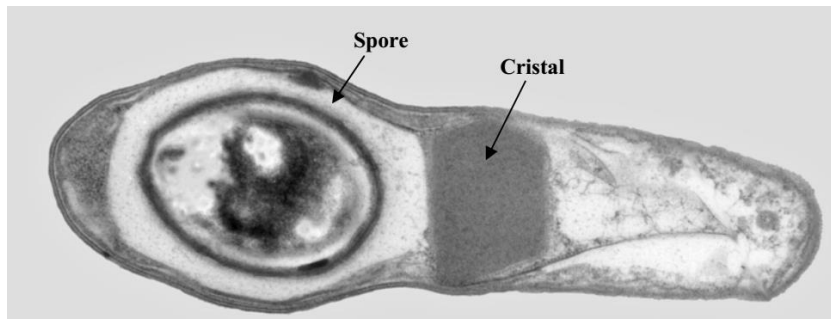


Figure 11: Schéma de *Bacillus sphaericus* en cours de sporulation, montrant la spore (forme de résistance) et le cristal protéique contenant les toxines actives sur les larves de moustiques (Lacoursière & Boisvert 2004).

I.5.3.-Mode d'action du vectoMax G

Après ingestion d'un rapport spécifique de protoxine de *Bti* et de *Bsph* contenue dans une microparticule, par une larve de moustique, ces protoxines sont activées sous l'action du milieu alcalin de l'intestin moyen de l'anophèle. Grâce aux enzymes protéolytiques larvaires, les protoxines seront décomposées en fractions actives de polypeptides qui vont se fixer sur les cellules de l'intestin moyen de la larve d'anophèle, entraînant ainsi la lyse de ces cellules intestinales et la mort (figure 12).

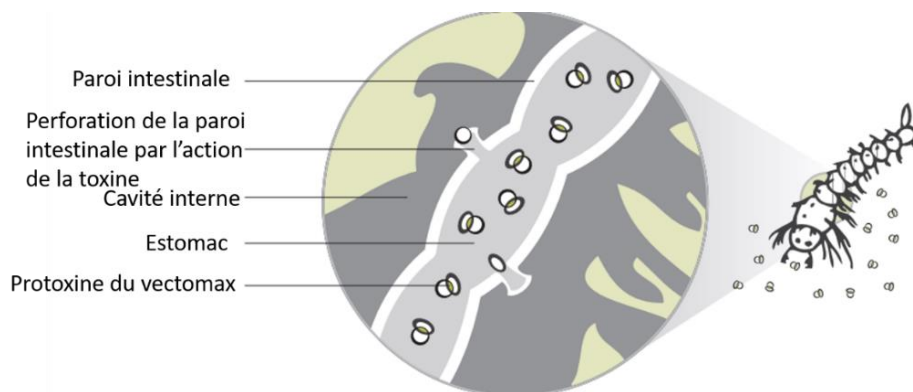


Figure 12: Mode d'action de *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* (Technical use bulletin, 2018).

I.5.4-Paramètres influençant l'efficacité des bacilles

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité du *Bti* et du *Bsph* sur le terrain ce sont :

- **les espèces d'anophèles.** Celles-ci montrent différents niveaux de susceptibilité vis-à-vis des cristaux des bacilles. Ces différences de susceptibilité observables aussi à l'intérieur d'un même genre de moustiques seraient dues aux variations comportementales et physiologiques. La

façon dont les différentes espèces de moustiques s'alimentent serait l'une des causes principales des variations de susceptibilité observées ;

- **les stades larvaires.** En général chez la plupart des espèces de moustiques étudiées, les larves les plus jeunes (L1, L2, L3) sont les plus susceptibles aux bactéries. Celles de stade IV ne se nourrissent que très peu, car elles commencent la nymphose; les nymphes sont totalement insensibles aux cristaux bacillaires puisqu'elles ne s'alimentent pas (Mulla *et al.*, 1990, Nayar *et al.*, 1999) ;

- **la température ambiante.** Habituellement, une même quantité de cristaux induit un taux de mortalité inférieur en eau froide qu'en eau chaude (Becker *et al.*, 1993 ; Nayar *et al.*, 1999). Cette baisse de toxicité est imputable à une réduction de l'activité métabolique observée lorsque l'insecte est exposé à des températures s'approchant de la température minimale à laquelle on le retrouve normalement dans la nature ;

- **le couvert végétal.** La présence de végétation en périphérie et au-dessus d'une mare d'eau peut intercepter les formulations liquides pulvérisées, les poudres ou les granules lors de leur application, ce qui réduit la disponibilité en cristaux bacillaires ;

- **la présence de courants.** Dans une mare d'eau, la présence d'un apport d'eau substantiel diminue la disponibilité des cristaux et induit une dilution (réduction du nombre de cristaux par volume d'eau) qui déplace la masse d'insecticide hors de la zone traitée.

II.1. Site d'étude

Notre étude s'est déroulée dans la ville de Yaoundé, capitale politique du Cameroun, chef-lieu de la région du Centre et du département du Mfoundi. Yaoundé comporte 7 arrondissements et est située à 3°52'12 de latitude Nord, 11°31'12 de longitude Est (Yogo, 2005).

Le climat de Yaoundé est de type équatorial. Il se caractérise par des pluies abondantes (jusqu'à 1600 mm/an), une température moyenne annuelle de 23°C et l'existence de 4 saisons inégalement réparties et alternant comme suit : une grande saison sèche (GSS) qui va de mi-novembre à mi-mars, une petite saison des pluies (PSP) qui s'étend de mi-mars à fin juin, une petite saison sèche (PSS) qui va de juillet à août et une grande saison pluvieuse (GSP) s'étendant de septembre à mi-novembre (Suchel, 1988).

La population de la ville de Yaoundé est estimée à environ 3 millions d'habitants ; elle a subi une croissance démographique importante ces dernières années (BUCREP, 2015). Cette forte croissance démographique s'est accompagnée d'une occupation anarchique de l'environnement, notamment celles des versants fragiles des collines (risques d'éboulement) et l'occupation des bas-fonds marécageux exposés aux risques d'inondations (Djamouko *et al.*, 2019). L'urbanisation rapide et anarchique dans ces bas-fonds, le mauvais drainage des eaux usées, et la pratique de l'agriculture ont contribué à la création de nombreux gîtes larvaires de moustiques (Djamouko *et al.*, 2019). A cet effet, 14 quartiers (figure 13) ont été choisis de façon aléatoire dont 7 quartiers où se sont effectués les traitements et 7 quartiers contrôlé pour évaluer l'efficacité des traitements larvicides. Les caractéristiques telles que la densité des moustiques, le taux d'infestation des moustiques, le taux d'inoculation entomologique, l'indice sporozoïque, le taux d'agressivité, la présence d'un cours d'eau, l'étendue du site situé au bas fond, la présence des champs ont orienté le choix de ces 14 sites d'étude (Doumbe *et al.*, 2018).

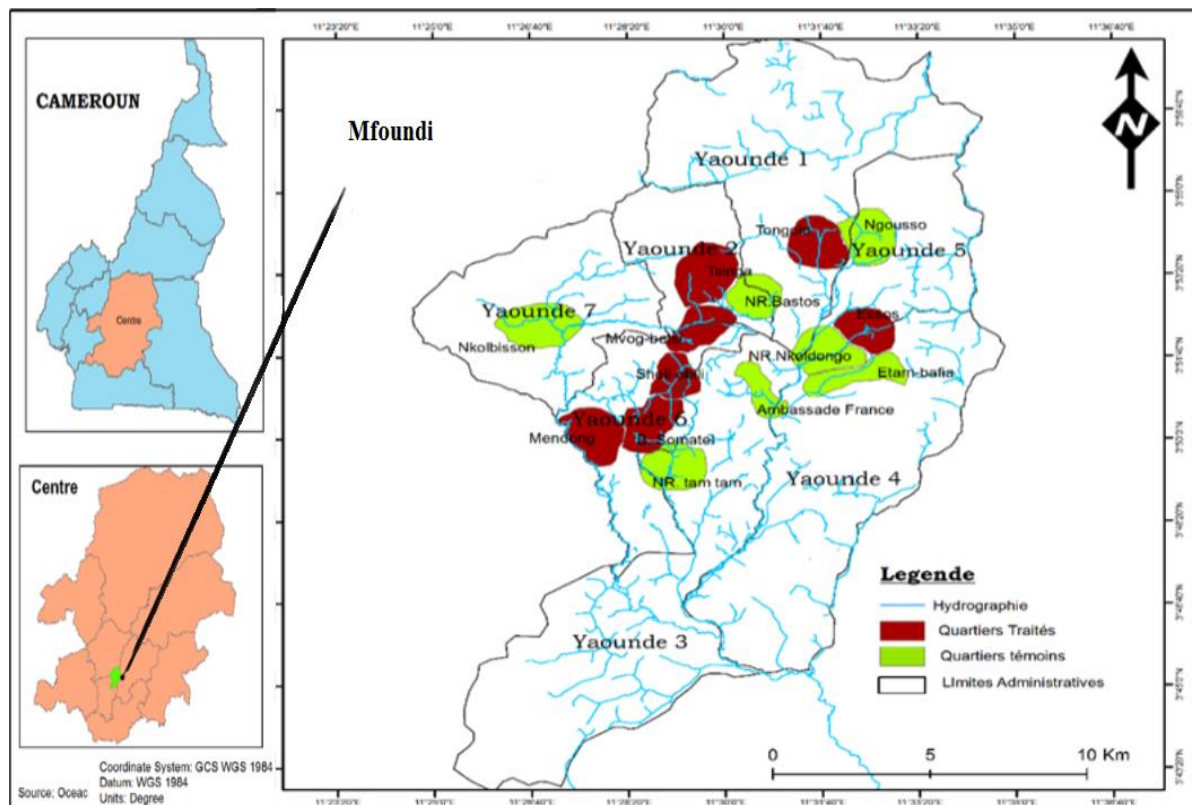


Figure 13: Localisation des sites traités et des sites témoins dans la ville de Yaoundé (OCEAC).

II.2- Matériel

II.2.1- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude était constitué des larves de moustiques et du larvicide biologique vectoMax G.

II.2.2- Autres matériel

Les autres matériels sont de 3 principaux groupes :

- **le petit matériel** constitué principalement de la verrerie. On peut citer la louche et les assiettes en aluminium (pour bien visualiser les larves) servant à la collecte des larves, les pipettes Pasteur servant à prélever les larves, les embouts et micropipettes servant à mesurer les quantités de réactifs à utiliser, et les tubes Eppendorf de 1,5 ml qui ont permis la conservation des larves de moustiques. Un GPS de marque Garmin Map 64s a permis le relevé des coordonnées géographiques des gîtes ;

- **les réactifs**: il s'agit des produits utilisés lors des études au laboratoire ; on cite : l'éthanol 100% qui a permis la conservation des larves en bon état ; la solution tampon de Livak, les amorces oligonucléotidiques et l'eau distillée.

L'appareillage qui a permis de réaliser cette étude était constitué :

- d'une centrifugeuse réfrigérée de marque Labnet model Prism R pour l'extraction de l'ADN ;
- d'un thermocycleur de marque BIOER Genetouch (Applied Biosystems) dans lequel la réaction de PCR a été effectuée ;
- d'une cuve à électrophorèse de marque Appleton Woods pour la migration électrophorétique ;
- d'un micro-onde pour la préparation du gel d'agarose ;
- d'un spectrophotomètre de marque Enduro® TM muni d'un révélateur à UV pour visualiser les bandes après la migration électrophorétique.

II.3- Méthodes

II.3.1- Prospection des gîtes larvaires

De septembre 2018 à novembre 2019, les gîtes larvaires ont été prospectés dans les différents quartiers de la ville de Yaoundé en recherchant tous les points d'eaux stagnantes pouvant abriter les larves de moustiques. Pendant cet exercice, les larves ont été recherchées à l'aide d'une louche en aluminium et/ou d'une assiette selon la méthode de « *dipping* » (Service, 1993). Le protocole d'échantillonnage larvaire a consisté à réaliser 5 louchées dans les gîtes de petite taille (3m²) par le *dipping*, ou 10 louchées pour les gîtes de grande taille (10m²). Les clés de Gillies & De Meillon (1968) ont servi de base pour identifier les larves d'Anophelinae (qui au repos restent parallèles à la surface de l'eau) des autres Culicidae collectés. Les gîtes ont été géo-localisés à l'aide d'un GPS de marque Gamin Map 64s et les caractéristiques du gîte (telles que la taille, la présence ou l'absence des larves de moustiques et la densité des différents stades larvaires dans les gîtes positifs) ont été enregistrées. La prospection a été faite toutes les deux semaines dans les quartiers traités et une fois par mois dans les quartiers non traités par le vectoMax G.

II.3.2- Traitement des gîtes larvaires

Tous les gîtes identifiés (positifs et négatifs) ont été traités par épandage uniforme du vectoMax G à la surface de l'eau. La quantité de larvicide a été fonction de la surface du gîte, du mélange des genres (*Culex*, *Aedes* et *Anopheles*), du type de gîte larvaire (pollué ou non) et de la période de traitement. Pour une surface d'eau mesurant environ 1m², d 500 à 1500mg de vectoMax G ont été nécessaire pour le traitement du gîte.

II.3.3- Evaluation des gîtes larvaires

Les gîtes larvaires ont été prospectés de nouveau 48 heures après traitement afin de déterminer l'efficacité du larvicide. Cette évaluation a été faite deux fois par mois pour les sites

traités et une fois par mois pour ceux non traités. Pendant cet exercice, les caractéristiques des gîtes (taille, présence des larves de moustiques (anophèles/culex), densité larvaire et stades de développement des larves d'anophèles) ont encore été enregistrées.

II.3.4- Collecte et conservation des larves

Les larves d'anophèles ont été collectées à l'aide d'une pipette, dans 5 gîtes positifs choisis de façon aléatoire dans chacun des 14 quartiers (figure 14) et introduites dans des bouteilles en plastique étiquetées en fonction des quartiers. Elles ont été acheminées au laboratoire l'Institut de Recherche de Yaoundé situé à OCEAC. Une fois au laboratoire, ces échantillons ont été introduits dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant de l'éthanol à 100% puis placés dans un réfrigérateur à -20°C pour des analyses ultérieures de biologie moléculaire.



Figure 14: Collecte des larves par la méthode de « dipping » (Service, 1993).

II.3.5- Analyses de laboratoire

II.3.5.1- Extraction de l'ADN sur les larves de moustique

En moyenne 15 larves d'anophèles (préférentiellement celles de stades 2,3 et 4) par quartier ont servi pour des identifications moléculaires. L'extraction de l'ADN a été faite selon le protocole Livak (Livak, 1984).

Le tampon de broyage, appelé solution de Livak, a préalablement été préparé avec 1,6 ml de NaCl 5 M, 5,48 g de Sucrose, 1,57 g de Tris, 10,16 ml d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 0,5 M et 2,5 ml de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS 20%) ; l'ensemble a été ramené à un volume de 100 ml avec de l'eau distillée (dH₂O) puis filtré, stérilisé et conservé dans des aliquotes à -20°C.

La procédure d'extraction a consisté à broyer un échantillon de larve à l'intérieur d'un tube Eppendorf de 1,5 ml à l'aide d'un broyeur électrique, dans 100 µL de tampon Livak préchauffé à 65°C ; ensuite le broyat a été incubé à 65°C dans un bain marie pendant 30 min afin de dénaturer les nucléases. Une fois le temps d'incubation expiré, une micro-centrifugation a été effectuée (environ 15 secondes) ; 14 µL d'acétate de potassium 8 M ont été ajoutés pour purifier le broyat et le tout a été mélangé à l'aide d'un vortex. Ce mélange a par la suite été porté à une seconde incubation sur glace pendant 30 min. Après quoi, les tubes ont été placés dans une centrifugeuse à 13500 tours/min pendant 20, min à 4°C, afin de précipiter les débris cellulaires et les protéines dénaturées. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf stérile antérieurement étiqueté ; 200 µL d'éthanol à 100% y ont été rajoutés afin de précipiter l'ADN. Une deuxième centrifugation a été effectuée à 13500 tours/min, à 4°C, mais pendant 15 min ; le rinçage s'en est suivi en utilisant 100 µL d'éthanol 70% glacé afin de débarrasser délicatement le culot de toute impureté. Par la suite, ces tubes ont été séchés sur la paillasse pendant environ 1h, le culot séché à l'air ambiant a été suspendu dans 100 µL d'eau distillée. Une étape d'incubation à 65°C pendant 10 min dans un bain-marie suivie d'un mélange au vortex mixeur a clôturé le processus d'extraction. Les extraits d'ADN ont été conservés dans un congélateur à -20°C jusqu'à leur utilisation.

II.3.5.2- Identification moléculaire des espèces du complexe *An. gambiae* s.l.

Le protocole utilisé pour l'identification des espèces du complexe *An. gambiae* s.l. est la Short INterspersed Elements Polymerase Chain Reaction (SINE-PCR) (Santolamazza *et al.*, 2008) ; il repose sur 2 phases essentielles à savoir l'amplification de l'ADN ribosomal et la migration électrophorétique.

➤ Amplification de l'ADN ribosomal

La réaction de polymérisation en chaîne est basée sur l'amplification spécifique d'une région d'ADN qui code pour la synthèse des ARN ribosomaux dont on connaît la séquence nucléotidique. Le milieu réactionnel ou mix (tableau 1) est constitué par l'ADN à amplifier, les amorces oligonucléotidiques spécifiques (S200 X6F et S200 X6R), les dinucléotides triphosphates (dNTPs) et le magnésium (MgCl₂) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase thermorésistante (Taq ADN polymérase).

Tableau I : Préparation du milieu réactionnel (mix)

Réactifs	Concentration finale	Volume pour une réaction à 15µL
Tampon de Taq 10X	1X	1,5 µL
TaqADN polymérase (5U/µL)	0,04 UI/µL	0,12 µL
DNTPs (25 Mm)	0,2 Mm	0,12 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,25 mM	0,75 µL
ddH ₂ O	-	10,49 µL
S200 X6F (10 mM)	0,34 mM	0,51 µL
S200 X6R (10 Mm)	0,34 mM	0,51 µL
ADN	-	1 µL
Total	-	15 µL

Dans un thermocycleur, un programme de cycles de températures a été établi ; la solution (mix) a été soumise à la PCR proprement dite qui se déroule en 3 phases (figure 15). Une phase de dénaturation à haute température (95°C), au cours de laquelle les deux brins de l'ADN se séparent ; une phase d'hybridation, en descendant la température à 54°C, au cours de laquelle les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN ; enfin, une phase d'élongation à 72°C qui correspond à la synthèse des brins d'ADN complémentaires par la Taq ADN polymérase qui ajoute des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Ainsi, après une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 95°C, 30 secondes à 54°C, 1 minute à 72°C) suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

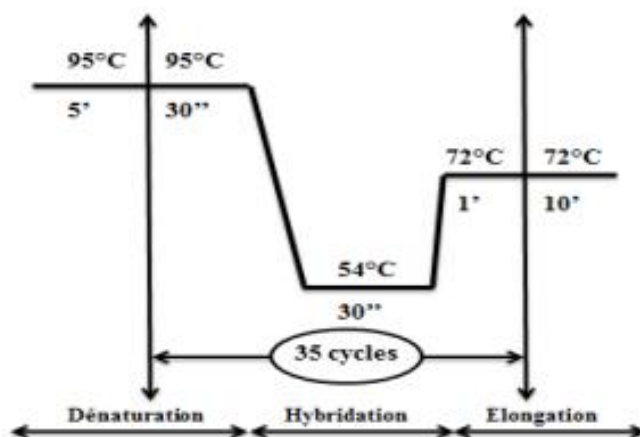


Figure 15: Programme d'amplification de la PCR SINE pour identification des espèces du complexe *An. gambiae* s.l (Santolamazza *et al.*, 2008).

➤ **Migration électrophorétique**

- **Préparation du gel d'agarose**

L'électrophorèse a été réalisée sur un gel d'agarose à 1,5% à cet effet, 1,5g d'agarose a été pesé et introduit dans un erlenmeyer en verre. Ensuite 100 ml de tampon Trisacétate-EDTA 1X (TAE) ont été mesurés à l'aide d'une éprouvette graduée ; le mélange (Agarose + TAE 1X) a été porté à ébullition dans un appareil à micro-onde chauffant à 250°C pendant 2 à 3 minutes jusqu'à obtention d'une solution translucide. Dans la préparation, progressivement refroidie par trempage dans un bac d'eau froide, 1 µL de Midori Green (pour la visibilité aux UVs) a été ajouté suivi d'une légère agitation. Le gel a alors été coulé dans un bac à électrophorèse sur lequel des peignes ont été préalablement installés. Après refroidissement à température ambiante pendant 30 min, les peignes ont été retirés pour obtenir les puits où seront logés les échantillons d'ADN amplifié. Le gel ainsi préparé a été immergé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon de migration, le TAE 1X.

- **Distribution des échantillons et migration électrophorétique**

Cette étape a consisté à distribuer dans chacun des puits 3 µL du produit PCR mélangé au bleu de charge (bleu de bromophénol 0,25% +bleu de xylène cyanol 0,25% + sucrose 4% +eau distillée) préalablement déposé sur un morceau de parafilm en plusieurs répliques de 1 µL. Le bleu de charge a pour rôle d'entraîner l'ADN au fond du puits mais également de contrôler le front de migration. Sur chaque gel, 3 µL du marqueur de poids moléculaire (Hyperladder 100 pb) a été déposé dans le premier et/ou dernier puits de chaque rangée, ainsi que les témoins négatifs (14 µL de mix et 1 µL de sigma water sans ADN) et positif d'amplification. Par la suite, la cuve a été refermée et reliée à un générateur de courant continu (stabilisé à 120 V-150 V) pour une migration à 45 minutes.

- **Interprétation des génotypes sur la base des fronts de migration**

Après la migration électrophorétique, ce gel a été placé dans un spectrophotomètre muni d'un révélateur à ultra-violets pour la visualisation des bandes matérialisant le front de migration de l'ADN amplifié ; une photographie a été réalisée et interprétée.

II.3.6- Analyse statistique des données

Les données obtenues à l'issue de ce travail ont été saisies dans le logiciel Excel 2016. Ceci a permis l'élaboration de la base de données et la construction de graphes. L'importation de certaines données d'Excel vers le logiciel R version 3.5.2 a également permis la construction d'autres graphes.

Le logiciel Medcalc version 19.2.1 nous a permis de faire le test χ^2 pour la comparaison des proportions des gîtes positifs à anophèles pendant les phases de traitements avec ceux des phases d'évaluations ; des gîtes positifs à anophèles dans les sites traités après traitement avec

ceux des sites témoins ; des gîtes positifs en saison des pluies avec ceux de la saison sèche dans les sites traités et témoins ; des espèces *An. coluzzii* et *An. Gambiae* s.s. dans les sites traités et témoins et les différences ont été considérées significatives pour les valeurs de $P < 0,05$.

Le logiciel ArcGIS a permis l'élaboration de la carte de localisation des sites traités et des sites témoins dans la ville de Yaoundé.

Le taux de réduction qui montre l'efficacité du traitement dans les quartiers traités a été calculé grâce à la formule :

$$\%R = \frac{\% \text{ gîtes positifs pendant traitements} - \% \text{ gîtes pendant évaluations}}{\% \text{ gîtes pendant traitements}}$$

Le taux de réduction dans les sites traités et témoins avant et pendant l'intervention a été calculé par la formule de Mulla *et al.*, (1971) :

$$\%R = 100 - \frac{C_1 \times T_2}{C_2 \times T_1} \times 100$$

où

C1 : le nombre de gîtes positifs dans les quartiers témoins avant le traitement,

C2 : le nombre de gîtes positifs dans les quartiers témoins pendant le traitement,

T1 : le nombre de gîtes positifs dans les quartiers traités avant le traitement et

T2 : le nombre de gîtes positifs dans les quartiers traités pendant le traitement.

III.1- Résultats

III.1.1- Caractérisation physique, biologique et environnementale des gîtes larvaires d'anophèles

Au cours des prospections, un minimum de 5 gîtes larvaires par quartier retrouvés avec les larves d'anophèles a été décrits. Les caractéristiques des gîtes telles que la taille, la présence de végétation à la surface d'eau, d'algues ou de prédateurs étaient relevées. Au total 70 gîtes ont été caractérisés sur cette base (tableau 2). Les larves d'Anophelinae ont colonisé une large gamme de gîtes dont les mares (67,14%), les empreintes de pas (10%), les rigoles (5,71%), les sillons (11,43%) ainsi que les puits (4,29%) et les réservoirs artificiels (1,43%).

Tableau II: Caractéristiques générales de gîtes larvaires retrouvés avec les larves d'anophèles dans les quartiers traités et témoins.

Paramètres	Variables	Caractéristiques	Sites traités		Sites témoins	
			N1	Gîtes positifs (%)	N2	Gîtes positifs (%)
Physiques	Types de gîtes	Temporaire	32	91,43	31	88,57
		Permanent	3	8,57	4	11,43
	Surface	< 1m ²	28	80	8	22,86
		1-10m ²	7	20	27	77,14
Biologiques	Densité larvaire	Faible (<50 larves)	15	42,86	6	17,14
		Forte (≥50 larves)	20	57,14	29	82,86
	Poissons larvivores	Présents	0	0	0	0
		Absents	35	100	35	100
	Algues	Présents	25	71,43	12	34,29
		Absents	10	28,57	23	65,71
	Surface d'eau couverte par la végétation	< 50%	27	77,14	29	82,86
		> 50%	8	22,86	6	17,14
Environnementales	Distance au domicile le plus proche	<10m	31	88,57	27	77,14
		10-100m	4	11,43	8	22,86

Dans les sites traités, ceux à anophèles ont été pour la plupart temporaires (91,43%), caractérisés par de petites tailles (80%) et dépourvus de prédateurs c'est-à-dire poissons larvivores (100%). De même une forte présence d'algues (71,43%) et une faible couverture de la surface d'eau par la végétation (77,14%) ont été notées. Les gîtes à anophèles avaient pour la plupart (57,14%) une forte densité larvaire (≥50 larves).

Concernant les quartiers témoins, les gîtes ayant servi de collecte ont été en tout temporaires (88,57%) et la majorité (77,14%) avait une surface qui variait de 1-10m². 82,86% de la surface d'eau était faiblement recouverte de végétations (82,86%). Une absence de poissons larvivores (100%) et d'algues (65,71%) ont été observés. Les gîtes avaient une forte densité larvaire (≥ 50 larves).

III.1.2- Distribution des gîtes larvaires d'anophèles dans les quartiers traités et témoins

Après 13 mois de prospections et de traitements des gîtes larvaires dans 14 quartiers de la ville de Yaoundé, 89618 gîtes larvaires de moustiques ont été retrouvés. Dans les quartiers traités, la fréquence des gîtes avec les larves d'anophelins a varié en fonction de la phase de traitement ou d'évaluation. Avant la phase des traitements, la proportion de gîtes positifs à anophèles était de 1,6% ; à la phase d'évaluation cet proportion est passée à 0,35%. Dans les quartiers témoins, sur les 10857 gîtes prospectés, 1132 gîtes (10,43%) avaient des larves d'anophèles (tableau III). La faune culicidienne récoltée était essentiellement constituée de larves d'*Anopheles gambiae* s.l.

Tableau III: Distribution des gîtes larvaires en fonction du statut traité et témoin des sites.

	Gîtes			
	Prospectés		Positifs à anophèles	
	Avant	Après	Avant	Après
Quartiers traités	50213	28548	804 (1,60%)	102 (0,35%)
Quartiers témoins	10857		1132 (10,43%)	
Total	89618		2038 (2,27%)	

III.1.3- Efficacité des traitements larvicides sur les gîtes d'anophèles

L'évaluation de l'efficacité des traitements a consisté à vérifier si les traitements réduisaient effectivement la présence de larves dans les mares d'eau. Ceci s'est fait en comparant les proportions de gîtes retrouvés avec les larves d'anophèles avant la phase des traitements à ceux trouvés avec les larves 48 heures lors de l'évaluation.

III.1.3.1- Variation mensuelle de l'efficacité des traitements

L'analyse de l'efficacité des traitements a montré une nette variation en fonction des mois. Au cours des mois de mars, juin, juillet, octobre et novembre 2019 une forte réduction du pourcentage des gîtes positifs a été observée après traitement ($\chi^2 = 250,825$; $P = 0,0001$) tandis qu'en novembre 2018, février, août et septembre 2019 une réduction moins importante a été notée.

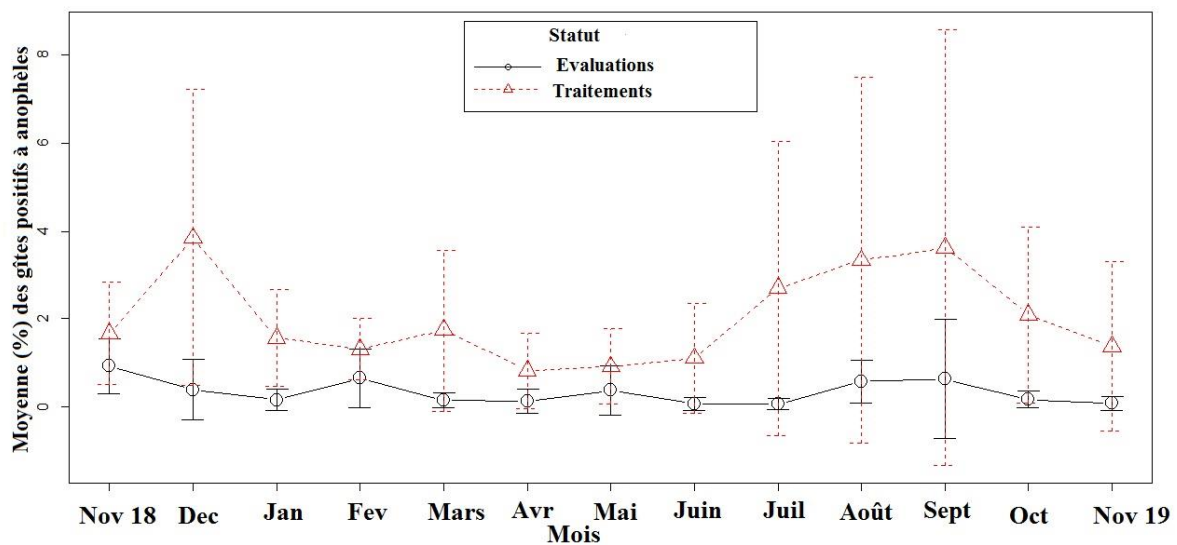


Figure 16: Variation des pourcentages moyens des gîtes positifs à anophèles avant et après le traitement en fonction des mois.

III.1.3.2 - Efficacité des traitements larvicides en fonction des quartiers traités

La figure 17 présente l'efficacité des traitements en fonction des quartiers. Elle permet de vérifier si certains quartiers ont été plus accessibles que d'autres et identifier au besoin les facteurs qui peuvent justifier cet état de chose. De ces analyses, il ressort une forte réduction des gîtes à anophèles dans tous les quartiers ($\chi^2 = 250,825$; $P = 0,0001$). Les gîtes positifs ont diminué de 804 (1,60%) à 102 (0,5%) montrant ainsi un taux de réduction de 78,13%. Toutefois, la réduction des gîtes à anophèles était moins importante dans les quartiers Tsinga, Essos et Mendong comparés aux autres quartiers ce qui suppose des difficultés à traiter tous les gîtes larvaires à moustiques par les équipes de traiteurs travaillant dans ces quartiers.

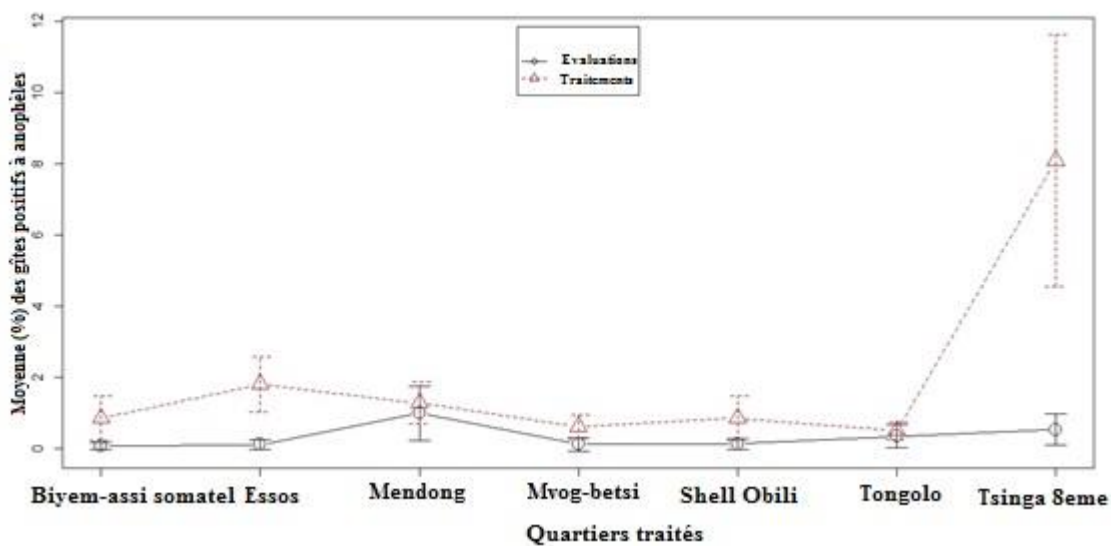


Figure 17: Variation des pourcentages moyens des gîtes positifs à anophèles avant et après le traitement en fonction des quartiers traités.

III.1.4 – Evaluation de l’impact des traitements sur la dynamique de colonisation des gîtes larvaires avant et après les traitements dans les quartiers traités et témoins

Avant la mise en œuvre de la lutte anti-larvaire, il a été constaté que les gîtes avec les larves d’anophèles avaient une distribution comparable dans les quartiers traités et témoins (figure 18).

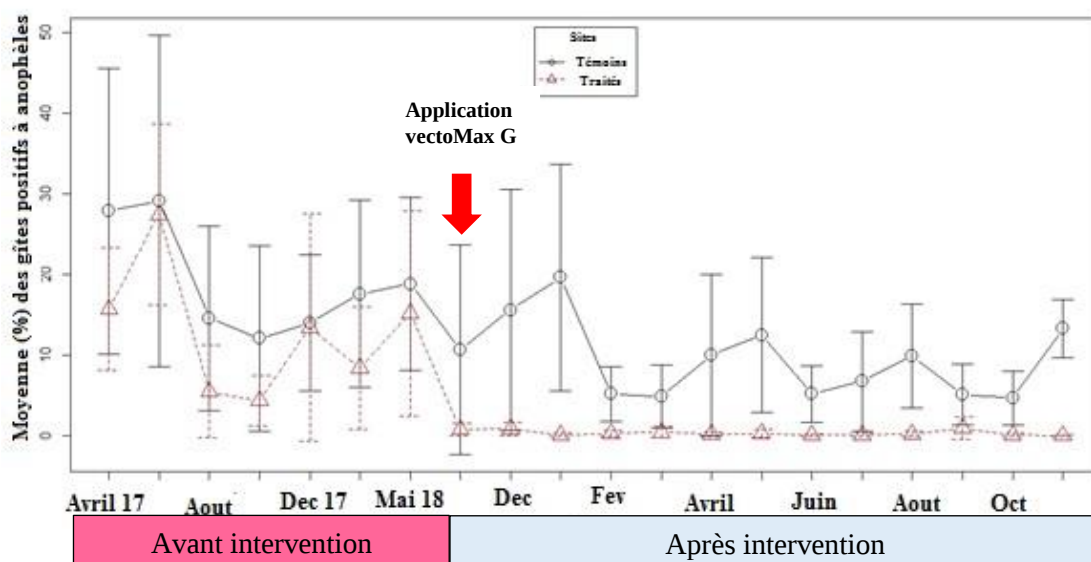


Figure 18: Variation des pourcentages moyens des gîtes positifs à anophèles avant et après l’intervention du biolarvicide.

Le tableau IV nous montre que la mise en œuvre des traitements a conduit à une réduction significative (82,65%) de la fréquence des gîtes larvaires positifs à anophèles dans les quartiers traités comparés aux quartiers non traités, avec une réduction de la proportion des gîtes positifs à moins de 1% dans les quartiers traités ($\chi^2 = 303,923$; $P = 0,0001$). Dans les quartiers témoins, la fréquence des gîtes à anophèles a varié de 10 à 30% avant les traitements et de 5 à 20% pendant la période des traitements.

Tableau IV: Comparaison de la fréquence des gîtes dans les sites traités et témoins avant et pendant l'intervention.

Sites	Avant intervention			Après intervention			Taux de réduction (%)
	Nombre total de gîtes prospectés	Nombre total de gîtes positifs à anophèles	Pourcentage (%) gîtes positifs à anophèles	Nombre total de gîtes prospectés	Nombre total de gîtes positifs à anophèles	Pourcentage (%) gîtes positifs à anophèles	82,65
Traités	4398	600	13,64	28548	102	0,36	
Témoins	5175	1155	22,32	10857	1132	10,43	

III.1.5 – Evaluation de l'impact des traitements larvicides sur la distribution saisonnière des gîtes larvaires à anophèle avant et après l'intervention dans les quartiers traités et témoins

Avant la mise en œuvre des traitements, la proportion des gîtes positifs a varié de 7,1% en saison sèche à 17,03% en saison des pluies dans les quartiers traités. Dans les quartiers témoins, cette fréquence des gîtes avec anophèle a varié de 13,94% en saison sèche à 25,9% en saison des pluies (figure 19.A).

Après les traitements, la proportion de gîtes larvaires avec les larves d'anophèles était de 0,43% dans les quartiers traités contre 11,72% dans les quartiers témoins comme l'illustre la figure 19B. En saison sèche, une diminution significative des gîtes positifs à anophèle a 0,19% après les traitements larvicides a été observée dans les sites traités ($\chi^2 = 9,529$; $P = 0,002$). Dans les sites témoins, les gîtes positifs à anophèles ont été plus fréquents (11,72%) en saison des pluies qu'en saison sèche ($\chi^2 = 72,249$; $P = 0,0001$).

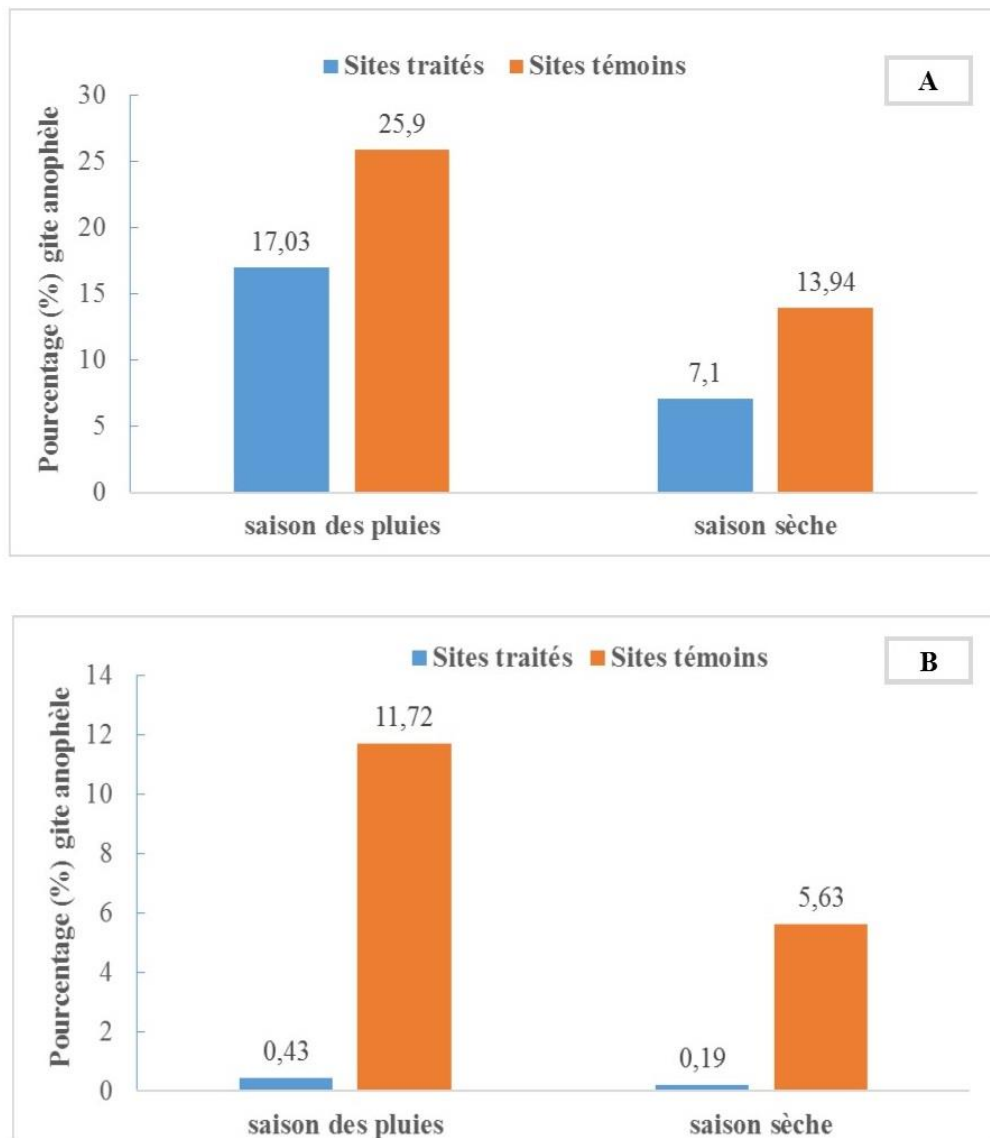


Figure 19: Variation de la fréquence saisonnière des gîtes larvaires : (A) avant l'intervention, (B) après l'intervention.

III.1.6- Evaluation de l'impact des traitements larvicides sur la composition du complexe *Anopheles gambiae* s.l

Seules deux espèces appartenant au complexe *Anopheles gambiae* s.l. ont été retrouvées au cours de cette étude en l'occurrence, *An. gambiae* et *An. coluzzii*. Les identifications moléculaires effectuées sur 349 échantillons ont montré que 280 spécimens soit 86,96 % étaient *An. coluzzii* et 42 spécimens soit 13,04 % étaient *An. gambiae* ; aucun hybride n'a été enregistré. Avant le début des traitements, on a noté une forte dominance d'*An. coluzzii* (93,65%) dans tous les quartiers traités et une faible fréquence d'*An. gambiae* (6,33%). Après la phase des traitements, la composition des espèces a été la même malgré une diminution significative d'*An. coluzzii* (85,71%) ($\chi^2 = 6,147$; $P = 0,01$) (figure 20).

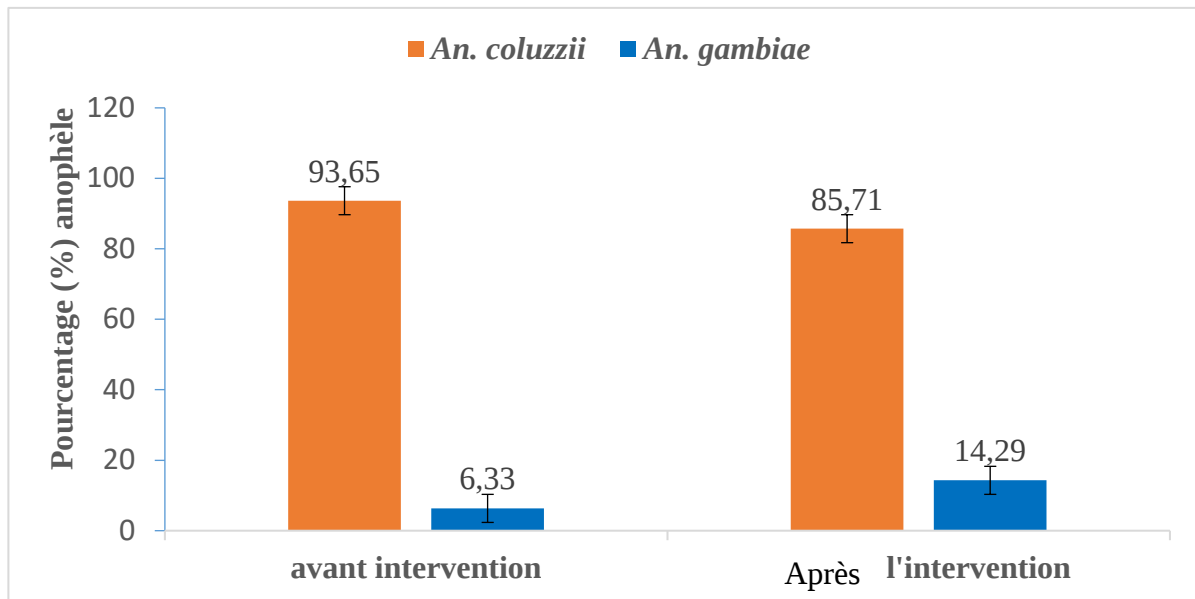


Figure 20: Variation de la fréquence des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l avant et après la lutte anti-larvaire dans les quartiers traités.

Concernant les sites témoins avant l'intervention, *An. coluzzii* était toujours l'espèce dominante devant *An. gambiae*. Après l'intervention une légère diminution non significative d '*An. coluzzii* (88,31%) ($\chi^2 = 0,866$; $P < 0,352$) et une légère augmentation non significative d '*An. gambiae* (11,69%) ($\chi^2 = 0,099$; $P < 0,752$) ont été enregistrées (figure 21).

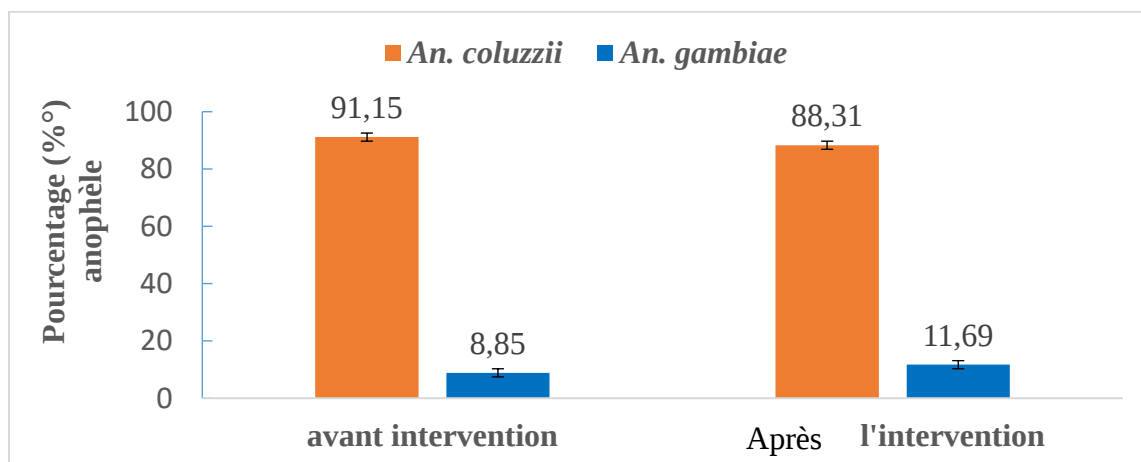


Figure 21: Variation de la fréquence des gîtes peuplés des espèces du complexe *Anopheles gambiae* s.l avant et après la lutte anti-larvaire dans les quartiers témoins.

III.1.7- Distribution des membres du complexe *Anopheles gambiae* s.l en fonction des quartiers

Dans les quartiers traités, l'espèce *An. coluzzii* a été majoritaire dans tous les sites d'étude par rapport à l'espèce *An. gambiae* s.s qui, lui a été faiblement représenté exception faite à Tongolo (figure 22.A).

Concernant les sites témoins, *An. coluzzii* a été fortement représenté dans tous les sites de collecte de la ville par rapport à *An. gambiae* dont les fréquences se sont révélées faibles (figure 22.B).

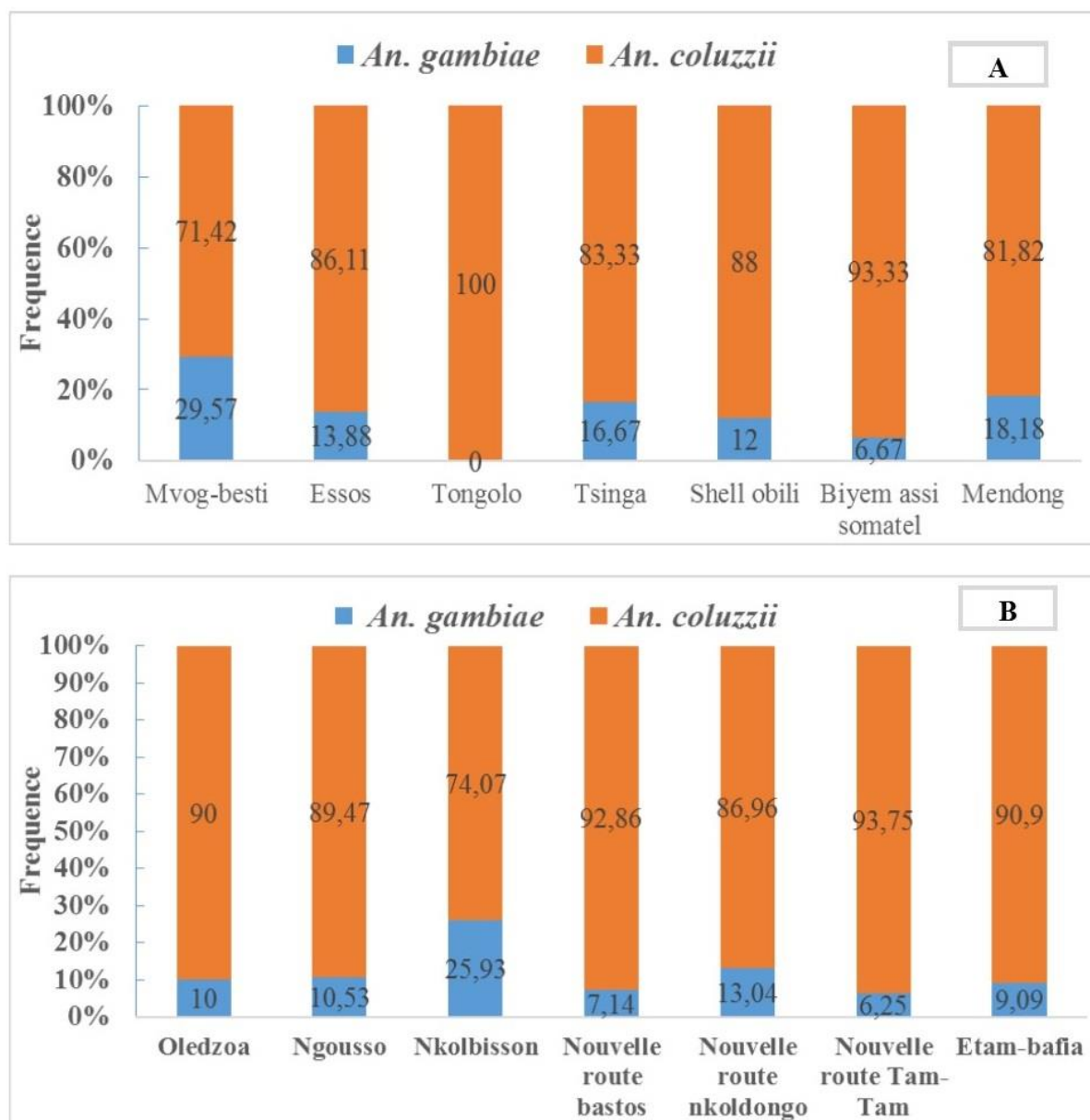


Figure 22: Composition du complexe *Anopheles gambiae* s.l. (A) quartiers traités ; (B) quartiers témoins.

III.2- Discussion

Les caractéristiques physiques, biologiques et environnementales des gîtes larvaires ont varié en fonction du statut du site et du quartier. Dans les sites traités, les anophèles ont été plus retrouvés dans les mares d'eau temporaires. La préférence d'*An. gambiae* pour les collections d'eau temporaires et ainsi que pour des gîtes inhabituels tels que les récipients et fosses septiques a été signalée par les études précédentes dans la même ville (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011 ; Nana, 2017) et ailleurs (Mbida *et al.*, 2016 ; Tia *et al.*, 2016). Les larves d'anophèles ont également été retrouvées dans des gîtes sans prédateurs (poissons larvivores). Ce qui montre le rôle de régulateurs que peut jouer ces organismes sur les populations de moustiques. Les études menées par Munga *et al.* (2006) au Kenya ont montré que la présence de prédateurs dans les mares d'eau influençait le choix du site d'oviposition par les femelles gravides d'*An. gambiae* s.s. Des essais d'utilisation de poissons larvivores pour le contrôle des populations de moustiques ont été entrepris dans différentes régions du monde avec des succès mitigés jusqu'ici (Walshe *et al.*, 2017). Toutefois l'utilisation de prédateurs reste une méthode qui peut aider à contrôler les populations de moustiques. La plupart des gîtes à anophèles retrouvés avait la surface d'eau dépourvue de végétation. Cette situation pourrait être liée au fait que la végétation peut abriter un grand nombre d'espèces qui peuvent être des compétiteurs ou des prédateurs pour les larves (Rajendran & Reuben, 1991 ; Grillet, 2000). Il a cependant été noté une forte présence d'algues dans les gîtes avec larves d'anophèles, cette situation pourrait être liée au fait que les algues constituent des sources d'aliments pour les larves (Mwangangi *et al.*, 2007 ; Kipyab *et al.*, 2015). La majorité des gîtes larvaires a été retrouvée près des maisons d'habitation (< 10 mètres). Ces données sont en accord avec les études précédentes (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011 ; Djamouko-Djonkam *et al.*, 2019) et montrent le rôle prépondérant joué par les activités humaines dans la création des gîtes à moustiques. Les activités tels que le lavage de véhicules, la pratique de l'agriculture, les constructions des habitations dans les zones marécageuses, l'absence de curetage des rigoles ou l'absence de nettoyage et d'élimination des déchets ont été rapportées créer des conditions favorables au développement des moustiques (Awolola *et al.*, 2007 ; Djouaka *et al.*, 2008 ; Tene *et al.*, 2012). Par ailleurs la présence des gîtes à moustiques près des habitations suppose une faible dispersion du vecteur *An. gambiae* s.l. dans la ville de Yaoundé. Des observations similaires ont été rapportées pour l'espèce *An. arabiensis* à Dakar au Sénégal qui ne se disperserait pas à plus de 300m de ses gîtes en zone urbaine (Trape *et al.*, 1992).

Au cours de cette étude un nouveau larvicide combinant *Bacillus thuringiensis israelensis* et *Bacillus sphaericus* a été utilisé pour le contrôle des populations de moustiques. Cette étude a montré un impact significatif des traitements sur les populations d'anophèles avec une réduction de l'ordre de 70 à 82,65% des gîtes larvaires avec larves d'anophèles. Au cours de l'étude, des

diminutions significatives de la proportion des gîtes positifs à anophèles ont été observées après chaque application du larvicide avec des mois où le taux de réduction était presque de 100%. Ces résultats sont en accord avec les études menées sur le continent Africain (Kandyata *et al.*, 2012 ; Kacou, 2015 ; Diédhiou *et al.*, 2017) qui ont montré une bonne efficacité de la lutte anti-larvaire à l'aide de biolarvicide dans le contrôle des populations de moustiques et la transmission du paludisme à l'homme (Fillinger *et al.*, 2009 ; Geissbuhler *et al.*, 2009 ; Fillinger & Lindsay, 2011 ; Maheu & De Castro, 2013 ; Afrane *et al.*, 2016). Face à la montée de la résistance des vecteurs aux insecticides, aux changements de comportements de vecteurs et à la faible utilisation des moustiquaires imprégnées (Ranson *et al.*, 2011 ; Bamou *et al.*, 2019), la lutte anti-larvaire peut constituer un moyen efficace pour le contrôle des populations de moustiques particulièrement si elle est bien menée (WHO, 2013). La ville de Yaoundé composée d'une succession de collines et de vallées, offre un faciès idéal pour la mise en œuvre de la lutte anti-larvaire. Dans la ville de Yaoundé, plus de 90% des gîtes larvaires de moustiques sont retrouvés dans les basfonds ce qui fait que des actions de lutte ciblées à ces zones pourraient significativement réduire les densités de moustiques et la transmission du paludisme. Toutefois nous avons relevé au cours de notre étude une différence en termes d'efficacité des traitements d'un quartier à un autre. Des quartiers tels Essos, Mendong et Tsinga ont montré une persistance des gîtes à anophèles malgré la fréquence des traitements ; cette situation relève la nécessité de mieux connaître les particularités de chaque site afin d'améliorer l'efficacité des actions de lutte. Des activités telles que la pratique de l'agriculture dans les basfonds marécageux, le défrichage de la végétation dans ces sites pendant la saison sèche, se sont avérées créer des gîtes importants pour les moustiques (Djamouko *et al.*, 2019). Il est également important de noter que la baisse de l'efficacité des traitements notée en saison des pluies pourrait provenir du phénomène de lessivage des gîtes larvaires à la suite de fortes pluies qui pourrait réduire la dose de larvicide disponible pour les moustiques dans les mares d'eau. La présence d'autres organismes dans les gîtes tels les têtards qui pourraient consommer les particules de larvicide réduirait sa disponibilité dans les mares d'eau. Ces limites ont été relevées dans les études précédentes (Becker, 1992 ; Delogko, 2019).

Au Cameroun, il n'y a eu jusqu'ici que très peu d'essais de lutte anti-larvaire par l'utilisation de larvicide biologique. Les seules répertoriées jusqu'ici sont ceux de Barbazan *et al.*, (1997) et Hougard *et al.*, (1993) respectivement dans les villes de Maroua et Yaoundé qui ont porté sur l'utilisation de *Bacillus sphaericus* pour le contrôle des populations de *Culex quinquefasciatus*. Ces études qui n'étaient que des essais préliminaires à petites échelles ont permis de collecter des informations de base devant servir à la mise en œuvre des expériences à grande échelle.

Les analyses moléculaires des larves d'anophèles récoltées sur le terrain ont indiqué la présence de 2 espèces : *An. gambiae* s.s. et *An. coluzzii* appartenant au complexe *An. gambiae* s.l. *Anopheles coluzzii* était l'espèce la plus abondante dans la ville de Yaoundé quel que soit le quartier. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures qui ont montré une bonne adaptation de cette espèce à l'environnement urbain comparativement à *An. gambiae* s.s. (Wondji *et al.*, 2005 ; Kamdem *et al.*, 2012 ; Tene *et al.*, 2013, 2015 ; Nana, 2017 ; Kala, 2017 ; Doumbe-Belisse *et al.*, 2018 Djamouko-Djonkam *et al.*, 2019).

Les traitements larvicides n'ont pas affecté la composition de la faune anophélienne dans la ville de Yaoundé malgré qu'une légère augmentation d'*An. gambiae* s.s. a été noté après l'intervention. Cette augmentation, qui a été également observée dans les quartiers témoins, ne saurait être attribuée à l'effet des traitements mais plutôt à des variations saisonnières.

Au terme de cette étude, on peut relever que la mise en œuvre de la lutte anti-larvaire dans la ville de Yaoundé s'est accompagnée d'une réduction de la fréquence des gîtes avec anophèles. Même si au cours de cette étude nous n'avons pas mesuré l'impact de cette réduction sur la transmission du paludisme à l'homme, il est fort probable que le niveau de réduction affecte celui de transmission du parasite, du moustique à l'homme, de même que l'incidence des cas cliniques comme cela a pu être démontré dans les études similaires conduites sur le continent. Face aux défis qui entravent l'efficacité des mesures actuelles de lutte (moustiquaire imprégnée d'insecticide notamment), la lutte anti-larvaire peut permettre un meilleur contrôle des populations de moustiques. Au Cameroun, cette lutte anti-larvaire est une mesure qui est intégrée dans le plan stratégique du programme national de lutte contre le paludisme comme mesure complémentaire pour le contrôle du paludisme dans les grands centres urbains que sont Yaoundé et Douala. Il est important dès à présent que des stratégies de lutte intégrée soient de plus en plus implémentées dans le pays pour améliorer le contrôle des maladies à transmission vectorielle. Au-delà des résultats obtenus, cette étude nous a permis de développer des capacités techniques qui peuvent être mises à profit dans la pratique de la lutte anti-larvaire en milieu urbain au Cameroun.

RECOMMANDATIONS

A l'issue de ces travaux, nous recommandons aux pouvoirs publics de :

- mettre un accent sur la sensibilisation des populations quant à l'assainissement de l'environnement, le drainage et une bonne gestion des eaux usées ;
- encourager l'implémentation de la lutte intégrée mettant en commun différentes interventions telles que la lutte anti-larvaire pour un contrôle efficace des populations de moustiques et des maladies à transmission vectorielle.

PERPECTIVES

Dans la suite de nos travaux, nous envisageons : d'étudier l'impact de la lutte anti-larvaire sur les indicateurs épidémiologiques ainsi sur l'économie du pays.

- Adja A.M., Assare K.R., Assi S.B., Yapi A. & Ngoran K.E. (2015).** Etude du comportement au repos et des préférences trophiques d'*Anopheles gambiae* dans la ville d'Adzope, Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 11(3): 1857-1881.
- Afrane Y.A., Mweresa N.G., Wanjala C.L., Gilbreath T.M. III, Zhou G., Lee M-C., & al., (2016)** Evaluation of long lasting microbial larvicide for malaria vector control in Kenya. *Malaria Journal*, 15(1): 577.
- Antonio-Nkondjio C., Kerah C., Simard F., Awono-Ambene P., Chouaibou 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., Ndjondo Sandjo N., Awono-Ambene P. & Wondji C.S. (2018).** Implementing a larviciding efficacy or effectiveness control intervention against malaria vectors: key parameters for success. *Parasites & Vectors*, 11: 57.
- Antonio-Nkondjio C., Ndo C., Njiokou F., Bigoga J.D., Awono-Ambene P., Etang J., Ekobo A.S. & Wondji C.S. (2019).** Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & Vectors*, 12: 501.
- 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 & Vectors*, 10(1): 472.
- Antonio-Nkondjio C., Tene-Fossog B., Ndo C., Menze-Djantio B., Zebaze Togouet S., Awono-Ambene P., Costantini C., Wondji C.S. & Ranson H. (2011).** *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, 10: 154.
- Awolola T., Oduola A., Obansa J., Chukwurar N. & Unyimadu J. (2007).** *Anopheles gambiae*s.l breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44: 241-244.
- Awono-Ambene P.H., Etang J., Antonio-Nkondjio C., Ndo C., Eyisap W.E., Piameu M.C. & al. (2018).** The bionomics of the malaria vector *Anopheles rufipes* Gough, 1910 and its susceptibility to deltamethrin insecticide in North Cameroon. *Parasites & Vectors*, 11: 253.
- Balam M. (2010).** Utilisation du *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) dans le cadre du contrôle des vecteurs du paludisme en milieu rural de Banambani et de N'Gbakoro droit au Mali. Thèse. Université de Bamako.89p.

- Bamou R., Sonhafouo-Chiana N., Mavridis K, Tchuinkam T., Wondji C.S. Vontas J. & Antonio-Nkondjio C. (2019).** Status of insecticide resistance and its mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations from forest settings in south Cameroon. *Genes*, 10: 741.
- Barbazan P., Baldet T., Darriet F., Escaffre H., Haman Djoda D. & Houcard J-M. (1997).** Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(3): 263-269.
- Bhatt S., Weiss D.J., Cameron E., Bisanzio D., Mappin B., Dalrymple U., Battle K.E., Moyes C.L., Henry A. & al., (2015).** The effect of malaria control on *Plasmodium faciparum* in Africa between 2000 and 2015. Article. *Journal of Nature*, 9(1): 207-211.
- Bouallam S., Maarouf A., Bouzidi A. & Badri A. (1998).** Efficacité des traitements chimiques et biologiques sur les Culicidae: effet létal du téméphos et taux de consommation par *Gambusia affinis*. Annales de Limnologie-international. *Journal of Limnology*, 34 (1): 99-105.
- BUCREP (2015).** Quatrième recensement général de la population et de l'habitat. Rapport de présentation des résultats définitifs. [http://www.statistics-cameroon.org/downloads/Rapport de présentation 3 RGPH.pdf](http://www.statistics-cameroon.org/downloads/Rapport%20de%20présentation%203%20RGPH.pdf). Accessed.
- Butcher G.A., Cohen S. & Garnham P.C. (1970).** Passive immunity in *Plasmodium Knowlesi* malaria. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 64 (6): 850-856.
- Carnevale P. (1995).** La lutte anti-vectorielle, perspectives et réalités. *Tropical Medicine*, 55 : 56-65.
- Carnevale P., Robert V., Manguin S., Corbel V., Fontenille D., Garros C., Rogier C. & Roux J. (2009).** Les anophèles : Biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte anti-vectorielle. IRD Editions, Marseille, 402 p.
- Catteruccia F., Godfray H. & Crisanti A. (2003).** Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science*, 299(5610): 1225-1227.
- Charlwood J.D., Pinto J., Sousa C.A., Madsen H., Ferreira C. & DO Rosario V.E. (2002).** The swarming and mating behavior of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera : Culicidae) from Sao Tomé Island. *Journal of Vector Ecology*, 27: 178-183.
- 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: 246-274.

- Coluzzi M., Sabatani A., Della Torre A., Di Deco M. & Petrarca V. (2002).** A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* complex. *Science*, 298: 1415-1418.
- Coosemans M. (1985).** Comparaison de l'endémie malarienne dans une zone de riziculture et dans une zone de culture de coton dans la plaine de la Rusizi, Burundi. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, 65(2): 187-200.
- De Barjac H. (1978).** Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques : *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotype 14. Comptes rendus de l'académie des sciences de Paris. 286, 797-800.
- De Barjac H. & Frachon E., (1990).** Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, 35 (2): 233-240.
- Derua Y.A., Kahindi S.C., Mosha F.W., Kweka E.J., Atieli H.E., Wang X. & al. (2018)** Microbial larvicides for mosquito control: impact of long lasting formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* on non-target organisms in western Kenya highlands. *Ecology Evolution*, 8: 7563-73.
- Derua Y.A., Kahindi S.C., Mosha F.W., Kweka E.J., Atieli H.E., Zhou G., Lee M.S, Githeko A.K. & Yan G. (2019).** Susceptibility of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to microbial larvicides in diverse ecological settings in western Kenya. *Medicine of Vector Entomology*, 33(2): 220 - 227.
- Diabaté A., Dabiré R.K., Kengne P., Brengues C., Baldet T., Ouari A., Simard F. & Lehmann T. (2006).** Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. *Journal of Medicine Entomology*, 43 (3): 480-483.
- Diédhiou S.M., Konaté L., Doucouré S., Samb B., Niang E.A., Sy O., Thiaw O., Konaté A., Wotodjo A.N., Diallo M., Gadiaga L., Sokhna C. & Faye O., (2017).** Efficacité de trois larvicides d'origine biologique et d'un régulateur de croissance contre *Anopheles arabiensis* au Sénégal. *Bulletin de Societé de Pathologie Exotique*, 110: 102-115
- Djamouko-Djonkam L., Mounchili-Ndam S., Kala-Chouakeu N., Nana-Ndjangwo S.M., Kopya E., Sonhafouo-Chiana N., Talipouo A., Ngadjeu C.S., Doumbe-Belisse P., Bamou R., Toto J.C., Tchuinkam T., Wondji C.S. & Antonio-Nkondjio C. (2019).** Spatial distribution of *Anopheles gambiae* sensu lato larvae in the urban environment of Yaoundé, Cameroon. *Infectious Diseases of Poverty*, 8: 84
- 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
- Doumbe-Belisse P., Ngadjieu C.S, Sonhafouo-Chiana N., Talipouo A., Djamouko Djonkam L., Kopya E., Bamou R., Toto J.C., Mounchili S., Tabue R., AwonoAmbene P., Wondji C.S., Njiokou F. & Antonio-Nkondjio C. (2018).** High malaria transmission sustained by *Anopheles gambiae* s.l. occurring both indoors and outdoors in the city of Yaoundé, Cameroon. *Wellcome Open Research*, 3: 164.
- Enayati A. & Hemingway J. (2010).** Malaria management: past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 55: 569-591.
- Federici B.A., Park H.W., Bideshi D.K., Wirth M.C. & Johnson J.J. (2003).** Recombinant bacteria for mosquito control. *Journal of Experimental Biology*, 206 (21): 3877-3885.
- Fillinger U., & Lindsay W.S. (2011).** Larval source management for malaria control in Africa: myths and reality. *Malaria Journal*, 10: 353.
- Fillinger U., Ndenga B., Githeko A. & Lindsay S.W. (2009).** Intergrated malaria vector control with microbial larvicides and insecticide-treated nets in western Kenya: a controlled trial. *Bulletin of the World Health Organization*, 87: 655-665.
- Fontaine M., Pease J.B., Steele A., Waterhouse R.M., Neafsey D.E., Sharakhov IV., Jiang X., Hall A.B., Catteruccia F. & Kakani E. (2015).** Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science*, 347.
- Fontenille D., Cohuet H., Awono-Ambene P., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccolini D., Duchemin J-B., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre M., Ceainu C., Le Goff G. & Simard F. (2003).** Systématique et biologie des anophèles vecteurs de plasmodium en Afrique, données récentes. *Médecine Tropicale*, 63: 247- 253.
- Garnham P.C.C. (1966).** Malaria parasites and other Haemosporidia Blackwell Scientific Publications. Rev., 53: 242-255.
- Geissbuhler Y., Kannady K., Chaki P.P., Emidi B., Govella N.J., Mayagaya V., Kiama M., Mtasiwa D. & al. (2009).** Microbial larvicide application by a large-scale, community-based program reduces malaria infection prevalence in urban Dar es Salaam, Tanzania. *PloS one*, 4(3).
- Gillies M.T. & DE Meillon B. (1968).** The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *Publication of South African Institute of Medical Reseach*, 54, 343p.
- Gillot C. (2005).** *Entomology* 3rd edition Springer, Dardrecht The Netherlands, 831p.

- Grillet, M. (2000).** Factors associated with distribution of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae) in a malarious area, northeastern Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 37: 231-238.
- Harbach R. (2004).** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 94(6): 537-553.
- Harbach R. & Hay S. (2012).** A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5: 69.
- Hervy J., Le Goff G., Geoffroy B., Hervé J., Manga L. & Brunhes J. (1998).** Les anophèles de la région Afro-tropicale. Logiciel d'identification et d'enseignement.
- Hofte H. & Whitelet H.R., (1989).** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53 (2): 242-255.
- Holstein M. (1949).** Etude sur l'anophélisme en AOF, Soudan Français, Bamako. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 42: 374-378.
- Hougard J.M., Mbentengam R., Lochouart L., H. Escaffre H., Darriet F., Barbazan P.L. & Quillévéré D. (1993).** Lutte contre *Culex quinquefasciatus* par *Bacillus sphaericus*: résultats d'une campagne pilote dans une grande agglomération urbaine d'Afrique équatoriale. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 71 (3/4): 367-375.
- Jacob W. & Joao P. (2012).** Manuel de formation à l'entomologie du paludisme, à nos villages riverains du fleuve Niger, Mali. Thèse, 96p.
- Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J. & Mahillon J. (2003).** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environment Microbiology*, 5: 631-640
- Kacou K.Y.A. (2015).** Impact des traitements larvicides sur les populations d'anophèle et de culex dans la sous-préfecture de Tiemlekro (Cote d'ivoire). Mémoire. Université de Nangui Abrogoua. 36p.
- Kala C.N.A. (2018).** Influence des facteurs physicochimiques et biologiques des gîtes sur la distribution des larves du genre *Anopheles* (Diptera: Culicidae) dans la ville de Yaoundé. Mémoire. Université de Dschang. 85p.
- 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. & Costantini C. (2012).** Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*, 7(6): e39453.

- Kandyata A., Mbata K.J., Shinondo C.J., Katongo C., Kamuliwo R.M., Nyirenda F., Chanda J. & Chanda E. (2012).** Impacts of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* insect larvicides on mosquito larval densities in Lusaka, Zambia. *Medical Journal of Zambia*, 39: 33-8.
- Kipyab C., Khaemba M., Mwangangi M., Mbogo M. (2015).** The physicochemical and environmental factors affecting the distribution of *Anopheles merus* along the Kenyan coast. *Parasites & Vectors*, 8: 221.
- Lacoursière J.O. & Boisvert J. (2004).** Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Ministère de l'environnement Québécois.
- Liu C.M. & Tzeng Y.M., (2000).** Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (1): 11-17.
- M'Bouyé D. (2010).** Epidémiologie de la transmission du paludisme dans trois villages riverains du fleuve Niger, Mali. Thèse 96p.
- Maheu-Giroux M. & Castro M.C. (2013).** Impact of community-based larviciding on the prevalence of malaria infection in Dar es Salaam, Tanzania. *PloS one*, 8(8).
- Mappe F.P.A., (2017).** Evaluation de l'action entomopathogène de *Bacillus thuringiensis israelensis* dans les gîtes larvaires d'*Anopheles gambiae* s.l. vecteurs du paludisme à Yaoundé. Mémoire, 51p.
- Martin P.A.W., (1994).** An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. *American Entomologist*, 40 (2): 85-91.
- Mbida Mbida A., Etang J., Akono Ntonga P., Eboumbou Moukoko C., Awono-Ambene P., Tagne D., Talipouo A., Ekoko W., Binyang J., Tchoffo G., Lehman G. & Mimpfoundi R. (2016).** Nouvel aperçu sur l'écologie larvaire d'*Anopheles coluzzii* Coetzee et Wilkerson, 2013 dans l'estuaire du Wouri, Littoral-Cameroun. *Société de Pathologie Exotique et Lavoisier*, 110: 92-101.
- Mehlhorn H., (2000).** Biology – Structure - function. *Encyclopedia Reference of Parasitology*, (Mehlhorn, Allemande), 2nd edition, 492 – 494.
- Meilleur L., Lacoursière J. & Boisvert J. (2010).** Le *Bacillus sphaericus*, Utilisation pour le contrôle des moustiques, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 36 p.
- Mulla M.S. (1990).** Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquito. Dans *Bacterial control of mosquitoes and black flies: biochemistry, genetics and applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. H. de Barjac and D. J. Sutherland (Eds.), Rutgers University Press, New Brunswick. pp. 134-160.

- Mulla M.S, Norland R.L., Fanara D.M., Darwazeh H.A. & Mckean D. (1971).** Control of chironomid midgs in recreational lakes. *Journal of Economic Entomology*. 64: 300-307.
- Munga S., Minakawa N., Zhou G., Barrack O., Githeko A. & Yan G. (2006).** Effects of larval competitors and predators on oviposition site selection of *Anopheles gambiae* s.s *Journal of Medical Entomology*, 43: 221-224.
- Mwangangi J.M., Mbogo C.M., Muturi E.J., Nzovu J.G., Githure J.I., Yan G., Minakawa N., Novak R. & Beier J.C. (2007).** Spatial distribution and habitat characterization of *Anopheles* larvae along the Kenyan coast. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44: 44-51.
- Nana N. M. S. (2018).** Influence des facteurs bioécologiques sur la distribution des anophèles (Diptera: Culicidae) dans la ville de Yaoundé, Cameroun. Mémoire, Université de Yaoundé I, 59p.
- Nayar J.K., Knight J.W., Ali A., Carlson D.B. & O'Bryan P.D. (1999).** Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15: 32-42.
- OMS. (2009).** Rapport 2009 sur le paludisme dans le monde. Genève, 78p.
- OMS. (2012).** Interim position statement : the role of larviciding for malaria control in sub-saharan Africa. Geneva, 21p.
- OMS. (2013).** Gestion des gîtes larvaires, une mesure supplémentaire pour la lutte anti vectorielle contre le paludisme. Manuel de procédure pratique. Genève, 2p.
- OMS. (2014).** Entomologie du paludisme et lutte anti-vectorielle, Programme mondial de lutte antipaludique, pp.5-7.
- OMS. (2019).** Rapport sur le paludisme dans le monde. Le rapport de cette année en un clin d'œil. Genève, 7p.
- Pages F., Orlandi-Pradines E., & Corbel V. (2006).** Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37: 153-161.
- Park H-W., Hayes S.R. & Mangum C.M. (2008).** Distribution of mosquitocal *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from sediment samples in Florida. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11(4): 217-220.
- PNLP. (2019).** Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Cameroun
- Poopathi S. & Tyagi B.K. (2004).** Mosquitocidal toxins of spore forming bacteria: recent advancement. *African Journal of Biotechnology*, 3(12): 643-650.

- Rajendran R. & Reuben R. (1991).** Evaluation of the water fern *Azolla microhilla* for mosquito population management in the rice-land agroecosystem of south India. *Medical and Veterinary Entomology*, 5: 299-310.
- Ranson H., N'Guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z. & Corbel V. (2011).** Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control. *Trends in Parasitology*, 27(2): 91-98.
- Reid J.A. (1965).** The species in medical entomology, with examples from mosquitoes. Proceeding. *XII International Congress of Entomology*, 1964-759.
- Rodhain F., & Perez C. (1985).** Outline of medical and veterinary entomology. Data on the epidemiology of vector-borne diseases. Maloine sa éditeur.
- Russell P.F., West L.S., Manwell R.D. & Macdonald G. (1963).** Practical malariology. 2nd edition, London, Oxford Univ Press.
- Santolamazza F., Mancini E., Simard F., Qi Y., Tu Z. & Della Torre A. (2008).** Insertion of SINE200 retrotransposons islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal*, 7: 163.
- Service M.W. (1993).** Mosquito ecology: Field Sampling Methods, Vector biology and control. *London Applied Sciences Publishes*. 583p.
- Siegel J.P., (2001).** The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77 (1): 13-21.
- Sinègre G., Gaven B., Julien J.L. & Moussiegt O. (1990).** Utilisation of *Bacillus sphaericus* in mosquito control: presentation, performance and limitations. 13p.
- Singh B., Kim Sung L., Matusop A. & al., (2004).** A large focus of naturally of acquired *Plasmodium Knowlesi* infectious in human beings. *Lancet*, 363: 1017-24.
- Sinka M., Bangs M., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., Mbogo C., Hemingway J., Patil A., Temperley W., Gething P., Kabaria C., Burkot T., Harbach R. & Hay S. (2012).** A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5: 69.
- Sokhna C., Ndiath M.O. & Rogier C. (2013).** The changes in mosquito vector behaviour and emerging resistance to insecticides will challenge the decline to malaria. *Clinical Microbiology Infections*, 19: 902-907.
- Suchel J.B. (1987).** Les climats du Cameroun. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Bordeaux III, 1188p.

Tabti N., (2017). Etude comparée de l'effet de *Bacillus thuringiensis* sur les populations purifiées et des populations des gîtes artificiels de *Culex pipiens* (Diptera-Culicidae) dans la ville de Tlemcen. Thèse. Université de Tlemcen.180p.

Tabue R., Nem T., Atangana J., Bigoga J., Patchoke S., Tchoune F., Fodjo B., Leke R. & Fondjo E. (2014). *Anopheles ziemanni* a locally important malaria vector in Ndong health district, North West region of Cameroun. *Parasites & Vectors*, 7: 262.

Tabue R.N., Awono-Ambene P., Etang J., Atangana J., Antonio-Nkondjio C. & Toto J.C. (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 & Vectors*, 10: 22.

Technical use bulletin, vectomax, 2018.

Tene-Fossog B., Ayala D., Acevedo P., Kengne P., Ngomo I., Mebuy A., Makanga B., Magnus J., Awono-Ambene P., Njiokou F., Pombi M., Antonio-Nkondjio C., PaupyC., Besansky N. & Costantini C. (2015). Habitat segregation and ecological character displacement in cryptic African malaria mosquitoes. *Evolutionary Applications*, 8: 326-345.

Tene-Fossog B., Kopya E., Ndo C., Menze-Djantio B., Costantini C., Njiokou F., Awono Ambene P. & Antonio-Nkondjio C. (2012). Water quality and *Anopheles gambiae* larval tolerance to pyrethroids in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Journal of Tropical Medicine*, 10.

Tene B.F., Poupardin R., Costantini C., Awono-Ambene P., Wondji C.S., Ranson H. & Antonio-Nkondjio C. (2013). Resistance to DDT in urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaounde Cameroun. *PloS One*, 8 (4).

Tia E., Gbalégba N.G., M'Bra K.R. Kaba A., Boby O.A., Koné M., Chouaibou M., Koné B. & Koudou G.B. (2016). Étude du niveau de production larvaire d'*Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) dans différents types de gîtes à Oussou-yaokro au Centre-Ouest et à Korhogo, au Nord (Côte d'Ivoire). *Journal of Applied Biociences*, 105: 10170-10182.

Townson H., Nathan M.B., Zaim M., Guillet P., Manga L., Bos R. & Kindhauser M. (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health Organization*, 83: 942-947.

- Trape J-F., Lefebvre-Zante E., Legros F., Ndiaye G., Bouganali H., Druilhe P. & Salem G. (1992).** Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(2): 181-189.
- Walshe D.P., Garner P., Adeel A.A., Pyke G.H. & Burkot R.T. (2017)** Larvivorous fish for preventing malaria transmission (Review). 70p.
- WHO. (2011).** World Malaria Report 2011. Geneva: WHO, 140p.
- WHO. (2013).** Larval source management a supplementary measure for malaria control. An operational manual. Geneva: World Health Organization, 2p.
- WHOPES (2011).** WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae, 26p.
- Wondji C., 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.
- Yogo S. (2005).** Contribution à la maîtrise de la gestion des boues de vidange dans la ville de Yaoundé. Mémoire. ENSAI, Université de Ngaoundéré (Cameroun), 54p.
- Zahiri N.S., Federici B.A. & Mulla M.S. (2004).** Laboratory and Simulated Field Evaluation of a New Recombinant of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against Culex Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41 (3): 423-429.