

Coût génétique de la résistance aux insecticides sur le profil salivaire du moustique *Culex pipiens quinquefasciatus*

[Genetic cost of insecticide resistance on the salivary profile of *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito]

Innocent Djegbe¹, Adam Gbankoto², Akadiri Yessoufou³, Rousseau Djouaka⁴, and Sylvie Cornélie⁵

¹Ecole Normale Supérieure de Natitingou Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématique d'Abomey, Benin

²Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie Expérimentale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Benin

³Laboratoire de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Benin

⁴Plaforme Agro-Eco-Health, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Benin

⁵UMR Maladies Infectieuses et vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Montpellier, France

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: *Culex quinquefasciatus* mosquito has developed several resistant mechanisms to the main families of insecticides used in public health. Among these mechanisms, the insensitive acetyl cholinesterase (*Ace.1^R*) confers cross resistance to organophosphorous and carbamates. Fortunately, in an insecticide-free environment, this mutation is associated with a severe genetic cost that affects different biological systems. In insects, the saliva contains bioactive molecules (vasodilators, anticlotting and anti-hemostatic proteins) which permit a successful blood meal and also facilitate pathogen transmission. In this context, we studied the differential expression of salivary proteins between susceptible and carbamate-resistant (*Ace.1^R*) strains of *Cx. quinquefasciatus* having a same genetic background. Electrophoresis on acrylamid gel was used to determinate the quantity and quality of salivary proteins expression. The results showed that three majority saliva proteins of the D7 family have lower expression in the resistant strain compared to the susceptible strain. Conversely, ten enzymes involved in metabolic reactions, were up regulated in the resistant strain. This differential expression according to the resistant status of the mosquito may have a repercussion on the biting behaviour and on the transmission of parasites/virus to vertebrate hosts. The next step will consist to study using a video based analysis system the feeding behaviour of susceptible (*Ace1^{SS}*) and resistant (*Ace1^{RR}*) mosquitoes in flying chambers. These studies will provide new elements to develop alternative insecticide resistance management strategies in *Culex* mosquito.

KEYWORDS: *Culex quinquefasciatus*, resistance, *Ace1* mutation, salivary proteins, electrophoresis.

RÉSUMÉ: Le moustique *Culex quinquefasciatus* a développé des mécanismes de résistance aux principales familles d'insecticides utilisées en santé publique. L'un de ces mécanismes concerne la mutation de l'acétylcholinesterase (*Ace1^R*) qui lui confère une résistance aux organophosphorés et aux carbamates. Néanmoins, dans un environnement sans insecticide, cette mutation entraîne un coût génétique qui se répercute sur différents systèmes physiologiques. Chez les insectes, la salive constitue un élément important dans la prise de repas sanguin mais elle joue également un rôle prépondérant dans la transmission d'agents pathogènes. Dans ce contexte, nous avons étudié la différence d'expression des protéines salivaires de

Cx. quinquefasciatus entre une souche sensible et une souche résistante aux carbamates (mutation *Ace1^R*) mais possédant le même fond génétique. L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel d'acrylamide a été utilisée afin de déterminer l'expression quantitative et qualitative des protéines salivaires. Les résultats ont montré que trois protéines majoritaires de la salive de la famille D7 sont sous-exprimées chez la souche résistante. En revanche une dizaine de protéines intervenant dans les réactions métaboliques (enzymes), sont surexprimées chez cette dernière. Ces différences de profil salivaire entre individus sensibles et résistants pourraient avoir des répercussions sur le comportement trophique des moustiques et sur la transmission d'agents pathogènes. La prochaine étape consistera à mesurer par des systèmes d'analyse vidéo le comportement d'approche, de sonde et de piqûre des moustiques ayant des génotypes différents pour la mutation *Ace1^R*. Ces études permettront d'envisager des méthodes alternatives de détection et de gestion de la résistance dans les populations culicidiennes.

MOTS-CLEFS: *Culex quinquefasciatus*, mutation *Ace1*, résistance, protéines salivaires, électrophorèse.

1 INTRODUCTION

Les insectes constituent la classe la plus importante du règne animal sur le plan de leur abondance et du nombre d'espèces. Quelques milliers d'entre eux sont nuisibles pour l'homme, soit directement en transmettant des agents pathogènes ou en provoquant des nuisances par leur piqûre ; soit indirectement en s'attaquant aux animaux domestiques ou aux plantes cultivées. En santé publique, les maladies à transmission vectorielle constituent l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays de la zone intertropicale, provoquant ainsi un frein considérable au développement économique des pays du Sud [1]. Les insectes qui véhiculent ces maladies appartiennent à plusieurs ordres et sont tous caractérisés par leur comportement hématophage. Parmi ceux-ci, les moustiques (diptera: culicidae) forment la plus grande famille de vecteurs d'agents pathogènes [2]. Le moustique *Culex quinquefasciatus* Say (1823) demeure le principal vecteur des filaires lymphatiques, maladies touchant globalement 120 millions de personnes essentiellement dans les régions tropicales [3]. Il est également le vecteur potentiel de la fièvre à virus West Nile en Amérique du Nord [4-6] et constitue la principale nuisance en milieu urbain.

La prévention des maladies à transmission vectorielle peut faire appel à la vaccination, la chimioprophylaxie et à la lutte antivectorielle. Cette dernière apparaît d'ailleurs comme la principale méthode de prévention de masse applicable contre la plupart des endémies tropicales transmises par les moustiques. La lutte contre *Cx quinquefasciatus* est basée essentiellement sur la lutte anti-larvaire. Elle consiste au traitement des gîtes potentiels (caniveaux, puisards, latrines eaux polluées riches en matières organiques) à l'aide de larvicides ou à leur réduction par des mesures d'assainissement. Les larvicides les plus employés sont les insecticides de la famille des organophosphorés du fait de leur efficacité en milieux riches en matières organiques. Des résultats prometteurs ont aussi été obtenus en Afrique par l'utilisation de toxines bactériennes à *Bacillus sphaericus* [7, 8]. Malheureusement, *Cx. quinquefasciatus* a développé de multiples mécanismes de résistance aux principales familles d'insecticides utilisées en santé publique (pyréthrinoides, organophosphorés, organochlorés et les carbamates [9] ainsi qu'à *B. sphaericus* [10, 11].

La résistance se traduit par l'apparition dans une population d'individus possédant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet léthal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce [12]. Il a été montré l'existence d'une résistance multiple chez *Cx. quinquefasciatus* en Afrique de l'ouest, en particulier au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire [13, 14] et au Bénin [15]. La résistance a été également observée au sud de la France [16] ainsi qu'aux Etats-Unis [17]. Les principaux mécanismes impliqués sont des résistances métaboliques et/ou des modifications de la cible des insecticides [18]. Chez *Cx. quinquefasciatus*, la résistance provient d'une surproduction des enzymes intervenant dans la détoxification des insecticides en particulier des oxydases [19], des Glutathions-S-transférases [20] et des estérases [21]. Les modifications de cibles proviennent de mutations ponctuelles dans les gènes codant pour le canal sodium (mutation *kdr* [22] et acétylcholinestérase insensible [23]. Chez *Cx. quinquefasciatus*, la mutation G119S (glycine remplacée par une sérine) au niveau du locus *Ace.1* (acétylcholinestérase) lui confère une résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates [23].

Si la résistance procure à l'insecte un avantage sélectif en présence d'insecticides, celle-ci peut constituer un handicap dans un environnement sans insecticide: on appelle cela le coût génétique. Il a été montré que certains gènes impliqués dans la résistance aux insecticides entraînent un changement important sur le comportement et la physiologie de l'insecte. Par exemple, les taux d'émergence de femelles de *Cx quinquefasciatus* résistantes aux insecticides (locus *Ace.1* et *kdr*) sont significativement plus faibles que ceux des femelles sensibles [24]. Des études ont montré que les mâles résistants de *Cx quinquefasciatus* étaient également moins compétitifs pour l'accouplement que les mâles sauvages [25]. En présence de prédateurs (*plea minutissima*, hétéroptère), les individus résistants (*Ace.1^R* et *Ester*) échappent moins bien à la prédation que

les individus sensibles [26]. D'un point de vue physiologique, il a été démontré que l'acétylcholinestérase insensible (*Ace.1^R*) s'avérait beaucoup moins efficace à dégrader les substrats nicotiniques que celle des individus sensibles de la même espèce [27]. Ce coût proviendrait d'une moins grande stabilité de l'enzyme dû à un processus de déacylation moins performant [28]. Enfin, une étude publiée en 2000 dans la revue *Nature* a montré que des moustiques de *Cx quinquefasciatus* porteurs de certains gènes de résistance aux insecticides (surproduction d'estérase) pourraient être moins compétents pour transmettre les microfilaires à *Wuchereria Bancrofti* que les moustiques sensibles [29]. Cela démontre que le coût génétique de la résistance affecte de nombreux traits de vie et différents systèmes biologiques dont certains sont impliqués dans la transmission de pathogènes.

Chez les insectes hématophages, la salive joue un rôle important dans la prise de repas de sang. La principale fonction de la salive est sa puissante action anticoagulante et antiplaquettaire grâce à l'apyrase [30]. Pendant la piqûre, la salive intervient pour faciliter la prise du repas sanguin en anesthésiant les tissus afin d'éviter que l'hôte ne chasse l'arthropode. Avant son repas sanguin, le moustique femelle injecte dans la peau de l'hôte des vasodilatateurs tels que le maxidilan (phlébotome), la sialokinine (*Aedes*) et des facteurs anticoagulants qui inhibent la thrombine [31]. Chez *Cx. quinquefasciatus*, peu d'articles décrivent les protéines salivaires. Néanmoins, les amylases et les glucosidases qui interviennent dans la digestion des hydrates de carbone (sucres) ont été décrites, d'autres enzymes telles les lysosomes qui jouent un rôle dans la désinfection des repas sucrés [32, 33]. Un constituant majeur de la salive de *Culex* est la famille des protéines D7 qui appartiennent à la superfamille des odorant binding proteins. Leur rôle dans le repas sanguin est incertain ; néanmoins il a été suggéré que ces protéines pourraient séquestrer des amines biogéniques (sérotonine, histamine...) intervenant ainsi sur la vasoconstriction et la douleur induite lors de la piqûre [34]. La composition de la salive peut être influencée par le pathogène. Par exemple chez *Anopheles*, l'apyrase est diminuée lors de l'infection à *Plasmodium* [35]. Il a été décrit chez *Culex* que l'injection de la salive avec le pathogène « Cache valley virus » augmente l'infection dans un modèle souris [36]. L'intervention de la salive dans la transmission des pathogènes a également été étudiée pour l'infection à virus West Nile [37].

Ces études récentes montrent que la salive semble jouer un rôle prépondérant dans la transmission d'agents pathogènes. L'objectif de cette étude est donc de déterminer si la présence d'un gène ayant un coût génétique important (locus *Ace.1^R*) peut modifier l'expression des protéines salivaires chez *Cx quinquefasciatus*. Pour répondre à cet objectif, deux souches d'élevage de *Cx quinquefasciatus* ayant un fond génétique commun ont été comparées. Une souche sensible aux insecticides (*Ace.1^{SS}*) et une souche résistante aux carbamates et aux organophosphorés (*Ace.1^{RR}*). L'expression des protéines salivaires de ces souches a été étudiée par électrophorèse bidimensionnelle. Une analyse qualitative et quantitative a été réalisée sur les profils salivaires obtenus. La spectrométrie de masse a ensuite été utilisée pour identifier les protéines ayant une expression modulée par la résistance.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE: LE MOUSTIQUE *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

Deux souches d'élevage de *Cx. quinquefasciatus* ont été utilisées dans cette étude: une souche de référence sensible aux insecticides (SLAB [38]) et une souche résistante aux carbamates et aux organophosphorés (SR) par l'intermédiaire d'une acétylcholinestérase insensible [39]. Ces deux souches possèdent le même fond génétique et ne diffèrent que par la présence de la mutation G119S chez la souche résistante. Ces derniers ont été obtenus après plusieurs générations de backcross successifs (afin d'introduire le génome de la souche sensible dans la souche résistante) et de sélection au propoxur [25].

2.2 EXTRACTION DES GLANDES SALIVAIRES

Des moustiques sensibles et résistants âgés de 7 jours et non gorgés ont d'abord été endormis au CO₂. Les glandes salivaires (figure 1) ont été disséquées dans une goutte de tampon NaCl 150mM ; Hepes 75 mM sous une loupe binoculaire. Les paires de glandes ont été récoltées dans des tubes contenant du tampon de réhydratation. Les échantillons ont été conservés à -80°C. La lyse des glandes salivaires a été réalisée par choc thermique dans l'azote liquide, et les protéines salivaires ont été récupérées après centrifugation à 30000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a ensuite été utilisé pour l'électrophorèse bidimensionnelle.

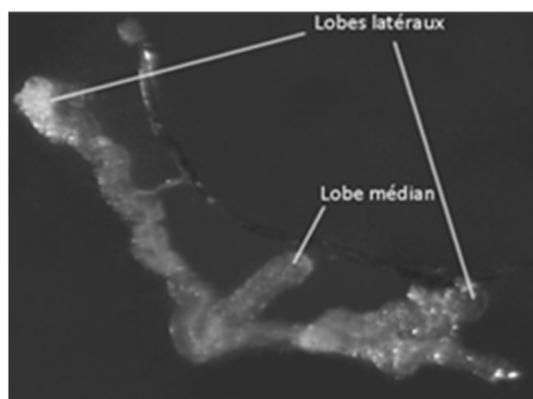


Fig. 1. Glande salivaire de *Culex pipiens quinquefasciatus*

2.3 SÉPARATION DES PROTÉINES PAR SDS-PAGE

Afin d'éviter une réoxydation aléatoire des groupements sulfhydryl (SH) des protéines pendant la deuxième dimension, les strips ont été réduits (DTT), alkylés (Iodoacétamide) puis équilibrés avec des tampons appropriés. Ensuite les strips ont été déposés sur gel SDS-PAGE. Pour assurer une meilleure reproductibilité dans la séparation des protéines, des gels pré-coulés d'un gradient d'acrylamide 10-20% (Bis-Tris, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) dans un tampon de migration (Tris-glycine SDS, annexe 3) 1X dans la cuve basse et de 2X dans la cuve haute ont été utilisés. Les conditions de cette deuxième séparation sont les suivantes: 70 Volts pendant 15 min et 200 Volts jusqu'à la fin de la migration (environ 40 min). Après la migration les protéines ont été fixées à l'acide acétique puis colorées au Bleu Colloïdal (Fermentas) pendant 48h.

2.4 ANALYSE D'IMAGES ET STATISTIQUES DES GELS ET DIGESTION DES PROTÉINES

Le logiciel Same Spots (Nonlinear Dynamics) a été utilisé pour l'analyse densitométrique des gels. Afin d'observer d'éventuelles différences d'expression entre les protéines de moustiques sensibles et résistants, le volume (aire du spot x l'intensité de coloration) de chacun des spots a été calculé par le logiciel. Le test statistique utilisé était l'ANOVA. Le seuil de significativité a été fixé à 5% ($P < 0,05$).

Les spots contenant les protéines ont été prélevés sur les gels. La digestion, l'extraction et le dessalage des protéines ont été réalisés au robot FreedomEvo (TECAN) à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier.

2.5 IDENTIFICATION DES PROTÉINES

Les protéines ont été analysées par spectrométrie de masse sur un appareil, MALDI-TOF (UltraflexI, Bruker Daltonics). Les spectres générés ont permis l'interrogation de la base de données: Sprot-Trembl (<http://www.expasy.org/sprot/>), en se restreignant à la classe des insectes, pour l'identification des protéines. Certains spots non identifiés par l'analyse MALDI ont été soumis à une analyse par séquençage LC-MS/MS (liquid chromatography- mass spectrometry).

3 RÉSULTATS

3.1 ECHANTILLONNAGE ET DOSAGE DES PROTÉINES SALIVAIRES

Pour chaque souche, nous avons extrait 10 lots de 30 paires de glandes. Dix-huit lots de glandes ont été récoltés en tampon IEF et 2 lots en tampon salin. Pour ce dosage, la courbe obtenue à partir de la gamme étalon (BSA: Bovin Serum Albumin) est présentée dans la fig. 3. L'équation de cette courbe a permis de calculer la concentration en protéines. Les résultats de ce dosage ont montré que la concentration en protéines des glandes salivaires de la souche résistante est supérieure à celle des glandes de la souche sensible.

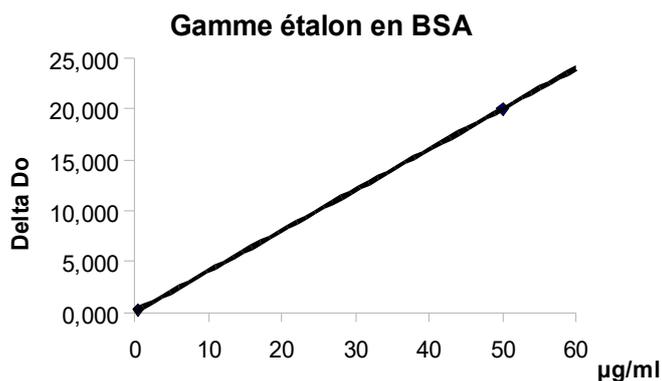


Fig. 2. Courbe de dosage des protéines

Tableau 1. Concentration des protéines salivaires dans les différentes souches de *Cx. quinquefasciatus*

Souches	Sensible	Résistante
DO obtenue	0,386	0,401
Facteur de dilution	60	
Equation de la droite	$y = 0,0103x + 0,0019$	
Concentration en µg/µl	0,729	0,816
Quantité déposée en µg	14,580	16,323

3.2 ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE ET ANALYSES

La coloration des gels au Bleu Colloïdal a permis de mettre en évidence la présence des protéines dans les gels.

Des protéines majoritaires avec des poids moléculaires compris entre 20 et 36 kDa ont d’abord été observées du côté basique du gel. Beaucoup de protéines sont situées entre pH4-7 et dans la moitié supérieure du gel avec des poids moléculaires compris entre 40 et 160 kDa. D’autres protéines basiques à faible poids moléculaires ont été également observées dans la région basse du gel.

La méthode d'analyse des composants principaux (ACP) nous a permis de valider l'existence de deux groupes bien distincts de gels: le groupe des gels de la souche sensible (SLAB) et celui des gels de la souche résistante (SR). Aucune ressemblance n'a été observée au niveau de ces deux groupes (fig. 3).

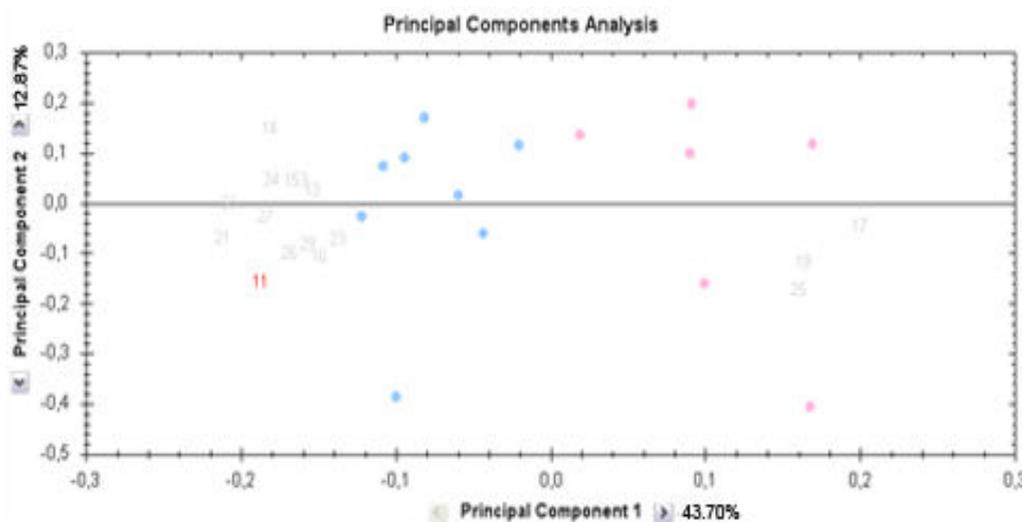


Fig. 3. Résultats de l'analyse statistiques ACP (analyses des composants principaux) pour les 2 groupes de gels, représentant les protéines salivaires de la souche sensible (rose) et résistante (bleu)

Après alignement, le logiciel a calculé les volumes normalisés d'un nombre total de 826 spots. Les résultats statistiques (ANOVA) ont montré que le volume de quatorze spots était significativement différent entre la souche sensible et résistante ($p < 0,05$). Trois spots (n°17, 19, 25) présentaient un volume plus élevé chez la souche sensible (figure 6). Ces spots étaient situés dans la région des protéines de 30kDa. Les autres spots ont eu un volume plus élevé chez la souche résistante. La plupart de ces spots étaient localisés dans la partie haute du gel.

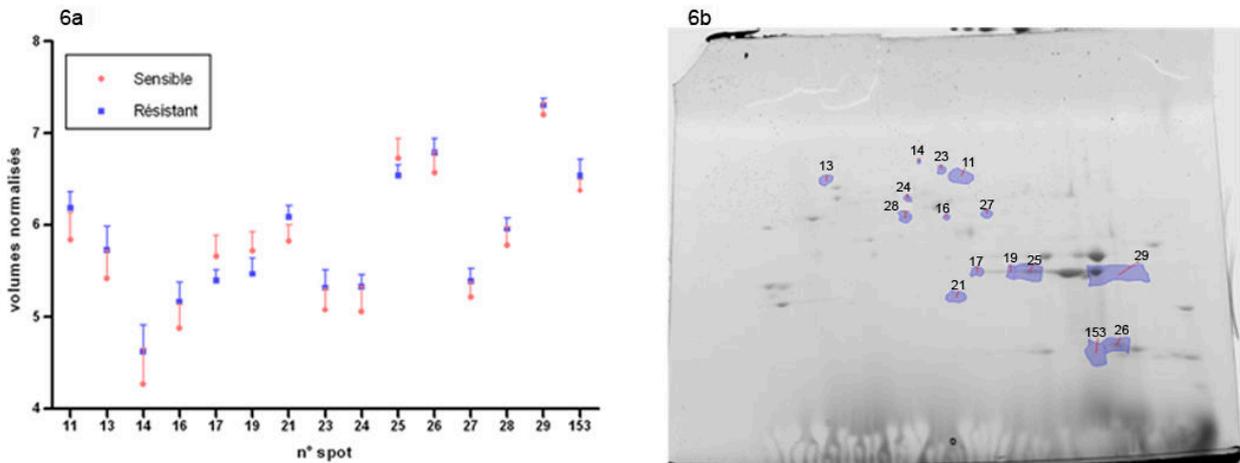


Fig. 4. Variation de l'expression des protéines chez les souches sensibles et résistantes de *Cx. quinquefasciatus*

3.3 IDENTIFICATION DES PROTÉINES

Les analyses par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ont permis d'identifier différentes familles de protéines, des enzymes de poids moléculaires élevés (Malate déshydrogénase, désulfite isomérase), des protéines de petits poids moléculaires (14kDa, 16 kDa) et des protéines de la famille D7.

Les enzymes identifiées interviennent dans le cycle de Krebs et participent à la conformation des protéines (protéines chaperonnes : calréticuline, désulfite isomérase). Toutefois certaines protéines prélevées n'ont pas pu être identifiées par l'analyse MALDI. Ces protéines ont donc été soumises à identification par séquençage et spectrométrie de masse. Les résultats ont montré que certains de ces spots sont constitués de mélange de protéines. Par exemple, on retrouve les protéines D7 forme longue dans le spot majoritaire situé aux alentours de 30 kDa mais aussi un allergène de la famille des V5, conservée chez les arthropodes hématophages.

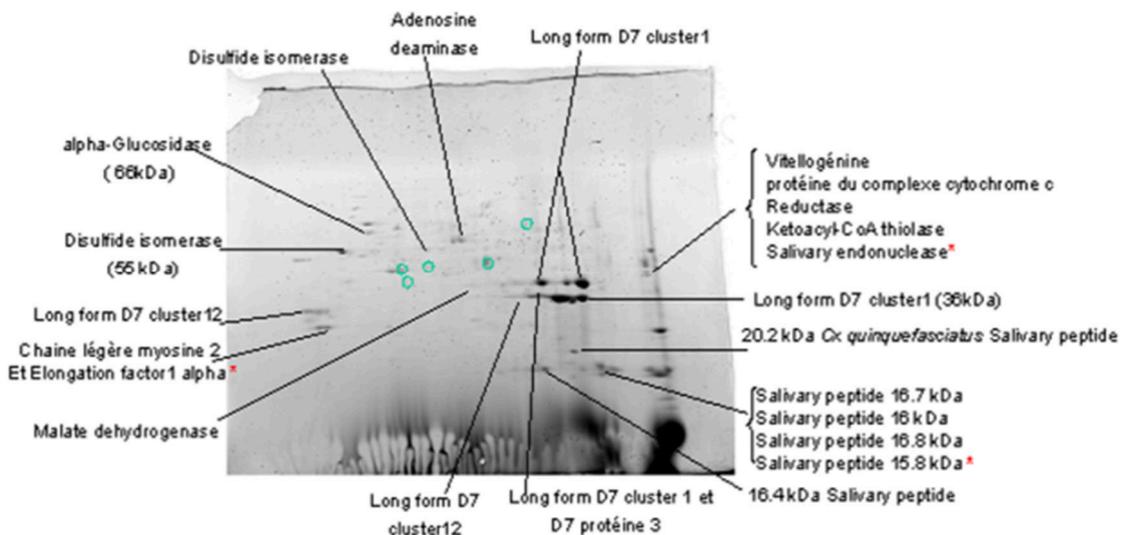


Fig. 5. Gel bidimensionnel montrant les protéines salivaires identifiées chez *Cx. quinquefasciatus*. Les protéines encadrées en bleu n'ont pu être identifiées

4 DISCUSSION

La présente étude a montré la différence entre les protéines salivaires de deux souches sensible et résistante aux insecticides de *Cx. quinquefasciatus* ayant un fond génétique commun.

Les résultats des différentes analyses effectuées ont montré que trois protéines étaient plus exprimées dans les glandes salivaires des moustiques sensibles (*Ace.1^{SS}*) tandis qu'une dizaine de protéines étaient plus exprimées chez les résistants (*Ace.1^{RR}*). La spectrométrie de masse a montré que les protéines sous-exprimées chez les moustiques résistants appartenaient à la famille des protéines D7 forme longue cluster 1 et 12. Parmi les protéines sur-exprimées chez les résistants, les enzymes du cycle de Krebs et des protéines chaperonnes ont été identifiées.

La méthodologie d'électrophorèse bidimensionnelle utilisée a permis pour la première fois d'explorer le protéome des glandes salivaires de *Cx. quinquefasciatus*. L'identification des protéines par spectrométrie de masse a permis également de confirmer les prédictions issues de l'analyse du génome. En effet, le génome de *Cx. quinquefasciatus* est en cours de séquençage et d'annotation, ce qui explique que plusieurs protéines n'ont pu être identifiées. L'analyse d'image a révélé des différences significatives, toutefois une variabilité a été observée au niveau de nos gels.

Les protéines de la famille des D7 sont conservées chez tous les diptères hématophages [34]. Cette famille de protéines est majoritaire chez les moustiques. Chez les *Anopheles*, cinq formes courtes et deux formes longues ont été décrites tandis que chez les *Aedes*, deux formes courtes et deux formes longues ont pu être identifiées. Chez *Culex*, nous avons observé la présence d'une seule forme courte et trois formes longues. Des études précédentes ont montré que certaines protéines de la famille des D7 lient la sérotonine et l'histamine qui sont libérées par l'hôte lors de la piqûre. Elles semblent jouer un rôle important dans la prise de repas sanguin en inhibant la vasoconstriction et la réponse à la douleur [34]. Dans notre étude, une diminution des protéines D7 forme longue chez la souche résistante pourrait suggérer une baisse d'efficacité dans la prise du repas de sang. Des études précédentes avaient signalé que le gène *Ace.1* influence différents traits de vie chez les individus résistants. Il a été démontré que l'acétylcholinesterase insensible (*Ace.1^R*) s'avérait beaucoup moins efficace à dégrader les substrats nicotiques que celle des individus sensibles de la même espèce [27]. Des études de comportement seraient maintenant nécessaires pour appréhender l'importance des modifications du profil salivaire chez les individus résistants de *Cx. quinquefasciatus*. Par exemple, des systèmes d'analyse vidéo pourraient être utilisés pour étudier le comportement trophique (temps de sonde et de piqûre) chez ces moustiques. Ainsi on pourra comprendre si la modification des protéines salivaires entraîne un coût ou un avantage pour un individu porteur de la mutation *Ace.1*.

Les protéines qui présentent une plus forte expression chez la souche résistante par rapport à la sensible appartiennent aux enzymes du cycle de Krebs (pyruvate carboxylase, aldéhyde et glutamate déshydrogénase...) suggérant une modulation de l'activité métabolique des glandes salivaires. L'autre groupe de protéines plus exprimées chez les résistants comprend l'adénosine désaminase (ADA) et l'alpha glucosidase. L'ADA intervient dans la dégradation des acides nucléiques ; chez les *Anopheles* et les *Aedes*, cette enzyme est sécrétée dans la salive, sa fonction reste toutefois inconnue. Chez *Culex*, bien qu'il existe un peptide signal dans la séquence, cette protéine ne semble pas sécrétée [32]. L'alpha-glucosidase intervient dans la dégradation des sucres, ainsi son augmentation chez les moustiques résistants pourrait témoigner d'une augmentation du métabolisme des sucres.

Cette étude présente des données importantes sur la composition des glandes salivaires de *Cx. quinquefasciatus*. Les résultats obtenus permettent d'envisager à long terme une utilisation des protéines salivaires dans la détection de la résistance.

5 CONCLUSION

Compte tenu du niveau actuel de la résistance dans les populations culicidiennes, il est important d'étudier les modifications induites par les gènes de résistance sur la physiologie et le comportement des moustiques vecteurs de maladies. Les protéines salivaires semblent jouer un rôle important dans la vie d'un arthropode. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence des protéines salivaires sur la transmission de pathogènes véhiculés par des moustiques de *Cx. quinquefasciatus* sensibles et résistants aux insecticides. Une meilleure connaissance de ces facteurs peut nous aider à mettre en place des méthodes plus efficaces de lutte anti-vectorielle.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie l'Institut de recherche pour le développement pour avoir financé cette recherche.

REFERENCES

- [1] WHO: Evaluation de la santé, In Rapport sur la santé dans le monde. La vie au 21^e siècle. Une perspective pour tous, pp. 43-65, 1998.
- [2] F. R., C. P.: Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. In: *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Edited by A. MS. paris; 1985.
- [3] Who, "Lymphatic Filariasis: The disease and its control", *Fifth report of the Who expert Committee on Filariasis*, vol. 821, Tech. Rep. Ser edn; pp. 1-17, 1992.
- [4] Dohm D., O'Guinn M., Turell M., "Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus", *J Med Entomol*, Vol. 39, no. 1, pp. 221-225, 2002.
- [5] Turell M., Jones J., Sardelis M., Dohm D., Coleman R., Watts D., Fernandez R., Calampa C., Klein T., "Vector competence of Peruvian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for epizootic and enzootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus". *J Med Entomol*, Vol. 37, no. 6, pp. 835-839, 2000.
- [6] Turell M., Sardelis M., Dohm D., O'Guinn M., "Potential North American vectors of West Nile virus". *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 951, pp: 317-324, 2001.
- [7] Hougard J., Lochouarn L., Escaffre H., Le Goff G., Prud'hom J., Quillévéré D., "Campaign against the vectors of onchocerciasis in the surroundings of a refugee camp located in a savanna zone of Cameroon", *Ann Soc Belg Med Trop*, Vol. 70, no. 3, pp. 203-211, 1990.
- [8] Barbazan P., Baldet T., Darriet F., Escaffre H., Djoda D., Hougard J., "Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon". *J Am Mosq Control Assoc*, Vol. 13, no. 3, pp. 263-269, 1997.
- [9] Ranson H., Jensen B., Wang X., Prapanthadara L., Hemingway J., Collins F., "Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*", *Insect Mol Biol*, Vol. 9, no. 5, pp. 499-507, 2000.
- [10] Nielsen L., Johnsen C., Bindslev-Jensen C., Poulsen L., "Efficacy of acrivastine in the treatment of allergic rhinitis during natural pollen exposure: onset of action", *Allergy*, Vol. 49, no. 8, p. 630-636, 1994.
- [11] Nielsen-Leroux C., Pasquier F., Charles J., Sinègre G., Gaven B., Pasteur N., "Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae", *J Med Entomol*, Vol. 34, no. 3, pp. 321-327, 1997.
- [12] HAMON J., MOUCHET J., "The resistance to insecticides in insects of medical importance. Methods of study and the situation in Africa south of the Sahara", *Med Trop*, Vol. 21, pp. 565-596, 1961.
- [13] Chandre F., Darriet F., Doannio J., Rivière F., Pasteur N., Guillet P., "Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa". *J Med Entomol*, Vol. 34, no. 6, pp. 664-671, 1997.
- [14] Chandre F., Darriet F., Darder M., Cuany A., Doannio J., Pasteur N., Guillet P.: Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from west Africa, *Med Vet Entomol*, Vol. 12, no. 4, pp. 359-366, 1998.
- [15] Corbel V., N'Guessan R., Brengues C., Chandre F., Djogbenou L., Martin T., Akogbéto M., Hougard J., Rowland M., "Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa", *Acta Trop*, Vol. 101, no. 3, pp. 207-216, 2007.
- [16] Lenormand T., Raymond M., "Analysis of Clines with Variable Selection and Variable Migration", *Am Nat*, Vol. 155, no.1, pp. 70-82, 2000.
- [17] Liu H., Cupp E., Guo A., Liu N., "Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*", *J Med Entomol*, Vol. 41, no. 5, pp. 946-952, 2004.
- [18] Hemingway J., Ranson H., "Insecticide resistance in insect vectors of human disease", *Annu Rev Entomol*, Vol. 45, pp. 371-391, 2000.
- [19] Kasai S., Shono T., Yamakawa M., "Molecular cloning and nucleotide sequence of a cytochrome P450 cDNA from a pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus say*", *Insect Mol Biol*, Vol. 7, no. 2, pp. 185-190, 1998.
- [20] Hemingway J., A. MC, Kissoon K.E., Boddington R.G., Curtis C.F., Hill N., "The biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles sacharovi*: Comparative studies with a range of insecticide susceptible and resistant *Anopheles* and *Culex* species", *Pesticide Biochem Physiol*, Vol. 24, pp. 68-76, 1985.
- [21] Guillemaud T., Pasteur N., Rousset F., "Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*", *Proc Biol Sci*, Vol. 264, no. 1379, pp. 245-251, 1997.
- [22] Martinez-Torres D., Foster S., Field L., Devonshire A., Williamson M., "A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol Biol*, Vol. 8, no. 3, pp. 339-346, 1999.
- [23] Weill M., Duron O., Labbé P., Berthomieu A., Raymond M., "Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*". *Med Sci (Paris)*, Vol. 19, no. 12, pp. 1190-1192, 2003.
- [24] Berticat C., Bonnet J., Duchon S., Agnew P., Weill M., Corbel V., "Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes", *BMC Evol Biol*, Vol. 8, no. 104, pp. 1-9, 2008.

- [25] Berticat C., Boquien G., Raymond M., Chevillon C., "Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens mosquitoes*", *Genet Res*, Vol. 79, no. 1, pp. 41-47, 2002.
- [26] Berticat C., Duron O., Heyse D., Raymond M., "Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*". *Genet Res*, Vol. 83, no.3, pp.189-196, 2004.
- [27] Bourguet D., Lenormand T., Guillemaud T., Marcel V., Fournier D., Raymond M., "Variation of dominance of newly arisen adaptive genes". *Genetics*, Vol. 147, no. 3, pp. 1225-1234, 1997.
- [28] Shi M., Lougarre A., Alies C., Frémaux I., Tang Z., Stojan J., Fournier D., "Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance", *BMC Evol Biol*, 4:5, 2004.
- [29] McCarroll L., Paton M., Karunaratne S., Jayasuryia H., Kalpage K., Hemingway J., "Insecticides and mosquito-borne disease", *Nature*, Vol. 407, no. 6807, p. 961-962, 2000.
- [30] Ribeiro J: Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 1995, 4(3):143-152.
- [31] Ribeiro J., Francischetti I., "Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives", *Annu Rev Entomol*, Vol. 48, pp. 73-88, 2003.
- [32] Ribeiro J., Charlab R., Pham V., Garfield M., Valenzuela J., "An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*", *Insect Biochem Mol Biol*, Vol. 34, no. 6, pp. 543-563.
- [33] Nascimento E., dos Santos Malafrente R., Marinotti O., "Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*". *Arch Insect Biochem Physiol*, Vol. 43, no. 1, pp. 9-15.
- [34] Calvo E., Mans B., Andersen J., Ribeiro J., "Function and evolution of a mosquito salivary protein family". *J Biol Chem*, Vol 281, no.4, pp. 1935-1942, 2006.
- [35] Choumet V., Carmi-Leroy A., Laurent C., Lenormand P., Rousselle J., Namane A., Roth C., Brey P., "The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study. *Proteomics*, Vol.7, no.18, pp. 3384-3394, 2007.
- [36] Edwards J., Higgs S., Beaty B., "Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice". *J Med Entomol*, Vol.35, no.3, pp. 261-265, 1998.
- [37] Schneider B., McGee C., Jordan J., Stevenson H., Soong L., Higgs S., "Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection". *PLoS ONE*, Vol. 2, no. 11, pp. e1171, 2007.
- [38] Georghiou G., Metcalf R., Gidden F., "Carbamate-resistance in mosquitoes. Selection of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann (=C. quinquefasciatus Say) for resistance to Baygon". *Bull World Health Organ*, Vol. 35, no. 5, pp. 691-708, 1966.
- [39] Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M., "The unique mutation in Ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors". *Insect Mol Biol*, Vol. 13, no. 1, pp.1-7, 2004.