



**HAL**  
open science

**Résistance aux insecticides : importance dans la  
transmission du virus chikungunya par les moustiques  
*Aedes aegypti***

Lanjiao Wang

► **To cite this version:**

Lanjiao Wang. Résistance aux insecticides : importance dans la transmission du virus chikungunya par les moustiques *Aedes aegypti*. Biologie animale. Université de Guyane, 2018. Français. NNT : 2018YANE0007 . tel-02612568

**HAL Id: tel-02612568**

**<https://theses.hal.science/tel-02612568>**

Submitted on 19 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Thèse

En vue de l'obtention du grade de

## Docteur de l'université de Guyane

Spécialité : Physiologie et Biologie de l'Organisme - Population - Interactions

---

---

Présentée et soutenue publiquement le 08/11/2018 par :

INE : 5SK1PQ03PL 9

LANJIAO WANG

**Résistance aux Insecticides : Importance  
dans la Transmission du virus Chikungunya  
par les Moustiques *Aedes aegypti***

### JURY

Mathieu Nacher	PU	Président du Jury
Mathieu Nacher	PU	Examineur
Jean-Bernard Duchemin	HDR	Examineur
Valérie Choumet	HDR	Rapporteur
Mylène Weill	HDR	Rapporteur
Mirdad Kazanji	HDR	Directeur de Thèse
Isabelle Dusfour	Dr	Co-encadrant de Thèse



Résistance aux Insecticides : Importance dans la  
Transmission du virus Chikungunya par les  
Moustiques *Aedes aegypti*

*[Dédicace]*

*Je dédicace cette thèse à mes parents, qui m'ont toujours poussée à m'élever.*

“路漫漫其修远兮,吾将上下而求索”

*“The road ahead will be long, and our climb will be steep and endless”*

# REMERCIEMENTS

---

La thèse de doctorat représente l'aube de la maturité scientifique, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes, ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et notamment, mon directeur de thèse M. le Dr **Mirdad Kazanji**, ma co-directrice de thèse Mme le Dr **Isabelle Dusfour**, pour leur intérêt, leur soutien, et leur grande disponibilité durant la rédaction de ma thèse, M. le Dr **Romain Girod** et Mme le Dr **Dominique Rousset** qui m'ont également encadré pendant la réalisation de tous ces travaux, ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la Direction Internationale de l'Institut Pasteur et l'Université de la Guyane, qui m'ont permis, grâce à l'allocation de la bourse doctorale Calmett et Yersin, et diverses aides financières, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Mmes les Drs **Valérie Choumet** et **Mylène Weill** ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury. M. les Drs **Jean-Bernard Duchemin** et **Mathieu Nacher** m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance ; je les en remercie profondément.

Je remercie tout spécialement M. le Dr **Yanouk Epelboin** et Mme le Dr **Mathilde Gendrin**, non seulement pour ses conseils pour mieux avancer des manipulations, mais aussi pour son aide pour diriger les publications et ce manuscrit. Je remercie également M. le Dr **Albin Fontaine** pour m'avoir aidée à finir l'analyse des données et de son importante contribution lors de la direction de publication.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'ont témoigné l'équipe d'entomologie de l'Institut Pasteur de la Guyane : **Pascal Gaborit**, **Amandine Guidez**, **Jean Issaly**, **Romuald Carinci**, **Stanislas Talaga**, **Katy Heu**, **Ottavia**

**Romoli, Guillaume Lacour.** Et plus particulièrement **Pascal et Amandine** qui ont toujours été disponibles pour moi autant sur les plans professionnels que personnels.

Le personnel des unités de virologie et de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane s'est rendu disponible et m'a fourni une aide précieuse pour avancer dans cette recherche. Je n'oublie pas le personnel administratif de l'Institut Pasteur de la Guyane qui m'a assisté avec bienveillance dans toutes mes démarches administratives, et plus particulièrement le Directeur Administratif et Financier, et Mme **Venise Baptiste**.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux membres du Comité d'Entreprise de l'Institut Pasteur de la Guyane, qui à travers les activités proposées m'ont fait découvrir la culture et la nature sauvage de l'Amérique du sud.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Je suis redevable à M. **Sylvestre Canard**, pour son soutien affectif, ainsi que pour toutes les heures qu'il a consacrées à la relecture de cette thèse.

# RESUME

---

Le moustique *Aedes aegypti* est le vecteur principal du chikungunya, en l'absence de vaccins efficaces et de traitements disponibles, la lutte anti-vectorielle reste la stratégie principale de prévention et de défense pour le contrôle de la maladie. Néanmoins le problème de la résistance aux insecticides est en train de s'aggraver, notamment à cause de l'augmentation de la fréquence des luttes chimiques contre les intenses épidémies d'arbovirus, frappant partout dans le monde. Nous voulons comprendre l'importance de la résistance à l'insecticide dans le contexte de la transmission du virus chikungunya par les moustiques *Aedes aegypti*.

A partir de la population de moustiques de l'Ile Royale considérée comme la population la moins résistante en Guyane, 4 lignées de moustiques IR03, IR05, IR13 et IR 36 présentant différents profils de résistance à l'insecticide deltaméthrine ont été isolées, des tests biologiques et moléculaires ont été réalisés pour caractériser les mécanismes de résistance au niveau de leur phénotype et de leur génotype. Les résultats montrent que IR03 n'a qu'une résistance métabolique, que IR05 possède à la fois les résistances *kdr* et métabolique, et que IR13/36 est doté d'une faible résistance métabolique.

Plus de 600 femelles ont été infectées oralement par le virus chikungunya en utilisant un système de gorgement artificiel. Pour chaque individu, 3 séries d'échantillons (l'intestin moyen, la tête et la salive) sont récoltés indépendamment pour y quantifier le virus, afin de définir sa compétence vectorielle par trois paramètres : le taux d'infection, le taux de dissémination et le taux de transmission. Les résultats montrent qu'il existe des différences significatives dans la compétence vectorielle, plus spécifiquement dans le taux de dissémination de l'intestin moyen à tout le corps du moustique au fil du temps, qui est plus bas dans la lignée la plus résistante.

Ensuite, pour étudier les interactions entre les mécanismes résistants et la barrière de l'intestin moyen, les niveaux d'expression de certains gènes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsine) qui sont associés directement ou indirectement à la résistance à la deltaméthrine ont été mesurés sur des intestins moyens datant de 7 jours après le repas sanguin infectieux, que la tête soit positive ou négative. En complétant ces niveaux d'expression avec l'information du génotype *kdr*, les résultats montrent que la surexpression des enzymes de détoxification et l'existence des mutations *kdr* pourraient avoir un effet significatif sur la dissémination du virus dans le corps des moustiques.

Enfin, concernant le coût de la résistance qui est un des facteurs important pour évaluer la capacité vectorielle des moustiques résistants, les lignées isofemelles se manifestent plus clairement en termes de reproduction de la population (temps de ponte, fécondité et fertilité) que de développement des stades immatures y compris avec le temps de développement larvaire, les larves et les nymphes mortes, et le sex ratio.

En conclusion, toutes les données obtenues fournissent une meilleure compréhension sur l'existence des interactions entre la résistance aux insecticides et la capacité vectorielle chez les moustiques dans les conditions de laboratoire. Même si plus de manipulations concernant des validations fonctionnelles ou des recherches plus approfondies peuvent être déclenchées sur la base de ces travaux, nous avons déjà plus d'informations pour aider à adapter ou améliorer la réponse de la lutte anti-vectorielle, afin d'établir le meilleur compromis entre l'efficacité de la lutte et l'augmentation de la résistance.

**Mots-clés :** *Aedes aegypti*, chikungunya, known-down résistance, résistance métabolique, compétence vectorielle, coût de résistance, capacité vectorielle, contrôle anti-vectoriel.

# ABSTRACT

---

The mosquito *Aedes aegypti* is well known as the main vector of chikungunya, in absence of effective vaccinations and available treatments, mosquito control strategy remains the principal prevention and defense measures for disease control. Nevertheless, the problem of resistance to insecticides is worsening especially because of more and more frequent chemical fights against intense arbovirus outbreaks in the world. We are interested in understanding the effects of resistance in the context of transmission of the disease, and struggle to establish the reasonable compromise between the effectiveness of the vector control strategy and the increase in resistance.

From the mosquito population of Ile Royale which was considered as the least resistant population in French Guiana, 4 mosquito lines IR03, IR05, IR13 and IR36 with different resistance profiles to the deltamethrin insecticide have been isolated successfully, biologic and molecular tests were carried out to characterize the resistance mechanisms between them in regarding with their phenotypes and genotypes. The results indicated that IR03 presented only a metabolic resistance, that IR05 harboured both *kdr* and metabolic resistance, and that IR13/36 showed a moderate metabolic resistance.

More than 600 females were orally infected with chikungunya virus using an artificial engorged system. For each individual, 3 sets of samples (midgut, head and saliva) are collected independently to quantify the presence of virus, in order to define its vector competence by three parameters: the infection rate, the dissemination rate and the transmission rate. The results show that there were significant differences in vector competence, more specifically between the dissemination rate from the midgut to the head over time, which is lower in the more resistant line.

Then, expression level of certain genes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsin) which were associated with deltamethrin resistance were measured on the midgut at 7 days after infectious blood meal. Combined with the information of the *kdr* genotype, we propose that different mechanisms of resistance can influence not only the barrier of the midgut, but also affect the entire spread pathway of the virus to develop in the mosquito body from the midgut to the saliva.

Finally, regarding the cost of resistance, the isofemale lines manifested more clearly in terms of population reproduction than immature development including larval development time, larval and nymphal mortality, and the sex ratio post-emergence.

Overall, although this research requires more functional validations or supporting experimentations, the data obtained could provide a better understanding of the interactions between insecticide resistance and vector capacity in mosquitoes *Aedes aegypti* and supply some useful information to improve the current vector control.

**Key words:** *Aedes aegypti*, chikungunya, known-down resistance, metabolic resistance, vector competence, fitness cost, vector capacity, anti-vectoral control.

## AVANT-PROPOS

---

Il y a 245 millions d'années, les moustiques sont apparus et ont colonisé tous les milieux de notre planète, tandis que les premières espèces humaines sont apparues il y a 2,5 millions d'années. Ainsi l'interaction entre l'homme et le moustique constitue une longue histoire. Au cours du dernier quart du 19<sup>ème</sup> siècle, le moustique a été identifié comme un agent des maladies humaines et animales. Patrick Manson, en Chine, en 1878, a le premier découvert qu'un moustique pouvait héberger le nématode *Wucheria bancrofti* après s'être nourri sur une personne infectée. Il pouvait ensuite le transmettre à une autre personne jouant alors un rôle important en tant qu'hôte intermédiaire dans la transmission de ces parasites (Chernin 1983).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les moustiques font partie des animaux les plus dangereux et pourchassés du monde à cause des millions de décès qu'ils provoquent chaque année. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, le médecin anglais Ronald Ross avec son équipe a découvert que le moustique *Anopheles* pouvait transmettre la malaria (R. Ross 1898). Les recherches menées au 20<sup>ème</sup> siècle ont permis de recenser une centaine de virus pouvant causer des symptômes cliniques chez l'homme, dont un certain nombre entraînant une morbidité élevée et la mort. Les exemples les plus étudiés, le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue, le virus Zika et le virus du chikungunya sont transmis par les moustiques du genre *Aedes*. Le virus de l'encéphalite japonaise et le virus du Nil occidental sont transmis par les moustiques du genre *Culex*. La propagation des maladies émergentes et ré-émergentes inquiète, certaines étant sous haute surveillance, de plus l'incidence des arboviroses a été multipliée par rapport aux dernières décennies, et de plus en plus de pays signalent leur première flambée épidémique (Weaver et al. 2017).

Néanmoins les recherches de vaccins et de traitements efficaces progressent trop lentement pour l'instant, le contrôle du vecteur étant toujours la principale stratégie pour la prévention et la lutte contre les épidémies des maladies transmises par les moustiques. En 1959 avec les efforts conjugués d'entomologistes, de médecins et de paludologues, ainsi que grâce à l'utilisation de l'insecticide DDT, des campagnes d'éradication du paludisme ont été menées en associant 70 pays d'Europe, d'Amérique du Nord, et d'Asie dotés de grands supports financiers et techniques. Les campagnes d'éradication ultérieures restent similaires, n'apportant que très peu d'améliorations. Désormais, le contrôle spécialisé a remplacé l'éradication générale, la lutte anti-vectorielle doit s'adapter à la région, à la spécificité de ses populations urbaines et rurales, sauvages et domestiques, à la bio-écologie des moustiques, aux comportements de chaque espèce. Même s'il existe

différents styles de luttés, la lutte dépendant des molécules chimiques est toujours prédominante. Pendant l'évolution des insecticides, le DDT a été remplacé par le malathion, qui à son tour a été réformé pour le fénitrothion. Ces deux derniers ont été utilisés pendant plus de vingt ans et exclus en raison de leur toxicité pour l'homme et l'environnement. Actuellement, les pyréthrinoides sont les insecticides recommandés par l'OMS pour la lutte anti-vectorielle (Y. Epelboin et al. 2018).

Pendant plus de 40 ans l'utilisation intensive des insecticides a entraîné la propagation du problème de la résistance dans le monde entier, qui est maintenant considéré par l'OMS comme une menace majeure pour le contrôle des maladies. Le réseau mondial de résistance aux insecticides a lancé depuis mars 2016 un projet international « WIN » pour combattre la résistance aux insecticides, il regroupe 16 institutions de recherche vectorielle d'Afrique, de Méditerranée orientale, d'Europe, d'Amérique du sud, d'Asie du sud-est, d'Amérique du nord et du Pacifique occidental pour suivre la résistance aux insecticides à l'échelle mondiale. L'objectif principal est d'appuyer les recommandations pour la gestion de la résistance et de trouver des méthodes alternatives à la lutte chimique (Corbel et al. 2016).

# SOMMAIRE

---

<i>Remerciements</i> .....	<i>III</i>
<i>Résumé</i> .....	<i>V</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>VII</i>
<i>Avant-propos</i> .....	<i>IX</i>
<i>Sommaire</i> .....	<i>XI</i>
<i>Liste des Figures</i> .....	<i>XIII</i>
<i>Liste des Tables</i> .....	<i>XV</i>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Eléments historiques</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. <i>Aedes aegypti</i> : de la domestication à la colonisation mondiale.....	1
1.1.2. Emergence du chikungunya .....	3
<b>1.2. Biologie d'<i>Aedes aegypti</i></b> .....	<b>4</b>
1.2.1. Phase aquatique .....	4
1.2.2. Phase aérienne .....	5
<b>1.3. Virus du chikungunya</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Génome du CHIKV .....	6
1.3.2. Lignage du CHIKV .....	6
<b>1.4. Capacité vectorielle d'<i>Aedes aegypti</i></b> .....	<b>9</b>
1.4.1. Système vectoriel.....	9
1.4.2. Evaluation de la capacité vectorielle .....	11
1.4.3. Etude de la compétence vectorielle de <i>Aedes aegypti</i> .....	13
<b>1.5. Lutte anti-vectorielle et développement de la résistance aux insecticides</b> .....	<b>16</b>
1.5.1. Stratégie de contrôle d' <i>Aedes aegypti</i> .....	16
1.5.2. Résistance aux insecticides chez les moustiques.....	24
1.5.3. Méthodes de caractérisation de la résistance aux insecticides .....	32
<b>1.6. Coût de la résistance</b> .....	<b>34</b>
1.6.1. Revue de la littérature sur le coût de la résistance chez les moustiques vecteurs (Publication 1 - soumission chez le journal « Pathogens and Global Health »).....	34

1.6.2.	De l'intérêt des lignées isofemelles pour l'étude du coût de la résistance.....	61
<b>2.</b>	<b><i>Problématique et objectifs du travail</i></b> .....	<b>62</b>
<b>3.</b>	<b><i>Mise en place des méthodes</i></b> .....	<b>65</b>
<b>3.1.</b>	<b>Production et caractérisation de lignées isofemelles</b> .....	<b>66</b>
3.1.1.	Étapes de l'obtention des lignées .....	66
3.1.2.	Caractérisation de la résistance des isofemelles .....	68
<b>3.2.</b>	<b>Définir la compétence vectorielle des isofemelles pour la transmission de CHIKV</b> .....	<b>78</b>
3.2.1.	Préparations de la manipulation .....	79
3.2.2.	Infection orale .....	85
3.2.3.	Mesure de la compétence vectorielle .....	86
<b>4.</b>	<b><i>Interactions entre la résistance et compétence vectorielle</i></b> .....	<b>88</b>
<b>4.1.</b>	<b>Modulation de la dissémination entre les lignées résistantes et sensibles (Publication 2 - soumission pour le PlosOne)</b> .....	<b>89</b>
<b>4.2.</b>	<b>Données complémentaires : influence des mécanismes de résistance sur la barrière de l'intestin moyen</b> .....	<b>117</b>
<b>5.</b>	<b><i>Coût de la résistance chez les lignées isofemelles</i></b> .....	<b>125</b>
<b>6.</b>	<b><i>Conclusions, discussion et perspectives</i></b> .....	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b><i>Liste de publications</i></b> .....	<b>140</b>
<b>8.</b>	<b><i>Bibliographie</i></b> .....	<b>141</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

CHIKV	Virus du chikugunya
DENV	Virus de la dengue
CV	Capacité Vectorielle
CYP450s	Cytochromes P450 mono-oxygénases
GST	Glutathion S-Transférases
CCE	Carboxyle/cholinestérases
AChE	Acétylcholinestérase
GABA	Neurotransmetteur gama-aminobutyric acide
ECSA	Est / Centre / Sud-Africaine
ARNi	Interférence ARN
<i>kdr</i>	Knock-Down Résistance
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
TIS	Technique de l’Insecte Stérile
PIE	Période d’Incubation Extrinsèque
MILDs	Moustiquaires Imprégnées d’Insecticide Longue Durée
CNV	Nombre de copies de gènes
CL50	Concentration létale atteignant 50%
NO	Nouvelle-Orléans (souche de référence)
DL50	Dose Létale 50%
RR50	Ratio de Résistance 50
PFU	Unité formant des plages
FFU	Unité formant des foyers
TCID <sub>50</sub>	Tissue Culture Infectious Dose 50

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1. Carte mondiale de répartition prévisionnelle de <i>Aedes aegypti</i> . .....	2
Figure 2. Femelle prenant un repas sanguin. ....	4
Figure 3. Cycle de vie de <i>Aedes aegypti</i> . ....	5
Figure 4. Génome de CHIKV .....	6
Figure 5. Carte de distribution géographique des génotypes de CHIKV et du mouvement des épidémies de CHIKV. ....	7
Figure 6. Cycle de transmission virale chez le moustique. ....	13
Figure 7. Méthodes contre les moustiques <i>Aedes aegypti</i> . ....	17
Figure 8. Mécanismes de résistance .....	24
Figure 9. Site cible de l'insecticide synthétisé.....	27
Figure 10. Schéma détaillé de production des lignées isofemelles.....	67
Figure 11. Test de l'adulte. ....	69
Figure 12. Graphique des tests dose-réponse des lignées isofemelles et NO.....	70
Figure 13. Discrimination pour le génotypage de V1016I (A) et F1534C (B).....	72
Figure 14. Histogramme de génotypage de V1016I et F1534C chez les isofemelles et NO ..	74
Figure 15. Courbe de fusion et efficacité de PCR pour des gènes candidats. ....	76
Figure 16. Techniques de détection virale. ....	81
Figure 17. Protocole principal de manipulation entière de la compétence vectorielle. ....	83
Figure 18. Courbe étalon pour la quantification de virus. ....	87

# LISTE DES TABLES

---

<b>Table 1. Résultats des tests en tubes des lignées isofemelles et de la souche sensible NO. ...</b>	<b>70</b>
<b>Table 2. Amorces et sondes utilisées pour le génotypage <i>Kdr</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>Table 3. Génotypage <i>kdr</i> pour les lignées isofemelles et NO : Proportion et génotypes (V / V, V / I, I / I, F / F, F / C et C / C), Fréquence allélique (V%, I%, F% et C%). .....</b>	<b>73</b>
<b>Table 4. Séquences d'oligonucléotides pour PCR .....</b>	<b>75</b>
<b>Table 5. Amorces et sondes utilisées pour la qRT-PCR de CHIKV .....</b>	<b>86</b>



# 1. INTRODUCTION

---

## 1.1. Eléments historiques

### 1.1.1. *Aedes aegypti* : de la domestication à la colonisation mondiale

*Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*) est originaire d'Afrique subsaharienne où sa forme ancestrale était un moustique zoophile selvatique proche de l'*Aedes aegypti formosus* actuel, qui pondait des œufs dans des trous d'arbres et préférerait du sang non-humain (Powell and Tabachnick 2013; Tabachnick 1991). En survivant à la sélection naturelle et au rapprochement des zones d'activité humaine, les moustiques *Aedes aegypti* ont pu coloniser un territoire plus large. L'adaptation au milieu anthropisé a permis aux femelles de pondre dans des containers de stockage d'eau, aux larves de se développer dans des conditions différentes de celles de la forêt, (Tabachnick 1991; Brown et al. 2014).

#### **Encadré 1 : Classification d'*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Classe : Insecta

Ordre : Diptera

Famille : Culicidae

Genre : *Aedes*

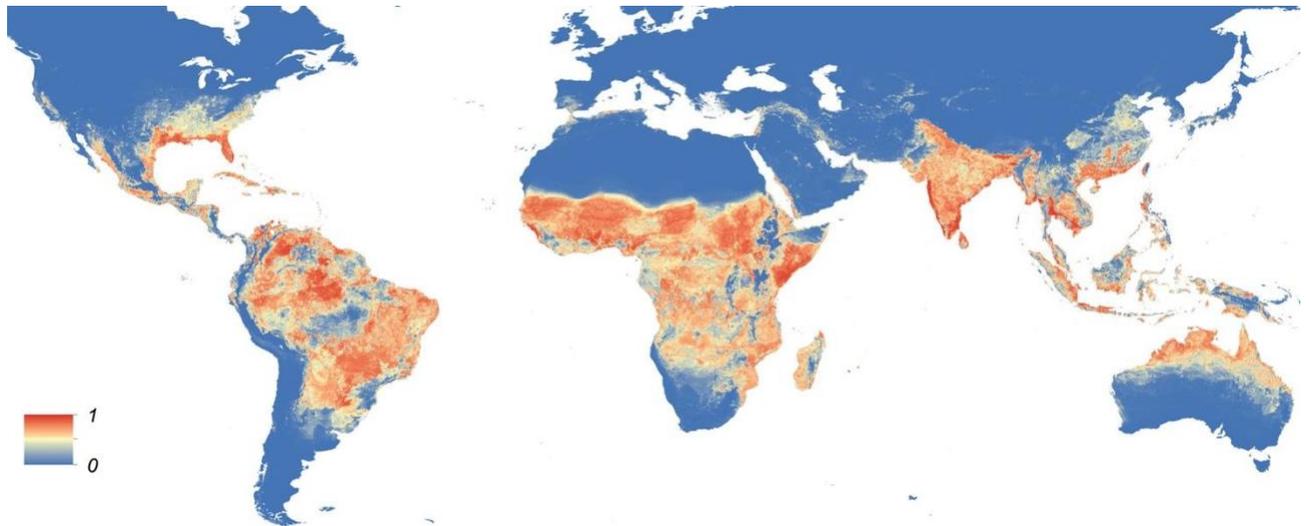
Sous-genre : *Stegomyia*

Espèce : *aegypti*



Il a été émis l'hypothèse qu'*Aedes aegypti* a été importé dans le Nouveau Monde depuis l'Afrique via la traite des esclaves aux 16<sup>ème</sup> -19<sup>ème</sup> siècles (Brown et al. 2014). L'espèce a ensuite été introduite dans la plupart des villes asiatiques, et pendant la Seconde Guerre Mondiale, s'est répandue de l'Asie du Sud-Est à toute la région du Pacifique (Brown et al. 2014). En raison, d'une part, de l'urbanisation croissante, du commerce globalisé, de la migration des populations, de l'utilisation croissante des moyens de transport aérien et du tourisme international et, d'autre part, de la capacité des œufs à survivre en absence d'eau, sa

dissémination s'est accélérée à l'échelle mondiale (L. Philip Lounibos 2002; Gratz, Steffen, and Cocksedge 2000). De nos jours, cette espèce est présente dans toutes les régions tropicales et subtropicales. Et sa distribution s'étend à nouveau dans des régions plus tempérées : Californie, pourtour méditerranéen comme l'Espagne et la Grèce (Figure 1) (Kraemer et al. 2015).



**Figure 1. Carte mondiale de répartition prévisionnelle de *Aedes aegypti*.** La carte représente la probabilité d'occurrence de *Aedes aegypti* de 0 (bleu) à 1 (rouge) (Kraemer et al. 2015).

#### **Encadré 2 : L'Origine du nom *Aedes aegypti* (Christophers, 1960)**

Le nom *aegypti* apparaît pour la première fois en 1757 dans le récit de Hassellquist de ses voyages en Palestine sous la forme de « *Culex (aegypti) articulationibus candidis etc.* » (littéralement « *Culex* (Égypte) articulations blanches »). Dans la dernière édition de ce travail en 1762, édité en respectant la nomenclature de Linnaeus (10<sup>ème</sup> édition de *SYSTEMA NATURAE*, 1758), le nom apparaissant est « *Culex aegypti* ».

La confusion et le manque de coordination concernant les espèces tropicales mènent à ce que presque chaque pays et systématicien utilisent un nom différent pour désigner *Aedes aegypti* comme : *Culex argenteus* (Poiret 1787, Afrique du nord), *Culex calopus* (Meigen 1818, Portugal), *Stegomyia fasciata* (Theobald 1901, Antilles), *Duttonia alboannulis* (Ludlow 1911, Philippines).

Il faudra attendre 1920 quand Dyar propose le nom *aegypti* donné par Linnaeus en 1762, puis suivit très largement par les écrivains américains, pour que le nom *Aedes aegypti* soit finalement accepté d'un commun accord et utilisé par Edwards dans sa révision de *Genera Insectorum* (1932).

### 1.1.2. Emergence du chikungunya

Le mot « chikungunya » provient de la langue Makonde (peuple bantou d'Afrique australe), il signifie « la maladie qui brise les os » ou « maladie de l'homme courbé » et décrit la rigidité des mouvements du corps associée aux symptômes arthralgiques. Le virus chikungunya (CHIKV) a été initialement isolé par Ross pendant l'épidémie de 1953 à Newala en Tanganyika (Tanzanie actuel) (R. W. Ross 1956). Parce que les symptômes cliniques de l'infection au CHIKV sont souvent similaires à ceux de la dengue, et que le virus CHIK circule dans les mêmes régions où le virus de la dengue est endémique, il est possible que de nombreux cas aient été auparavant mal diagnostiqués (Carey 1971).

Entre les années 1960 et 1980, le CHIKV a été isolé dans différents pays de l'Afrique centrale, et du sud par exemple en République centrafricaine, République démocratique du Congo, Ouganda, etc (Powers et al. 2000). Dans la dernière partie du 20<sup>ème</sup> siècle, le virus a été isolé dans d'autres régions de l'Afrique de l'ouest incluant le Sénégal et le Nigeria qui ont vu de nombreuses épidémies (Diallo et al. 1999 ; Tomori, Fagbami, and Fabiyi 1975).

Le CHIKV s'est diffusé de l'Afrique de l'est vers l'Asie depuis 1927, il a été isolé pour la première fois en Asie en 1958 à Bangkok en Thaïlande, il a ensuite été signalé au Cambodge et en Inde de 1961 à 1963 et a continué à circuler dans les autres pays de l'Asie du sud-est, par exemple en Indonésie en 2007, en Chine en 2012, et aux Philippines en 2013 (Weaver and Forrester 2015).

Entre 2004 et 2007, des épidémies ont circulé dans le bassin de l'océan Indien et sur le subcontinent Indien, comprenant l'Inde, l'Indonésie, et de nombreuses îles de l'Océan Indien, le CHIKV à l'origine de ces épidémies provenait de l'émergence grave qui a eu lieu au Kenya en 2004 (Kariuki Njenga et al. 2008).

Le CHIKV continue à circuler pour atteindre de nouvelles destinations, en décembre 2013, des cas autochtones ont été signalés à l'île Saint-Martin, pour devenir rapidement la première épidémie de chikungunya sur le continent américain (Leparc-Goffart et al. 2014). Après s'être rapidement propagé dans la région des Caraïbes, le CHIKV s'est répandu dans tous les pays d'Amérique centrale, la plus grande partie de l'Amérique du sud et plus au nord jusqu'en Floride. Jusqu'à janvier 2015, plus d'un million de cas suspects ont été enregistrés et plus de 25 000 cas confirmés biologiquement ont été signalés dans 42 pays/territoires caribéens d'après les rapports de l'OMS.

## 1.2. Biologie d'*Aedes aegypti*

Les moustiques de l'espèce *Aedes aegypti* (Figure 2) sont des insectes à métamorphose complète (holométaboles), parce que leur cycle de vie est complexe avec des changements de forme et d'habitat. Le développement complet de l'œuf à l'adulte dure de 8 à 10 jours à température tropicale et dépend de conditions environnementales favorables comme la disponibilité nutritionnelle, un volume d'eau suffisant, la température de l'eau, la compétition larvaire (intra ou interspécifique), les conditions physico-chimiques du gîte. Le cycle biologique est composé d'une phase pré-imaginale aquatique et d'une phase aérienne indiquée en Figure 3.



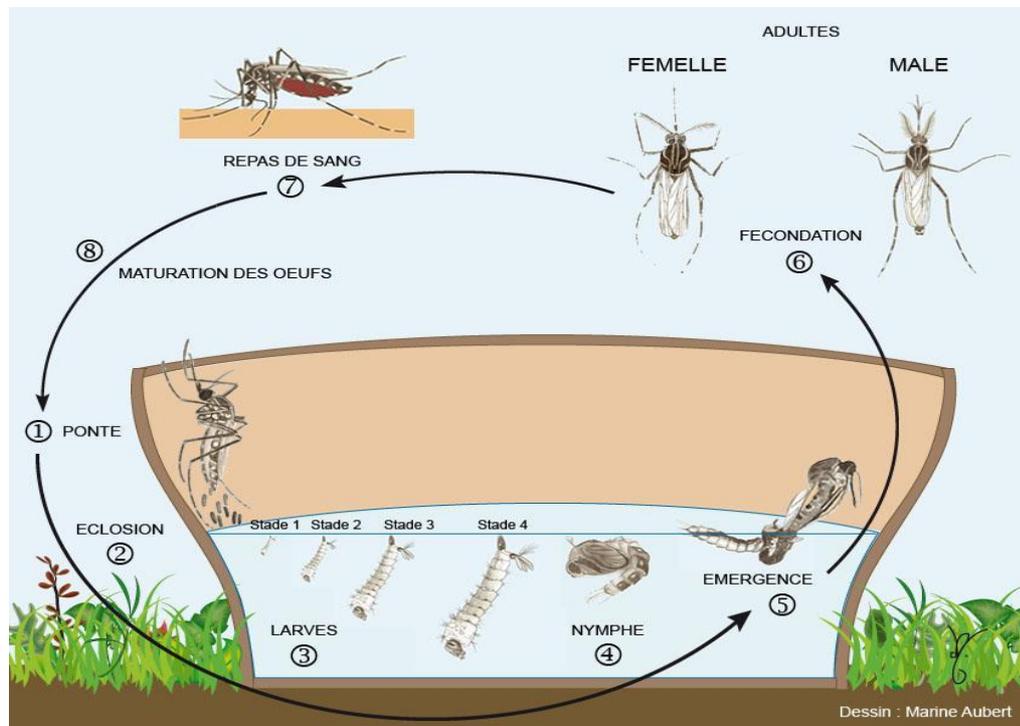
**Figure 2. Femelle prenant un repas sanguin.** La particularité morphologique des adultes *Aedes aegypti* est la marque blanche formant une lyre sur le thorax. Photo par R. Carinci - Institut Pasteur de la Guyane.

### 1.2.1. Phase aquatique

La phase de développement aquatique d'*Aedes aegypti* a lieu dans les gîtes créés par l'homme comme des coupelles de pot de fleurs, des gouttières mal entretenues, des congélateurs abandonnés, des seaux et autres déchets pouvant contenir de l'eau, peu de gîtes naturels ont été rapportés (Mocellin et al. 2009; Bernáth et al. 2008).

Lorsque les œufs résistants à la dessiccation sont à nouveau au contact de l'eau après être parfois restés plusieurs mois desséchés durant la saison défavorable, les larves éclosent. Celles-ci se nourrissent de matières organiques particulières présentes dans le gîte. Le développement larvaire est constitué de quatre stades, chacun séparé d'une mue comme pour tous les insectes holométaboles. Une métamorphose transforme la larve de quatrième stade en nymphe. Ces nymphes ne se nourrissent plus. C'est le stade pendant lequel le corps de l'adulte

aérien se forme. Environ deux jours après, l'adulte nouvellement formé émerge de l'eau après avoir rompu l'enveloppe nymphale ("Mosquito Life-Cycle | Dengue | CDC" n.d.).



**Figure 3. Cycle de vie de *Aedes aegypti*.** Stades immatures en milieu aquatique, et stade adulte en milieu aérien.

### 1.2.2. Phase aérienne

Chez les adultes, les deux sexes se nourrissent de sucres végétaux pour survivre. Une fois accouplés, seules les femelles prennent un repas sanguin pour apporter les éléments nutritifs indispensables à la maturation des œufs, qui prend 2-3 jours. La femelle est considérée comme anthropophile car sa proximité avec l'homme en fait l'hôte idéal. Son activité est diurne dont les pics d'agressivité culminent en début et fin de journée (Carvalho and Moreira 2017). Les femelles passent leurs vies dans ou autour des maisons où elles ont émergé comme adultes, lors de la recherche de l'hôte, on considère que le vol est de courte portée (environ 28-199 mètres, jusqu'à 1000 mètres au maximum) (Harrington et al. 2005). Une femelle prendra aussi un repas fragmenté, piquant plusieurs hôtes pour un seul repas complet de sang ou pour un seul cycle gonotrophique (Harrington et al. 2014; Thomas W. Scott and Takken 2012).

Après ce repas de sang, les femelles vont préférentiellement pondre leurs œufs sur un support solide et humide servant alors de gîte larvaire (Urdaneta-Marquez and Failloux 2011).

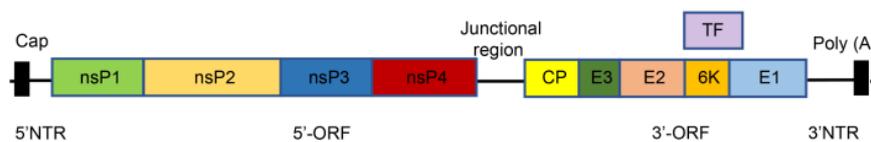
Elles ont souvent un comportement d’oviposition dans de multiples gites, pour éviter la surpopulation dans un même gite où la nutrition des larves est limitée, ou pour minimiser les risques associés aux sites temporaires (Reiter 2007). Un nouveau cycle de développement va se répéter en repassant par la phase aquatique.

## 1.3. Virus du chikungunya

### 1.3.1. Génome du CHIKV

Le CHIKV appartient à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Le génome de CHIKV est composé d’un brin d’ARN positif d’une longueur approximative de 12 kb, composé par : 5’ cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(région junctionale) -C-E3-E2-6K-E1-Poly (A)-3’. Codant 4 protéines non structurales impliquées dans la réplication et la pathogenèse du virus, et 5 protéines structurales qui composent le virion (Figure 4) Le génome est entouré d’une enveloppe des protéines E1 et E2 (Jose, Snyder, and Kuhn 2009; Kielian et al. 2000).

Le virus est endocytosé dans les cellules hôtes, et la nucléocapside est relâchée dans le cytoplasme, tout d’abord les protéines non structurales sont converties pour former une réplicase complexe et convertir les protéines structurales, et finalement tous les composants sont assemblés pour créer de nouveaux virions, qui vont sortir de la cellule hôte pour infecter les cellules adjacentes (An et al. 2017).



**Figure 4. Génome de CHIKV (An et al. 2017).**

### 1.3.2. Lignage du CHIKV

Il existe deux cycles de transmission de virus en Afrique. Le virus circulait initialement dans un cycle enzootique/sylvatique entre les moustiques du genre *Aedes* (comme *Aedes furcifer* et *Aedes africanus*) et les primates non-humains (comme les singes vervets

*Cercopithecus*). Avec le temps, le virus s'est adapté pour circuler dans les zones urbaines lors d'un cycle entre les Hommes et des moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. L'évolution virale est différente entre ces deux cycles de transmission. En dehors de l'Afrique, seul le cycle urbain a pu être observé jusqu'à présent (Volk et al. 2010).

Il existe quatre génotypes de CHIKV d'après l'analyse phylogénétique du gène de la glycoprotéine d'enveloppe E1 et du génome complet, la lignée Ouest-Africaine, la lignée Est / Centre / Sud-Africaine (ECSA), la lignée Asiatique et la lignée de l'Océan Indien, leurs dénominations sont largement associées à leurs positions géographiques (Volk et al. 2010; Weaver and Forrester 2015).



**Figure 5. Carte de distribution géographique des génotypes de CHIKV et du mouvement des épidémies de CHIKV.** Lignées Est/Centrale/Sud-Africaine (ECSA), d'Asie et de l'Océan Indien. Les dates précisent les périodes de l'émergence et de la réémergence à l'échelle mondiale de l'Afrique à l'Inde et à l'Asie du Sud-Est et maintenant des Amériques centrale et du Sud. Les points, les flèches et les années en vert indiquent la lignée Est / Centrale / Sud-Africaine (ECSA), les points, les flèches et les années en rouge indiquent la lignée Asiatique et les points, les flèches et les années en jaune indiquent la lignée de l'Océan Indien (Tsetsarkin, Chen, and Weaver 2016).

Selon les recherches de Volk et al, toutes les lignées partageaient le même ancêtre il y a 500 ans, même si la lignée Ouest-Africaine est proche de la lignée ECSA au niveau géographique, elle s'est individualisée des autres lignées (ECSA et Asiatique) avant 1750 (Volk et al. 2010).

Ensuite, la lignée Asiatique s'est individualisée de la lignée ECSA avant 1927 selon les recherches de Volk, ou 1956 selon Weaver, et continue encore à circuler en Asie du Sud-ouest. Mais le CHIKV s'est maintenu en Asie en étant uniquement associé à un cycle urbain humain-moustique impliquant des moustiques comme *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* (Tsetsarkin et al. 2011).

La lignée de l'Océan Indien a émergé au sein de la lignée ECSA à partir d'environ 2003, elle est originaire de la souche qui circulait pendant l'épidémie de 2004 au Kenya (Est-Africaine). Cette lignée était responsable des épidémies dans le bassin indien qui ont été facilitées par des mutations adaptives, dont une substitution A226V dans la glycoprotéine d'enveloppe E1 avec leur interaction épistatique avec mutation E2-I211T, qui a permis au CHIKV lignée de l'Océan Indien d'utiliser un nouveau vecteur épidémique *Aedes albopictus* (Tsetsarkin, Chen, and Weaver 2016; Tsetsarkin et al. 2007). L'adaptation à *Aedes albopictus* capable de survivre dans des climats plus froids a permis au CHIKV d'étendre largement sa zone géographique de circulation. De 2005 à 2006, 266 000 cas ont été déclarés pour une population de 770 000 à La Réunion (Borgherini et al. 2007). Pour la même raison, le CHIKV s'est propagé en Europe, 205 cas infectés ont été enregistrés entre le 4 juillet et le 27 septembre 2007 en Italie (Rezza et al. 2007).

Le CHIKV responsable des épidémies sur le continent américain entre 2013 et 2015 appartient au génotype asiatique, cette lignée circulait récemment entre la Chine, les Philippines et Yap en Asie du Sud-Est (Lanciotti and Valadere 2014). La probabilité de transmission du chikungunya dans la France du sud est particulièrement élevée à cause du grand nombre de voyageurs viraux revenant de la région des Caraïbes et des conditions climatiques méditerranéennes très favorables à la reproduction des moustiques *Aedes albopictus*, ainsi un grand nombre de cas de chikungunya importé a été enregistré mais aucun cas autochtone n'a été confirmé en Europe pour la lignée Asiatique (Paty et al. 2014; Amraoui and Failloux 2016).

En résumé, bien que l'infection par CHIKV ait été signalée pour la première fois il y a plus d'un demi-siècle, transmis par les moustiques *Aedes*, surtout *Aedes aegypti*, ce virus a été négligé jusqu'à la récente épidémie dévastatrice. Jusqu'en 2017, le chikungunya a été déclaré dans plus de 100 pays et territoires d'Afrique, d'Asie, d'Europe, du Pacifique sud et des Amériques selon l'OMS.

## 1.4. Capacité vectorielle d'*Aedes aegypti*

### 1.4.1. Système vectoriel

Un arthropode vecteur est un arthropode hématophage (il prend un repas de sang) qui permet la transmission biologique et active d'un pathogène d'un hôte vertébré vers un autre hôte vertébré (Rodhain, Bruce-Chwatt, and Perez 1985). Le rôle de vecteur est un système complexe qui fait donc intervenir des hôtes vertébrés, des vecteurs et des pathogènes dans un environnement propice à leur transmission.

Par rapport aux autres espèces de moustiques, *Aedes aegypti* est reconnu pour son caractère plus anthropophile, endophage et endophile, il est présent dans toutes les régions tropicales et subtropicales toute l'année sans saisons indésirables pour son développement (Carvalho and Moreira 2017). Ses œufs sont résistants à la dessiccation et peuvent survivre ainsi pendant une durée de 4 à 6 mois sans éclore, ce qui permet de faciliter la migration par différents moyens de transport sur de longues distances. De plus, le fait que *Aedes aegypti* peut parfois piquer plusieurs hôtes pour un seul repas complet ou pour un seul cycle gonotrophique, va augmenter le risque de la transmission des maladies (Harrington et al. 2014; Thomas W. Scott and Takken 2012). Toutes ces raisons le conduisent à être un bon vecteur d'arbovirus, parmi lesquels se distinguent les virus responsables de la fièvre jaune, de la dengue, du Zika, ou encore du chikungunya, qui nous a intéressé dans cette thèse. Tous ont provoqué des épidémies à l'échelle mondiale et sont considérés comme des grandes menaces à la santé publique par l'OMS.

### **Encadré 3 : Les arboviroses transmises par *Aedes aegypti***

#### **La fièvre jaune :**

Initialement endémique à l'Afrique tropicale, et depuis emportée au Nouveau Monde, devenant ainsi endémique en Amérique du Sud et Centrale, la fièvre jaune a été contrôlée pendant des décennies par une stratégie de vaccination efficace. Le vaccin de la fièvre jaune atténuée 17D fournit une immunité hautement efficace et durable depuis 1937 et est largement utilisé pour les voyageurs et les habitants des zones endémiques d'Amérique du sud et d'Afrique, mais des épidémies surviennent toujours où *Aedes aegypti* est présent (Wilder-Smith 2017). En décembre 2016, le Brésil a signalé la plus grande épidémie de fièvre jaune depuis des décennies. Jusqu'au 31 mai 2017, un total de 3 240 cas suspects a été signalé, incluant 435 morts (Fischer et al. 2017).

#### **La dengue :**

Les premières épidémies ont été signalées en 1779-1780 en Asie, en Afrique et en Amérique du nord ; la présence quasi simultanée de foyers sur trois continents indique que ces virus et leur moustique vecteur ont été distribués dans les régions tropicales mondiales pendant plus de 200 ans (Heilman et al. 2014). Elle est devenue l'une des plus sévères maladies infantiles en provoquant une haute mortalité dans l'Asie du sud après la seconde guerre mondiale. Aujourd'hui, tous les pays d'Asie du sud sont touchés par les épidémies de dengue, et en Amérique du sud, dont les épisodes sont devenus plus fréquents, plus intenses et plus sévères depuis une dizaine d'années et impliquant à tour de rôle les 4 sérotypes du virus (Clark 1995). Selon l'OMS, entre 284 et 528 millions d'individus contractent la dengue chaque année, et environ 12 500 d'entre eux en meurent ("OMS | Dengue et Dengue Sévère" n.d.).

#### **Le Zika :**

Découvert en Ouganda en 1947, le ZIKV a émergé en Asie après 1960. Sa première apparition majeure a eu lieu à Yap Island en 2007, il s'est propagé à la Polynésie française et aux autres îles du Pacifique entre 2013 et 2014, par la suite, le ZIKV a été détecté dans les Caraïbes, et a atteint l'Amérique latine. Entre 2013 et 2015 plus de 30 pays américains ont été atteints, et l'Amérique du nord a été touchée en 2016. Ainsi, à l'exception de l'Europe et de l'Antarctique, le ZIKV a circulé sur tous les continents (Boyer et al. 2018). *Aedes aegypti* a été identifié comme vecteur principal du Zika au sein des moustiques collectés sur le terrain, ce qui a été aussi prouvé expérimentalement en conditions de laboratoire (Ferreira-de-Brito et al. 2016; Richard, Paoaafaite, and Cao-Lormeau 2016). Outre des symptômes bénins, le virus Zika peut provoquer des troubles neurologiques tels que le syndrome de Guillain-Barré chez les nouveau-nés et la microcéphalie (Cao-Lormeau et al. 2016; Cauchemez et al. 2016). Zika a ensuite été déclaré comme une menace sanitaire émergente par l'OMS.

## 1.4.2. Evaluation de la capacité vectorielle

La capacité d'*Aedes aegypti* à transmettre les arbovirus est déterminée à la fois par des facteurs intrinsèques et extrinsèques, tels que le génotype des vecteurs et des virus, le comportement trophique, les traits d'histoire de vie des vecteurs et les facteurs environnementaux en particulier la température (Tabachnick 2013).

Epidémiologiquement, la capacité vectorielle (CV) peut être estimée en utilisant l'équation suivante dérivée du travail de Ross et Macdonald et des autres entomologistes médicaux, en mesurant le nombre moyen de piqures potentiellement infectieuses qu'un hôte vertébré recevra par jour parmi tous les vecteurs qui se nourrissent sur lui (Smith et al. 2012; Severson and Behura 2016; Kramer and Ciota 2015).

$$VC = mbp^na^2 / (-\ln p)$$

Où m = densité de vecteurs (par hôte), p = taux de survie du vecteur (par jour), a = taux de piqure, n = période d'incubation extrinsèque (PIE), and b = compétence vectorielle (Smith et al. 2012).

Selon cette équation, parmi ces cinq paramètres, le taux de piqure (a), la longévité du moustique (p) et la PIE (n) peuvent jouer des rôles plus importants que les autres facteurs comme la densité (m) et la compétence vectorielle (b) (Leon Philip Lounibos and Kramer 2016).

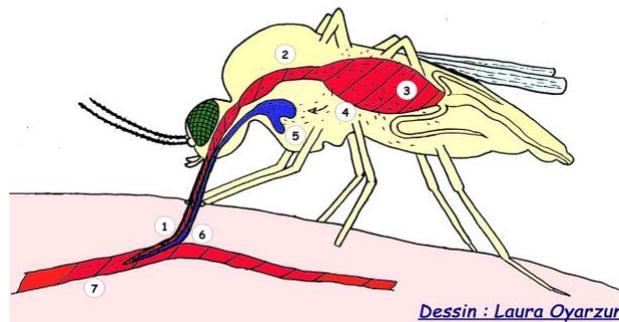
**Taux de piqure (a)** qui reflète le contact direct entre le vecteur et son hôte, **taux de survie (p)** qui est un trait d'histoire de vie important **avec densité de populations (m)**, ces trois paramètres pris en compte pour calculer la capacité vectorielle sont largement liés à l'environnement du site larvaire, incluant la température, la nourriture et la communauté du microbiome etc., ces facteurs peuvent influencer la taille corporelle, le temps de développement, le taux de survie larvaire et nymphaire, la productivité des femelles et en fin la densité de la population. Il a été démontré que le taux de piqure s'associe positivement avec la température et négativement avec la taille chez les moustiques venant de Thaïlande (T. W. Scott et al. 2000). La petite taille constitue plutôt un inconvénient pour trouver le repas de sang (Takken, Klowden, and Chambers 1998). Ainsi tous les facteurs qui peuvent influencer les traits d'histoire de vie et le comportement des moustiques peuvent finalement jouer des rôles indirects sur leur capacité vectorielle.

**Période d'incubation extrinsèque (n) :** le temps requis pour qu'un moustique sensible devienne compétent pour transmettre oralement un virus à un autre hôte, y compris le temps de l'ingestion d'un repas de sang infecté, avec le temps nécessaire au virus pour se multiplier et se propager dans le corps du moustique et enfin se présenter dans sa salive (Black et al. 2002). Par exemple, le moustique *Aedes aegypti* a besoin d'une période d'incubation très courte dans la transmission du CHIKV (dès 2 jours après le repas infectieux) par apport à la dengue et au Zika (Dubrulle et al. 2009).

La température d'incubation peut influencer non seulement le développement du moustique immature, mais aussi la période d'incubation extrinsèque. Par exemple, la durée de vie de *Aedes aegypti* infecté par DENV-2 a pu être raccourcie en incubant à une température de 30°C au lieu de 26°C, afin d'influencer sa compétence (Christofferson and Mores 2016). Au contraire, *Aedes aegypti* infecté par CHIKV a montré des taux d'infection et de dissémination plus élevés à 32°C qu'à 26°C (Mbaika et al. 2016).

**Compétence vectorielle (b) :** la compétence vectorielle utilisée pour décrire statistiquement la propension d'un moustique à servir de vecteur de maladie quel que soit le comportement de l'hôte et les facteurs environnementaux (Beerntsen, James, and Christensen 2000).

Plus précisément, une femelle moustique prend un repas sanguin sur un individu malade, elle ingère simultanément le virus risquant ainsi d'être infectée. Le virus pourra se multiplier dans l'intestin moyen et traverser sa barrière pour se propager dans le corps du moustique, jusqu'à s'étendre aux glandes salivaires (Figure 6). Pour assurer le développement des différentes pontes, la femelle infectée doit prendre des repas de sang sur plusieurs hôtes humains. Pendant la prise de sang, le virus sécrété dans sa salive va être injecté dans les hôtes successifs. Ce phénomène est répété environ 4 à 5 jusqu'à la fin de sa vie (Franz et al. 2015).



**Figure 6. Cycle de transmission virale chez le moustique.** 1) La femelle moustique prend un repas sanguin sur un individu malade ; 2) La femelle ingère simultanément le virus risquant ainsi d'être infectée ; 3) Le virus se multiplie dans l'intestin moyen ; 4) Le virus traverse la barrière de l'intestin moyen pour se propager dans le corps ; 5) Le virus s'étend et se multiplie dans les glandes salivaires ; 6) Pendant la prochaine prise de sang, la femelle infectée sécrète le virus dans sa salive ; 7) La femelle réusit à injecter le virus à un autre hôte qui a le potentiel d'être malade.

### 1.4.3. Etude de la compétence vectorielle de *Aedes aegypti*

La compétence vectorielle est généralement évaluée expérimentalement avec des méthodes statistiques en laboratoire, les paramètres (taux d'infection, taux de dissémination et taux de transmission) servent à définir la compétence vectorielle des moustiques (Kramer and Ciota 2015). Le taux d'infection correspond au pourcentage de moustiques ayant un intestin moyen positif par rapport au total de moustiques testés. Le taux de dissémination correspond au pourcentage de moustiques ayant une tête positive parmi ceux qui ont un intestin moyen positif. Le taux de transmission correspond au pourcentage de moustiques ayant une salive positive parmi ceux qui ont une tête positive. Ce processus complexe était connu pour être affecté par une variété de facteurs externes et internes (Beerntsen, James, and Christensen 2000).

Tout d'abord, les populations évoluent différemment dans différentes positions géographiques, qui peuvent provoquer naturellement des variabilités dans la compétence vectorielle. Il a été prouvé que 22 populations des moustiques *Aedes aegypti* collectées dans 10 pays d'Amérique du nord, d'Amérique centrale et d'Amérique du sud, sont très sensibles au CHIKV (> 95% dissémination sept jours après le repas infectieux), les résultats de taux de transmission étant significativement variables quand ils étaient infectés par la même souche

virale isolée de La Réunion (de 13,3% à 96,7% 7 jours après le repas infectieux, et de 6,7% à 85,2% 10 jours après le repas infectieux) dans des expérimentations conduites dans les mêmes conditions (Vega-Rúa et al. 2014).

Ensuite, concernant la défense immunitaire, les moustiques ne possèdent pas la combinaison de systèmes immunitaires innés et adaptatifs comme c'est le cas pour les mammifères, ils doivent donc compter uniquement sur leur système immunitaire inné pour les défendre de l'attaque des arbovirus. Ainsi les interactions entre la réplication virale et le système de défense immunitaire produisent un résultat qui peut influencer la transmission ultérieure du virus. L'interférence ARN (ARNi) constitue un composant majeur de la réponse immunitaire innée du moustique, qui est aussi médiée par les voies de signalisation Toll, immunodéficiences (IMD) et JAK / STAT qui constituent des systèmes immunitaires très importants chez les moustiques (Sim, Jupatanakul, and Dimopoulos 2014). La réponse ARNi est déclenchée par l'ARN double brin, elle se produit dans le cytoplasme à la suite d'une infection par le virus à ARN positif, conduisant à la production de petits ARN interférents (siRNA). Ces siRNA jouent un rôle dans la dégradation de l'ARNm viral, et par conséquent inhibent la réplication du virus. D'abord il a été montré que ARNi joue un rôle important sur la transmission de DENV-2 chez *Aedes aegypti* (Sánchez-Vargas et al. 2009). Plus tard, une recherche similaire a présenté que l'ARNi joue aussi un rôle essentiel dans la limitation de la réplication de CHIKV à la fois en culture cellulaire et chez *Aedes aegypti* directement (McFarlane et al. 2014), en plus l'ARNi peut jouer un rôle sur la compétence vectorielle du moustique.

En dehors de l'ARNi, il existe d'autres protéines immunitaires publiées qui peuvent également influencer la compétence vectorielle des moustiques. Plusieurs recherches ont montré qu'une fois la trypsine dans l'intestin moyen atténuée par la méthode RNAi ou bloquée par l'inhibiteur de trypsine mis dans le repas sanguin, le taux d'infection dans l'intestin moyen augmente significativement. Ces résultats suggèrent que certaines sérine protéases de l'intestin moyen peuvent limiter l'infection du DENV-2 chez *Aedes aegypti* (Molina-Cruz et al. 2005; Brackney, Foy, and Olson 2008). La recherche suivante a montré la présence de l'inhibiteur de la trypsine dans la souche réfractaire du moustique *Aedes aegypti* peut jouer de rôle dans l'infection de virus Dengue-2 (Barón et al. 2010). De plus, il a été aussi démontré que la lectine de type C impliquée dans l'immunité du moustique facilite l'infection du virus du Nil occidental chez les moustiques *Culex* (Cheng et al. 2010). Enfin, dans le cas de co-infection avec

*Wolbachia*, des études chez *Aedes aegypti* ont suggéré que *Wolbachia* interfère avec la réplication virale chez le moustique en stimulant la réponse immune de celui-ci, incluant l'activation de Toll pathway, ou qu'elle peut rivaliser avec les virus pour les composants cellulaires nécessaires à son développement (Pan et al. 2012; Caragata, Dutra, and Moreira 2016).

En plus des facteurs décrits précédemment, la charge virale dans le repas de sang et l'âge du moustique utilisé doivent être contrôlés, car un faible titre peut ne pas entraîner une dissémination réussie aux glandes salivaires et à la salive (RICHARDS et al. 2012). Pour réaliser une infection complète, les moustiques doivent survivre plus longtemps que la période d'incubation extrinsèque pour que les virus puissent se développer, puis infecter un autre être humain. Il a déjà été montré que les vieux moustiques *Aedes aegypti* (l'âge de quatre semaines) peuvent être des vecteurs inefficaces en raison de la faible compétence vectorielle et de la mortalité élevée à transmettre le nématode filarial *Brugia malayi* (Ariani et al. 2015).

Il a été montré que les niveaux de compétition élevés intra ou inter spécifique au stade larvaire peuvent augmenter la compétence vectorielle, qui semble résulter d'une réduction des effets « barrières » (morphologiques ou physiologiques) à l'infection et à la dissémination chez les adultes (Alto et al. 2008). Ensuite, les bactéries symbiotiques portant des gènes anti-viraux sont considérées pouvoir diminuer aussi la compétence vectorielle du moustique (Beard et al. 1993). Il existe chez les moustiques un large éventail de virus spécifiques aux insectes au sein des familles des *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Mesoniviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae* et nouvellement reconnue des *Negevirus* (Vasilakis and Tesh 2015). Certaines études suggèrent que la présence de virus spécifiques aux insectes pourrait inhiber la réplication d'un arbovirus, modifiant ainsi la compétence vectorielle du moustique (Bolling et al. 2015).

Pour mieux comprendre l'écologie et l'émergence des arbovirus, il est essentiel de se concentrer sur la capacité vectorielle et non seulement sur la compétence vectorielle. En outre, il est important d'élucider les facteurs des interactions complexes pour trouver de nouvelles approches de contrôle.

## 1.5. Lutte anti-vectorielle et développement de la résistance aux insecticides

### 1.5.1. Stratégie de contrôle d'*Aedes aegypti*

En absence du vaccin efficace pour contrôler directement la propagation du CHIKV, ainsi que de mettre en place une surveillance stricte des possibilités de cas transportés, et enfin d'exercer un contrôle sur les moustiques vecteurs.

La stratégie mise en œuvre pour la prévention et le contrôle revêt 4 aspects principaux (Achee et al. 2015) (Figure 7) :

- 1) Réduire la densité vectorielle ;
- 2) Limiter le contact homme-vecteur ;
- 3) Réduire la longévité des femelles vectrices ;
- 4) Modifier la compétence vectorielle.

La lutte est un travail compliqué qui doit tenir compte de la biologie et du comportement de chaque espèce, de l'intensité de la transmission des pathogènes, de la nature des mécanismes et niveaux de résistance aux insecticides. Compte tenu des caractéristiques propres à *Aedes aegypti*, plusieurs méthodes décrites ci-après sont mises en œuvre seules ou en combinaison lors des épidémies ou en période inter-épidémiques.

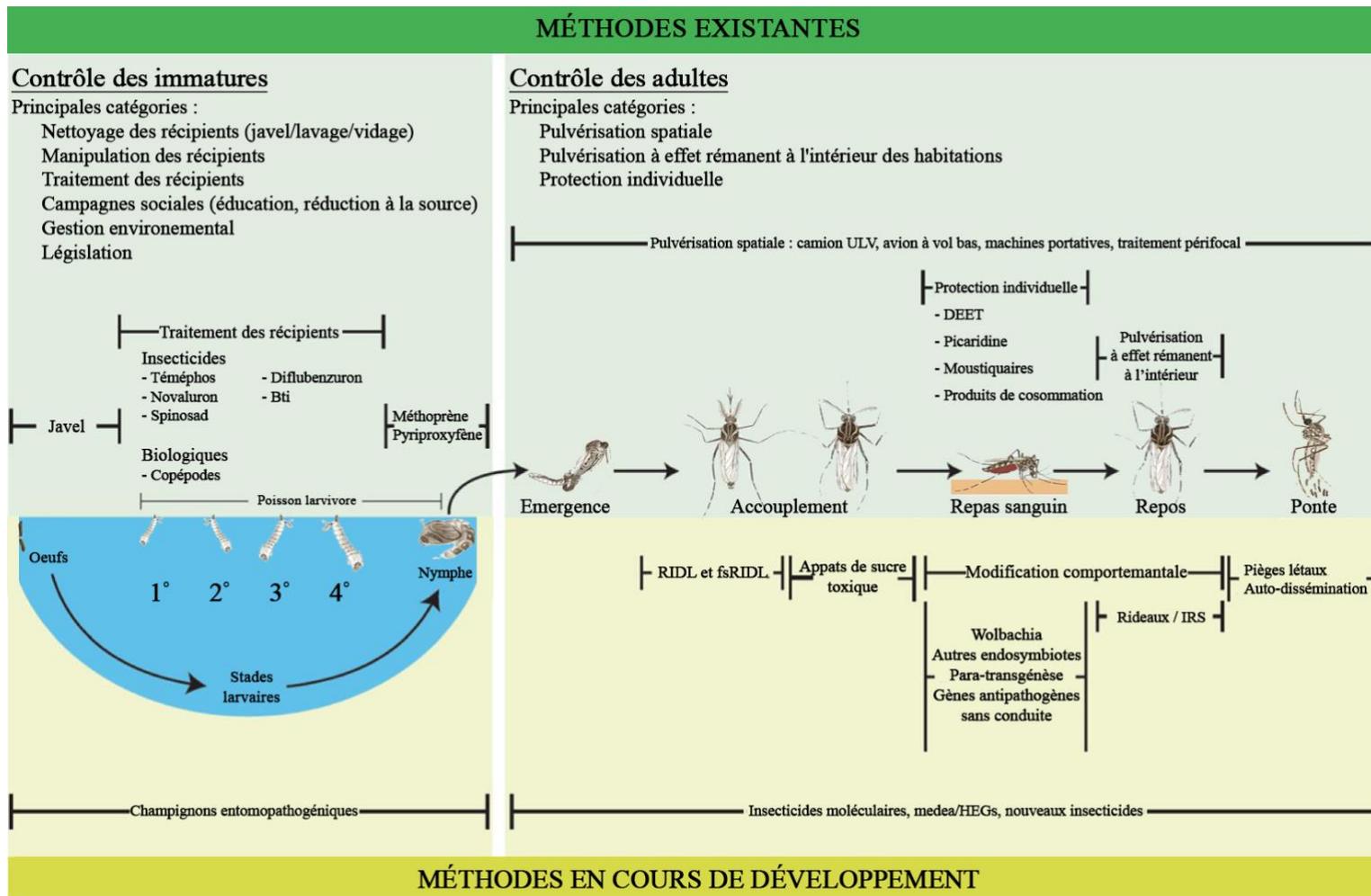


Figure 7. Méthodes contre les moustiques *Aedes aegypti*. Réalisé à partir du dessin de Achee et al. (Achee et al. 2015).

### 1.5.1.1. La lutte mécanique

Elle consiste pour ce qui est des stades pré-imaginaux (œufs, larves et nymphes), à éliminer ou neutraliser physiquement tous les sites d'oviposition potentiels, comme les pneus, les pots de fleurs, les soucoupes pour pots de fleur, et plus généralement les récipients de toutes tailles et de toutes sortes, que les collections d'eau soient intentionnelles (abreuvoirs d'animaux, réserves d'eau, seaux à boutures...) ou dues à la négligence (détritrus, carcasses de voitures, gouttières mal entretenues...). Ce type d'action est souvent conduit par les pouvoirs publics pour un effet immédiat, tandis que des campagnes d'éducation sanitaire encouragent les populations à faire de même, et à couvrir les réservoirs d'eau à usage domestique afin d'en prévenir l'accès aux femelles gravides. Certains produits, entre autres à base de silicone, peuvent former des films monomoléculaires de surface, provoquant la mort des larves et des nymphes par asphyxie.

Pour ce qui est des stades imaginaux, des pièges létaux pouvant être mis en œuvre autour des cas en période d'épidémie ont été conçus et implémentés pour capturer les adultes (Barrera et al. 2017).

### 1.5.1.2. La lutte biologique

Différents produits à base d'agents biologiques, en particulier des toxines bactériennes, ont été conçus pour éliminer les larves de moustiques. La bactérie *Bacillus thuringiensis var israelensis* (*Bti*) seule ou en combinaison avec *Bacillus sphaericus* est utilisée actuellement pour réduire le nombre d'*Aedes* immatures à court terme. Les toxines synthétisées par le *Bti* peuvent détruire les cellules de l'intestin moyen des larves de moustiques, qui meurent en 24 à 48 heures (Boyce et al. 2013). La toxicité très faible de ces produits sur l'homme et l'environnement constitue leur principal avantage. Par contre, *Bti* est efficace sur les jeunes larves, mais moins sur les larves de quatrième stade, et pas du tout sur les nymphes. De plus, l'efficacité dépend aussi de conditions environnementales comme la profondeur des gîtes, la température de l'eau, l'ensoleillement et la densité de matière organique. Enfin, à cause de la faible rémanence, les traitements doivent être réguliers et permanents et le coût est considérable (Kroeger et al. 2013).

Les prédateurs peuvent constituer un outil écologique, efficace et auto-suffisant pour le contrôle des larves dans des situations particulières. Certains poissons larvivores, particulièrement ceux appartenant aux genres *Gambusia* et *Poecilia* peuvent présenter un

intérêt dans cette optique (Chandra et al. 2008; Kant et al. 2013). Des crustacés de l'ordre des copépodes (*Mesocyclops spp.*) ont également fait l'objet d'essais de terrain prometteurs (Lazaro et al. 2015). Récemment les huiles essentielles et les extraits de feuilles, graines et fruits de certaines plantes commencent à devenir de nouvelles alternatives aux larvicides à cause de leur nature écologique et de leur prix abordable (Dias and Moraes 2014; Ghosh, Chowdhury, and Chandra 2012).

### 1.5.1.3. La lutte chimique

Les mesures de lutte antivectorielle chimique se basent soit sur des traitements de surface à effet rémanent soit sur des pulvérisations spatiales. La pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur ou extérieur des habitations correspond à l'application d'insecticides à effets longue durée sur les murs des habitations, des toits, et des abris pour animaux domestiques dans une zone donnée, de manière à tuer les moustiques adultes vecteurs qui se reposent sur ces surfaces. La pulvérisation spatiale est un moyen de lutte qui est généralement recommandé dans les situations d'urgence afin d'enrayer une épidémie en cours ou dans le cas d'espèces entraînant de fortes nuisances pour les populations humaines. Elle a pour objectif la destruction massive et rapide de la population adulte de vecteurs. Un équipement spécial est généralement utilisé, tels que des brumisateurs motorisés portés sur le dos ou des nébulisateurs thermiques avec bretelle d'épaule, des générateurs d'aérosols montés sur véhicule ou aéronef. Les pulvérisations spatiales peuvent également se faire au moyen de générateurs de brouillard thermique ou froid ou encore sous volume ultrafaible (Mount 1998). Une autre méthode courante d'utilisation est l'imprégnation des vêtements et des tissus (moustiquaires) par des insecticides chimiques, souvent par deltaméthrine. Les tissus imprégnés peuvent être installés sur les portes et fenêtres des maisons, des écoles et des établissements de santé. Cette méthode vise à prévenir les piqûres de moustiques et à réduire le recours à des répulsifs conventionnels (McCann et al. 2017).

Depuis le développement des insecticides synthétiques au cours du siècle dernier, cette stratégie est devenue la mesure la plus courante pour le contrôle des moustiques. Elle inclut l'application de larvicides et d'adulticides. Plus de 95 % des insecticides visant les moustiques sont des neurotoxiques perturbant de diverses façons la propagation de l'influx nerveux. Au terme de leur action, l'insecte meurt de paralysie. Ils agissent essentiellement par contact et inhalation. Les principaux obstacles sont les problèmes de toxicité pour les organismes non-

cibles, et les phénomènes de résistances observés de plus en plus fréquemment (Moyes et al. 2017).

On compte à l'heure actuelle six classes de composés insecticides organiques globalement utilisés dans le cadre de la lutte contre les moustiques, organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes, pyrroles et phénylpyrazoles.

Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) est le premier en date et le plus important représentant de la famille des **organochlorés**, agissant essentiellement sur les canaux sodium/potassium et provoquant un rapide « effet choc » (Knock-Down) (Dong et al. 2014). Ses propriétés insecticides ont été découvertes par le chimiste suisse Muller en 1939, et à partir de 1942, il est produit industriellement et utilisé à grande échelle pour le contrôle des nuisibles en agriculture, et avec un grand succès dans la lutte contre le paludisme. Ses effets néfastes sur l'environnement ont conduit à son interdiction dans la plupart des pays dans les années 1970. Cependant, du fait de son efficacité et de son faible coût, et sous réserve d'une utilisation très ciblée, il a été réhabilité par l'OMS comme la molécule de choix pour le contrôle de la malaria en Afrique (Sadasivaiah, Tozan, and Breman 2007).

Les **organophosphorés** et les **carbamates** sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase qui agissent en se fixant sur ses récepteurs et perturbent le transit de l'influx nerveux (Essandoh, Yawson, and Weetman 2013). En 1942, le pyrophosphate de tetraéthyle (TEPP) a été synthétisé par le scientifique allemand Schrader, ainsi les insecticides organophosphorés, moins rémanents que les organochlorés, sont devenus rapidement les insecticides les plus utilisés. Pendant les trente dernières années, le téméphos (organophosphoré) a été largement utilisé pour lutter contre les larves d'*Aedes aegypti*. L'apparition de résistance au téméphos chez certaines populations a entraîné un frein de son efficacité, et depuis récemment, l'utilisation de ce larvicide n'est plus autorisée pour la démoustication en Europe (Goindin et al. 2017). Il en est de même du malathion depuis 2011, jusqu'à récemment largement utilisé contre les adultes.

En 1960, les **carbamates** sont apparus et ont été dans un premier temps considérés comme ayant une plus courte durée de vie et une toxicité moindre comparé à leurs prédécesseurs organophosphorés. Cependant, ils ont à l'heure actuelle peu d'applications en lutte anti-vectorielle.

Dix ans plus tard, la famille des **pyréthrinoïdes** a été créée en utilisant comme base les molécules naturelles d'une plante de la famille des astéracées (ou composées), le pyrèthre, dont

les propriétés insecticides étaient connues depuis l'antiquité. Les molécules appartenant à cette famille présentent un mode d'action similaire à celui du DDT en perturbant l'ouverture de certains canaux ioniques, notamment le canal sodium (Dong et al. 2014). En raison de leur haute efficacité et de leur faible toxicité pour l'environnement et l'homme, ces produits ont été recommandés par l'OMS pour la plupart des actions de contrôle des moustiques vecteurs de maladies au stade adulte (Soderlund 2012). Cependant, leur toxicité sur la plupart des organismes aquatiques interdit leur utilisation comme larvicides. Parmi les molécules les plus utilisées, citons la perméthrine, la deltaméthrine, la tetraméthrine. L'apparition de nombreux phénomènes de résistance contre ces composés oblige à reconsidérer leur utilisation dans nombre de situations.

Le chlorfénapyr est un nouvel insecticide de la famille des **pyrroles** agissant sur des cibles différentes. Il interfère avec la production d'ATP, entraînant du fait des pertes d'énergie un dysfonctionnement cellulaire conduisant à la mort de l'insecte. Ce produit a été approuvé récemment par l'OMS, qui a montré son potentiel afin d'améliorer le contrôle des moustiques résistants aux insecticides pyréthrinoïdes (Ngufor et al. 2016).

L'insecticide systémique **phénylpyrazole** fipronil, ciblant le neurotransmetteur acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), s'est développé rapidement sur le marché des insecticides du fait de ses avantages physicochimiques sur les générations précédentes d'insecticides comme les organophosphorés, carbamates ou pyréthrinoïdes (Simon-Delso et al. 2015).

#### 1.5.1.4. La stratégie de contrôle génétique

Le lâcher de moustiques génétiquement modifiés a été envisagé comme une stratégie de lutte anti-vectorielle alternative prometteuse. Deux méthodes ont été développées, l'une visant, par le lâcher de moustiques rendus réfractaires à l'infection par génie génétique, à remplacer la population du vecteur ciblé par une population de moustiques de la même espèce mais sans compétence vectorielle. L'autre approche relève de la Technique de l'Insecte Stérile (TIS). Elle consiste à relâcher des moustiques mâles portant un gène létal associé à un promoteur spécifique aux femelles, ceci afin de supprimer la population du moustique ciblé (Kean et al. 2015 ; Winskill et al. 2014). Le contrôle génétique fonctionne avec une certaine efficacité mais n'a été testé que sur une échelle relativement petite (Harris et al, 2012). Par ailleurs, il reste des problèmes significatifs qui doivent être solutionnés avant d'utiliser ces techniques à grande échelle.

#### 1.5.1.5. Le contrôle paratransgénèse

Le lâcher de moustiques porteurs de la bactérie endosymbiote *Wolbachia* est l'exemple le plus approprié et réussi, parce que la présence de cette bactérie peut interférer dans la réplication de virus pathogènes chez les populations infectées, et au même moment provoquer une descendance stérile par un système d'incompatibilité cytoplasmique (Hoffmann et al. 2014). Après de tels lâchers, un taux d'infection remarquablement stable dans les populations naturelles a été rapporté dans le nord de l'Australie, au Vietnam, au Brésil et en Colombie (Weaver et al. 2017).

### **Encadré 5 : La lutte intégrée pour le contrôle des moustiques *Aedes aegypti***

*Aedes aegypti* est un moustique très anthropophile et endophile, qui pond dans les gîtes de préférence artificiels contenant une eau peu polluée. C'est une espèce diurne dont les pics d'agressivité se concentrent à l'aube et au crépuscule. Pour le combattre efficacement, il faut combiner la force institutionnelle et l'initiative individuelle. Parce qu'il n'existe pas d'insecticides ou de stratégie parfaits, il faut maintenir une surveillance pérenne de la densité vectorielle, réagir rapidement et pulvériser ou épandre au bon moment. Les étapes principales sont : réduire les densités agressives en éliminant les gîtes de ponte et de vie de larves, et tuer les adultes par aspersions spatiales et pièges létaux. Rechercher et obtenir la collaboration de la communauté est aussi essentiel.

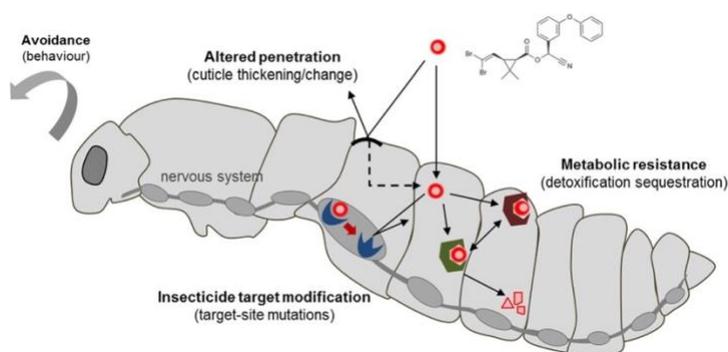
## 1.5.2. Résistance aux insecticides chez les moustiques

L'épandage massif d'insecticides a fait apparaître une pression évolutive induisant des résistances de plus en plus sévères. Cette évolution de la résistance a été une combinaison erratique de mutations, ainsi sujette à la sélection naturelle conduisant à une architecture génétique complexe (Labbé et al. 2007). A partir de 1952, la résistance au DDT commence à être signalée chez les moustiques *Aedes* et *Culex* en Californie (Gjullin and Peters 1952). Actuellement les pyréthrinoïdes constituent la classe recommandée à l'utilisation par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur MILDs (moustiquaires imprégnées d'insecticide longue durée) pour prévenir la malaria en Afrique, mais parallèlement la résistance aux pyrethrinoïdes devient une menace grandissante (Thomas and Read 2016).

### **Encadré 6 : Résistance aux insecticides**

« Un changement héréditaire dans la sensibilité d'une population de nuisibles qui est reflété par l'échec répété d'un produit à atteindre le niveau de contrôle attendu quand utilisé selon les recommandations fournies sur l'étiquette pour cette espèce de nuisibles » -- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee)

Quatre types de mécanismes sont principalement impliqués dans la résistance aux insecticides : résistance comportementale, résistance à la pénétration, insensibilité du site cible, et résistance métabolique (Figure 8). Parmi eux, les récentes études pour les deux dernières résistances sont plus avancées, détaillées et complètes.



**Figure 8. Mécanismes de résistance** (Corbel et al. 2017).

### 1.5.2.1. Résistance comportementale

L'évitement comportemental (dissuasion) est défini comme la capacité d'un moustique à s'éloigner (s'échapper) d'une zone traitée par un insecticide, souvent sans conséquence létale. Ce type de réponse peut être subdivisé en une excitation par contact direct « irritabilité de contact » et une « répulsion spatiale » sans contact. Le terme « irritabilité de contact » implique qu'un moustique quitte une zone traitée avec un insecticide seulement après un contact physique, alors que la « répulsion spatiale » signifie que le moustique s'éloigne de la zone traitée sans contact direct (Grieco et al. 2007). De plus, certains produits chimiques, comme le DEET, peuvent déclencher une quatrième action en masquant / bloquant efficacement la présence d'un hôte par l'inhibition des récepteurs activés par les odeurs (olfactifs) (DeGennaro 2015).

Néanmoins, sous la pression intensive d'insecticides, les moustiques vont s'adapter ou perdre la sensibilité pour ces produits chimiques, ce qui peut influencer l'efficacité du contrôle vectoriel (Chareonviriyaphap et al. 1997). De plus selon Trapido (1954), les moustiques *Anopheles albimanus* à Panama étaient possiblement résistants au DDT en raison de leur changement de comportement plutôt que d'un changement dans la toxicité intrinsèque (Trapido 1954).

Dans le procédé récent de contrôle vectoriel, en raison de l'utilisation popularisée de mesures de contrôle vectoriel intérieur à long terme basées sur les insecticides, comme les moustiquaires de lit imprégnées d'insecticide et la pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent, une résistance comportementale incluant stimulus-indépendant et stimulus-dépendant peut être provoquée (Porciani et al. 2017). Le vecteur a modifié son comportement intrinsèque (niveau d'anthropophilie ou taux horaire d'activité de pique) pour limiter tout contact avec les molécules insecticides principales, résultant en une diminution de leur efficacité et de l'activité de recherche de l'hôte (Diop et al. 2015; Moiroux et al. 2012; Yohannes and Boelee 2012; Gatton et al. 2013).

Cependant le mécanisme de résistance comportementale était généralement compliqué à étudier car lié à d'autres facteurs comme l'attraction de l'hôte ou la collaboration avec d'autres mécanismes de résistance (Boonyuan et al. 2017). Selon Lockwood et al, l'évolution de la résistance aux insecticides est plus encline à une co-évaluation des rôles de physiologie

et de comportement (Lockwood, Sparks, and Story 1984). Un ou plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance physiologique, y compris la réduction du taux d'absorption des molécules toxiques, l'altération des récepteurs nerveux du site cible ; l'augmentation de la détoxification enzymatique.

### 1.5.2.2. Résistance cuticulaire

Pour réussir leur mission insecticide, les molécules toxiques doivent tout d'abord traverser l'exosquelette du moustique, particulièrement la cuticule pour atteindre le site cible. Afin de survivre, les moustiques ont développé un mécanisme qui permet de réduire la pénétration du composé insecticide. Les résultats de Wood et al ont montrés que les femelles *An. funestus* tolérantes ou résistantes aux pyréthriinoïdes ont vraisemblablement des cuticules plus épaisses que les femelles moins tolérantes ou sensibles (Wood et al. 2010).

Par ailleurs, des différences significatives d'expression de gènes codant pour des protéines cuticulaires ont été trouvées entre des *Anopheles gambiae* du Kenya sensibles et résistantes à la deltaméthrine (Bonizzoni et al. 2012) mais aussi chez des *Cx. pipiens* d'Asie du sud (Fang et al. 2015).

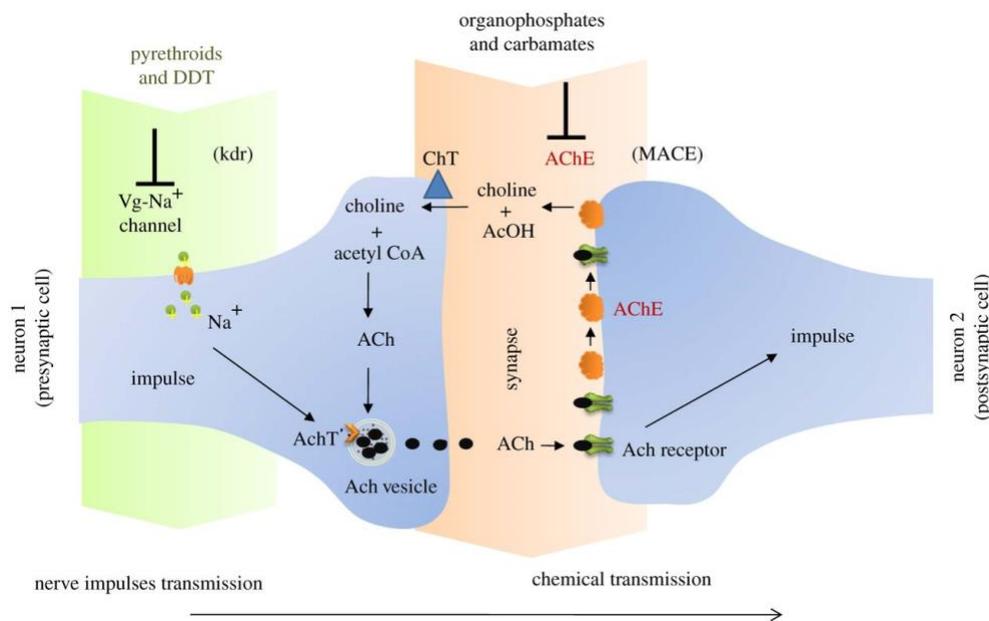
Plus récemment, des études ont démontré la corrélation entre la résistance cuticulaire et la résistance métabolique, en montrant que certains gènes de détoxification venant de la famille CYPP450 comme CYP4G16 et CYP4G17 sont associés aussi avec la production d'hydrocarbures cuticulaires chez *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles coluzzii* (Balabanidou et al. 2016; Yahouédo et al. 2017; Toé et al. 2015; Jones et al. 2013).

### 1.5.2.3. Insensibilité du site cible

#### 1.5.2.3.1. Mode d'action de l'insecticide neuroactif

Normalement les insecticides moléculaires peuvent employer leur effet toxique sur les moustiques en modifiant la sensibilité du site cible et en perturbant les fonctions neurales principales jusqu'à tuer l'insecte. Par exemple, DDT et les pyréthriinoïdes ciblent directement le canal sodique pour causer une dépolarisation de la membrane nerveuse et une série de décharges répétitives dans le système nerveux pour garder le canal ouvert pendant un temps inhabituellement long, comme observé, les moustiques vont être sous effet choc rapidement et tressauter jusqu'à la mort (Dong et al. 2014). Les organophosphates et les carbamates ciblent

l'acétylcholinestérase (AChE) qui est l'enzyme clé dans le système nerveux pour hydrolyser les neurotransmetteurs acétylcholine et stopper les impulsions nerveuses (Figure 9) (J.-P. David et al. 2013). Dans les éléments cyclodiéniques et le fipronil, les molécules se concentrent sur le récepteur GABA provoquant le blocage du potentiel d'action (Buckingham, Ihara, and Matsuda 2017). Ainsi, les mutations de ces trois cibles vont provoquer une résistance correspondant avec un insecticide les ciblant.



**Figure 9. Site cible de l'insecticide synthétisé (J.-P. David et al. 2013).**

#### 1.5.2.3.2. Mutation dans la structure du canal sodium

L'affinité liant le DDT et les molécules pyréthrinoïdes à la protéine est réduite ou éliminée, lorsque le site cible dans le canal sodique est modifié, ce qui rend les moustiques capables de survivre, ce phénomène a été décrit comme la résistance sous effet choc (*kdr*) (Du et al. 2016). La mutation L1014F située dans le segment S6 du domaine II (IIS6) chez la mouche domestique et la blatte germanique résistantes aux pyréthrinoïdes fut la première mutation *kdr* détectée (Miyazaki et al. 1996).

Récemment chez les moustiques *Aedes*, plus de mutations ont été signalées, comme les mutations G923V, L982W, I1011M, V1016G/I, F1534C, S989P, D1763Y et T1520I qui ont été détectées dans des populations résistantes. Parmi ces mutations, les S989P, I1011M, V1016G/I, F1534C, et D1763Y ont été examinées fonctionnellement à travers le système d'expression *Xenopus oocyst* (Du et al. 2016). Vraisemblablement en raison d'une co-occurrence ou tri-occurrence, des mutations *kdr* peuvent apparaître comme étant un phénomène

commun chez les populations hautement résistantes. Comme V1016G, et F1534C ou avec S989P qui ont été détectées dans des populations d'*Ae. aegypti* résistantes à la deltaméthrine en Asie du sud (C.-X. Li et al. 2015). De plus, sur le plan de l'évolution de la mutation, il a été parfois montré une distribution géographique distincte, dans le cas de V1016G et V1016I, deux substitutions à la même position, V1016G n'a jamais été détecté en dehors de l'Asie du sud-est, alors que V1016I est répandu en Amérique du nord et du sud (Collet et al. 2016).

#### 1.5.2.3.3. Mutation des AChE

Les mutations des AChE sont principalement montrées chez les moustiques *Culex*, lorsque les OP et les carbamates travaillent comme inhibiteurs d'acétylcholinestérases en perturbant le signal de transmission et provoquant la mort des insectes. Il y a deux acétylcholinestérases AChE1 et AChE2 qui ont été identifiées chez des espèces de moustiques *Culex*, et seulement cette dernière a été signalée comme associée à la résistance aux insecticides (Weill et al. 2003). A ce propos, deux mutations sont mises en évidence, la substitution G119S a été signalée chez *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. albimanus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* et *Cx. visbnui* (Sadia-Kacou et al. 2017; Assogba et al. 2014; Liebman et al. 2015; Yanola et al. 2015; Kioulos et al. 2014), et la substitution F455W et F331W apparaissent fortement chez *Cx. tritaeniorhynchus* en Chine (Wu et al. 2016 ; Alout et al. 2007).

#### 1.5.2.3.4. Mutation des récepteurs GABA

Le troisième site cible est le récepteur GABA. Le neurotransmetteur gamma-aminobutyric acid (GABA) est le principal inhibiteur de neurotransmetteurs chez les moustiques servant d'antagoniste pour l'ouverture de la transmembrane pentamerique canal-Cl (Buckingham, Ihara, and Matsuda 2017). Le récepteur GABA est la cible des insecticides cyclodiens comme la dieldrine, et les phénylpyrazoles comme le fipronil. Le développement de la résistance à la dieldrine dépend des points clés de mutation A296S/G et A302S. Une substitution d'A296G a été trouvée chez *An. gambiae* (Taylor-Wells et al. 2015), et une substitution de A296S a été prouvée plus largement chez *An. funestus* (Djouaka et al. 2016), alors qu'une substitution de A302S a été signalée chez *Ae. albopictus* en Malaisie (Low et al. 2015). Néanmoins, aucune mutation dans les séquences codant les récepteurs GABA n'a été découverte comme étant responsable de la résistance au fipronil, suggérant l'existence d'une résistance croisée pour la résistance au fipronil.

## 1.5.2.4. Résistance métabolique

### 1.5.2.4.1. Mécanisme de la résistance métabolique

Une fois en contact avec des molécules insecticides, trois familles majeures de gènes de détoxification métabolique seront activées et impliquées dans le processus de biodégradation, ce sont les cytochromes P450 mono-oxygénases, carboxyle/cholinestérases, et glutathion S-transférases (Hemingway et al. 2004). L'insecticide est reconnu comme une substance étrangère au moustique comme pour les autres organismes vivants, celui-ci va être métabolisé et évacué par des enzymes en trois phases. Les enzymes de la phase I dites de fonctionnalisation, y compris les cytochromes P450 et carboxyle/cholinestérases, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse pour les insecticides hydrophobes ; les enzymes de la phase II dites de conjugaison (glutathion-S-transférases), catalysent les réactions de conjugaison pour les insecticides hydrophiles et les métabolites de la phase I ; finalement, les transporteurs de la phase III, transportent les dérivés, en vue de leur élimination de la cellule (Guéguen et al. 2006).

La résistance métabolique se développe par des altérations dans les niveaux ou les activités de détoxification enzymatique. Théoriquement, la résistance métabolique peut être d'une part la conséquence de super-expression d'une ou plusieurs enzymes de détoxification qui sont capables de métaboliser l'insecticide, et peut être d'autre part la cause de la sélection de variations en accélérant la vitesse de métabolisme des insecticides en raison de modifications conformationnelles (X. Li, Schuler, and Berenbaum 2007).

La surproduction d'enzyme de détoxification est fréquemment associée à la surtranscription, ainsi la plupart des gènes concernant la résistance métabolique ont été identifiés par leur transcription différentielle entre les populations résistantes et sensibles en utilisant la technique transcriptomique (J.-P. David et al. 2013). Cette technique est largement utilisée pour identifier des gènes candidats, mais il existe aussi certaines contraintes, par exemple elle ne peut pas suivre les modifications au niveau génomique, de plus, le travail avec l'ARN est très délicat et couteux par rapport avec l'ADN. Récemment, des marqueurs génomiques ont été proposés par Faucon et al., leurs résultats ont mis en évidence des variations du nombre de copies de gènes (CNV) et des mutations non-synonymous affectant les enzymes de détoxification associées à la résistance à la deltaméthrine pyréthroïde (Faucon et al. 2015, 2017).

#### 1.5.2.4.2. CYP 450 mono-oxygénases

Elle est une famille d'enzymes hydrophobiques importante et largement étudiée dans la dégradation des molécules pyréthroïdes. Les électrons de la flavoprotéine NADPH cytochrome P450 réductase ou les cytochromes b sont les auxiliaires nécessaires pour une réaction catalytique.

D'après l'analyse de la séquence du génome complet, il y a 111, 160, 204 et 89 séquences de gène P450 respectivement chez *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* et *An. darlingi* (Ranson et al. 2002; Strode et al. 2008; Marinotti et al. 2013; Yan et al. 2012). Quand soumis à une forte pression de sélection insecticide, la surexpression constitutive et inductive de CYP450 se charge de la détoxification des insecticides et du développement de la résistance aux insecticides. La surexpression de la sous-famille CYP6 et CYP9J fut largement signalée chez les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes. Comme chez *Aedes*, où CYP6Z8, CYP6BB2, CYP6CB1, CYP6M1/2, CYP9J9/10/19/22/24/26/28/32 ont été signalés comme surexprimés dans les lignées résistantes (Chandor-Proust et al. 2013; Bariami et al. 2012; Dusfour et al. 2015), par ailleurs, CYP9J24/26/28/32 ont été validés pour métaboliser les pyréthrinoïdes, en étant exprimés dans le système de *Escherichia coli* (Stevenson et al. 2012).

#### 1.5.2.4.3. Carboxyle/cholinestérases (CCE)

La majorité des insecticides organophosphates sont des esters d'acide phosphorique et seront hydrolysés par carboxyle/cholinestérases, mais elle ont également été décrites comme pouvant avoir un rôle dans la résistance croisée à plusieurs insecticides, y compris les pyréthrinoïdes, les organophosphorés et les carbamates (Devonshire 1991; Flores et al. 2013).

D'après l'analyse de séquence du génome complet, il y a 51, 49, 71 et 20 séquences de gène estérase respectivement chez *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* et *An. darlingi* (Ranson et al. 2002; Strode et al. 2008; Marinotti et al. 2013; Yan et al. 2012). L'amplification de ces enzymes peut dégrader rapidement la molécule active de l'insecticide avant qu'elle n'atteigne l'AChE de l'insecte. Ce mécanisme de résistance a été le plus largement signalé chez le genre *Culex*, incluant *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* et *Cx. tritaeniorhynchus* (Hemingway and Karunaratne 1998). D'après une analyse microarray, CCEae3A et CCEae6A étaient fortement régulés à la hausse chez des populations d'*Ae. aegypti* de Thaïlande résistantes au traitement de téméphos (Poupardin et al. 2014). Par analyse de modélisation de présence d'un locus quantitatif (QTL), CCEae3A, CCEae6C étaient légèrement sur-exprimés chez les populations d'*Ae. aegypti* résistantes au téméphos au Brésil (Paiva et al. 2016). De plus une hausse de l'activité CCE associée à la résistance au téméphos

a également été signalée chez des populations d'*Ae. aegypti* d'autres pays d'Amérique du sud et des Caraïbes (Saavedra-Rodriguez et al. 2014; Goindin et al. 2017).

#### 1.5.2.4.4. *Glutathion S-transférases (GSTs)*

Les GSTs peuvent catalyser directement les composés à la fois endogènes et xénobiotiques hydrophiles et également les métabolites dont la molécule est un composé oxydé et hydrolysé par les familles des cytochromes P450 et CCE. Dans le processus de détoxification, les anions thiolate générés dans le site actif de la catalyse GST deviennent un support d'abstraction d'hydrogène, conduisant à l'élimination de la chlorine du DDT, pour produire du DDE rapidement (Wilce and Parker 1994). Ainsi l'élévation de l'activité de GST peut ainsi augmenter le taux de déchlorhydratation donnant lieu à la résistance au DDT.

D'après l'analyse de séquence du génome complet, il y a 31, 26, 35 et 30 séquences de gènes GST respectivement chez *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* et *An. darlingi* (Ranson et al. 2002; Strode et al. 2008; Marinotti et al. 2013; Yan et al. 2012). Une corrélation positive entre l'activité GST et la déchlorhydratation du DDT a été observée chez les espèces *Culex quinquefasciatus* (Prapanthadara et al. 2000). Une hausse de l'activité de la classe epsilon des GSTs a été trouvée chez les *Ae. aegypti* qui sont résistants au DDT et à la perméthrine, le rôle fonctionnel de GSTe2, GSTe5 et GSTe7 a été confirmé dans le système d'expression de *E.coli* (Lumjuan et al. 2005, 2011).

#### 1.5.2.4.5. *Résistance croisée et multi-résistance*

D'après l'IRAC : la résistance croisée survient lorsque la résistance à un insecticide confère également la résistance à un autre insecticide, même si l'insecte n'a pas été exposé à ce dernier produit. Certaines CYP P450 sont capables de métaboliser des insecticides provenant de différentes familles (Yunta et al. 2016). La CCE a été associée généralement à la résistance au téméphos, tandis que, chez *An. sinensis*, la CCE a été signalée comme étant liée à la résistance aux pyréthrinoïdes (Wu et al. 2016). Plus récemment, le test *in vitro* chez *Drosophila melanogaster* confirme que GSTe2 pourrait conférer la résistance au DDT et une résistance croisée à la perméthrine (Riveron et al. 2014). Un autre phénomène est la multi-résistance observée aussi fréquemment, et définie comme le développement d'au moins deux mécanismes chez la même population résistante, la combinaison de l'insensibilité du site cible et l'augmentation de la détoxification enzymatique sont largement détectées chez les *Aedes* résistants à la deltaméthrine venant d'Amérique du sud (Dusfour et al. 2015; Goindin et al. 2017).

### 1.5.3. Méthodes de caractérisation de la résistance aux insecticides

**Tests biologiques :** généralement les tests de première ligne, car ils peuvent révéler plus directement la prévalence ou le niveau d'expression phénotypique de la résistance. Le principe du test biologique consiste à mesurer la réponse de lots de moustiques vivants après une exposition à un insecticide. Deux méthodes principales permettent la mesure de la résistance :

La première méthode, les insectes sont exposés à une dose fixe d'insecticide pendant un temps donné (une dose diagnostique ou une concentration déterminée a priori) qui devrait tuer tous les individus sensibles. Les moustiques qui survivent après l'exposition aux insecticides sont alors considérés comme résistants.

La seconde méthode, les moustiques sont exposés à une série de dilutions de la molécule insecticide active, les réponses de mortalité sont enregistrées pour estimer une concentration létale atteignant 50% (CL50) des populations cibles avec un intervalle de confiance fiable. Les résultats de CL 50% vont permettre de visualiser le niveau de résistance de la population cible aux différents insecticides. Les tests peuvent être réalisés à la fois au stade larvaire et au stade adulte d'une population, les molécules actives peuvent être dissoutes dans un liquide pour le test larvaire, être préparées dans une bouteille spécifique, ou encore être imprégnées sur un papier recommandé par l'OMS pour le test adulte. De plus, le test de répulsion spatiale et le test d'irritation de contact ont été créés spécifiquement pour mesurer la résistance comportementale en observant le phénomène d'échappement à l'insecticide (Achee et al. 2009).

**Tests moléculaires :** la technique transcriptomique et la technique de séquençage haut débit peuvent permettre de mesurer le niveau d'expression de gènes de détoxification (Faucon et al. 2015). Avec l'aide de marqueurs existants, les mutations non-synonymes surtout les mutations concernant la résistance kdr peuvent être mesurées par PCR.

**Tests biochimiques :** qui mesurent l'activité ou quantifient la quantité d'enzymes de détoxification telles que les trois familles des enzymes de détoxifications décrites

précédemment chez les moustiques résistants par rapport à une souche de référence (Djegbe et al. 2011). Ce test nécessite une chaîne du froid pour éviter la perte d'activités enzymatiques. Les produits du métabolisme du substrat sont quantifiés par une réaction colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un spectrofluoromètre.

Il est recommandé d'associer les tests biologiques aux tests moléculaires et biochimiques pour fournir des données complètes pour identifier les causes et expliquer précisément le mode d'action de la résistance, afin de mettre en œuvre rapidement des stratégies de gestion de la résistance adéquates.

## 1.6. Coût de la résistance

### **Encadré 5 : Le coût de la résistance**

Les coûts associés à la résistance aux insecticides apparaissent lorsque le développement d'une résistance est accompagné d'un fort coût énergétique provoquant un désavantage significatif qui diminue l'aptitude d'un insecte à se développer ou à se reproduire par rapport à un insecte sensible (Kliot and Ghanim 2012).

### 1.6.1. Revue de la littérature sur le coût de la résistance chez les moustiques vecteurs (Publication 1-soumission chez le journal « Pathogens and Global Health »)

#### **Cost of insecticide resistance for mosquito life-history traits and vector capacity?**

**Lanjiao Wang, Yanouk Epelboin, Isabelle Dusfour**

#### **Résumé**

D'après cette revue, des impacts significatifs de divers mécanismes de résistance aux insecticides ont été étudiés chez les populations résistantes d'*Anopheles*, *Aedes* ou *Culex*, nous re prenons que des coûts significatifs de résistance ont été détectés dans des aspects tels que la mesure des paramètres biologiques (ailes et corps des insectes), le stockage d'énergie, la reproduction et le développement de moustiques résistants.

En outre, le système de défense immunitaire et la compétence vectorielle ont également été modifiés de manière significative chez les moustiques résistants aux insecticides. La capacité vectorielle du moustique est influencée par une série de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

La compréhension des complexités de tous les paramètres épidémiologiques, écologiques et entomologiques est nécessaire pour mieux estimer les interactions entre la résistance aux insecticides et la capacité vectorielle. Dans une certaine mesure, les impacts de

la résistance aux insecticides sur la capacité des vecteurs permettront de déterminer les stratégies de lutte antivectorielle appropriées, pour atténuer les menaces résistantes actuelles.

### *Consequences of insecticide resistance on mosquito fitness and vector capacity?*

The present paper reviews the consequences of insecticide resistance and their associated mechanisms on various parameters in *Anopheles*, *Aedes* or *Culex* populations. Overall, significant costs of resistance were found on biological metrics (wing and body of insects), energy storage, reproduction and development. Immune defence system and vector competence were also altered significantly in insecticide resistant mosquitoes. The transmission capacity of a mosquito vector is influenced by a series of intrinsic and extrinsic factors, understanding the complexities of all epidemiological, ecological, and entomologic parameters are necessary to better estimate the interactions between insecticide resistance and vector capacity. Fitness costs have been described as negative adaptive consequences of resistance, and we suppose the investigation of impacts of insecticide resistance on vector capacity here could be useful to determine the suitable vector control strategies or be helpful to control current resistant threat.

Keywords: mosquito, insecticide resistance, fitness costs, vector capacity, management of resistance

## **Introduction**

Vector-borne diseases are considered to contribute over 17% of all infectious diseases and cause more than 700 000 deaths per year [1]. Among them, arboviruses are of major concerns, with the expansion and emergence of new pathogens on one hand [2], and the increase of resistance to insecticides compromising the control of the disease [3]. With the aim to improve prediction and control, scientific and public health communities have combined their efforts to tackle the problem by attempting to identify determinants factors of emergence and spread, to predict vector capacity, to develop insecticide resistance management and to develop alternative vector control strategies [4]. A better knowledge on mosquito biology, behaviour

and adaptability to environment and pathogens are key components to unravel those questions [5]. Being resistant to molecules modifies mosquito physiology by non-synonymous mutations on insecticide target sites or by triggering changes in metabolic pathways related to detoxification. Interaction between resistant mechanisms and other metabolic, immune responses and energetic allocation are suspected [6,7]. If such interaction is validated then insecticide resistance would have an impact on vector capacity but also on vector control by influencing parameters such as vector competence, the ability of reproduction, the development speed, lifespan and energy storage. With the tremendous increase of insecticide resistance in various mosquito species at worldwide scale the investigation of such relationship has become of major interest [8].

The accepted definition of insecticide resistance in the field is repeated failures of compounds to provide the intended level of control when used as recommended [9]. In the laboratory, this resistance can be detected and monitored in populations by using standardized tests of exposure [10]. This resistance is due to several types of mechanisms such cuticular thickening, behavioural switch concerning outdoor resting / biting plasticity and the mainly studied target-site mutations and metabolic changes [11]. Insecticide target-site modification limits compound affinity and then its action. The most studied targets are on the nervous system, first, the voltage-dependant sodium channel is targeted by the insecticide family pyrethroids and organochlorine (DDT); second, acetylcholinesterase (AChE) is targeted by the family organophosphates and carbamates [12–15]. Metabolic resistance is a complex system caused by an overproduction and increased activity of detoxification enzymes and the inherent metabolic cascade to degrade insecticide and excrete or sequester their secondary metabolites [16]. Three major detoxification gene families have been associated to resistance phenotypes: cytochrome P450-dependent monooxygenases, carboxyl/cholinesterases, and glutathione s-transferases [16]. In the same insect, multiple resistances in combination with

target-sites and over-expression of detoxification enzymes were reported for mosquitoes all over the world [3]. The panel of mechanisms produces against one insecticide can conduct to resistance against other molecules. This phenomenon is called cross-resistance and remains an issue for vector control [17,18].

This review aims at gathering data on effects related to insecticide resistance and define trends of the impact on vector capacity and vector control management.

### **Search Criteria and selected publications**

This study was conducted using the electronic databases PubMed and ScienceDirect with a cut-off date of December 15<sup>th</sup>, 2017. Search terms included “resistance” with “cost”, or “life trait” and one of the following search items: “insecticide”, “vector”, “mosquito”, “Culicidae”, “Aedes”, “Culex”, “Anopheles”. Articles reviewed for this study were exclusively in English. Articles that mainly focused on induced effects of some biological parameters after insecticide exposure were discarded, as well as articles focused on other insects than Culicidae. Eligible articles were considered relevant if they mentioned life traits affected in resistant populations of mosquitoes in absence of pesticides), regardless of when or where the studies were conducted.

The Boolean search identified 530 articles for “resistance cost” and “insecticide”, 403 for “resistance cost” and “vector”, 236 for “resistance cost” and “mosquito”, 172 for “resistance cost” and “culicidae”, 46 for “resistance cost” and “aedes”, 53 for “resistance cost” and “culex” and 99 for “resistance cost” and “anopheles”. The research with “resistance life trait” and one of the other search items led to 45 more articles. Among these 1584 records, after eliminating duplicates and irrelevant records, 59 studies were considered eligible, finally resulting in 30 considered relevant to this review. The 29 other studies were ineligible because they focused on the physiological responses induced in the mosquito to face a pesticide exposure.

We aggregated the data in five groups: **biometry parameters, energy storage, developmental and reproductive parameters, vector competence and immune activities**, that have been measured in lab and field resistant mosquito populations from *Anopheles*, *Aedes* or *Culex* genus. We recorded all beneficial, detrimental, and no effect, to evaluate the importance of each observation and its reproducibility within and between species. In addition, according to the descriptions in selected publications, we classified the type of studied strain in five categories. Laboratory strain was considered as mosquito strain reared in laboratory conditions more than 3 generations. Lab selected strain corresponds to mosquito strain reared in laboratory conditions under the insecticide selected pressure. Experimental strains correspond to strains created by a series of backcrossing and selection in laboratory conditions. Field strains didn't come directly from the field, they correspond immature mosquitoes collected from the field and reared in insecticide free conditions ( $\leq 3$  generations in laboratory condition), while field selected strain corresponds to immature mosquitoes collected from the field and reared with special insecticide pressure ( $\leq 3$  generations in laboratory condition), if the field strains or field selected strains have been reared or selected in laboratory more than 3 generations, they will be considered as lab strains or lab selected strains.

Among all selected publications, cross-analysis of results turned to be difficult. Few populations from each species were retrieved for each parameters and insecticide. In addition, measured parameters, laboratory conditions, mosquito colonization level, reference strain or methodology were often different from one work to another. In addition, including the impact of mechanisms in the analysis remained sensitive as the level of resistance was not always strictly evaluated. Therefore, this information was mentioned but not analysed. Table S1 details publication methodology and results, then aggregated data are presented in the paper.

## **Biometrics**

The measure of biological metrics in diptera and particularly in the Culicidae family has proven

to be a useful tool for evaluating correlations between shape and environmental or genetic variables. Those metrics had particularly been studied in detection of infection, sexual dimorphism, treatments and separation of laboratory strains [19,20]. Biometrics measures could reflect a global phenotype and environmental conditions of the mosquito. For instance, the mosquito size could be positively associated with longevity, fecundity, blood-feeding or infection frequency [21–23], and influenced by temperature and humidity [24]. Therefore, size reduction and shape modification were observed in lab strains and lab selected strains of *Aedes aegypti* [25,26], size reduction were also found in fields strains and experimental strains of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* [27,28](Table 1, Table S1).

Weight of the insect was found reduced in several species resistant to molecules from the organophosphate family [27,29,30]. But it must be noticed that some populations even resistant did not exhibited a significant reduce or enhanced effect [29–31]. These effects could be related to an altered energy storage [32], after Briegel, protein and carbohydrate contents could have an isometric relationship with body size, whereas the lipid content exponentially related in four *Anopheles* species [33].

**Table 1. Biometrics influenced by insecticide resistance in different mosquito species.**

Biometrics	Effects	Mechanisms	Species	Strain	Reference	Resistance
Wing size (length)	Reduced	<i>kdr</i>	<i>Ae. aegypti</i>	lab strain, lab selected strain	Jaramillo et al 2014 [25], Plernsub et al 2013 [26]	lambda-cyhalothrin, permethrin
		<i>ace</i> , metabolic	<i>Cx.pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	field strains, experimental strain	Bourguet et al 2004 [27], Hardstone et al 2010 [28]	organophosphate, permethrin
	No effect	NA	<i>Ae. aegypti</i>	lab strain	Jaramillo et al 2014 [25]	lambda-cyhalothrin
Wing shape	Modified	NA	<i>Ae. aegypti</i>	lab strain	Jaramillo et al 2014 [25]	lambda-cyhalothrin
Wet body weight of adults	Reduced	metabolic	<i>Ae. aegypti</i>	lab selected strain	Diniz et al 2015 [29]	temephos
	No effect	metabolic	<i>Ae. aegypti</i>	field strain	Diniz et al 2015 [29]	temephos
	Increased	<i>kdr</i> , metabolic	<i>An. gambiae</i>	lab selected strain	Otali et al 2014 [30]	permethrin
Dry body weight of adults	No effect	<i>kdr</i> , metabolic	<i>An. gambiae</i>	lab selected strain	Otali et al 2014 [30]	permethrin
Body weight of larvae	Reduced	NA	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	field selected strain	Alam et al 2017 [31]	dimethoate
	Reduced	metabolic	<i>Ae. aegypti</i>	lab selected strain	Diniz et al 2015 [29]	temephos

Body weight of pupae	No effect	NA	<i>Ae. aegypti</i>	field strain, field	Diniz et al 2015 [29],	temephos,
			<i>Cx. quinquefasciatus</i>	selected strain	Alam et al 2017 [31]	dimethoate

## Energy storage

Energy in mosquito is stored under two forms: lipids and carbohydrates. Lipids stock is dominated by triacylglycerols (triglycerides) stored in fat body and is the major source of energy for mosquito's physiological activities [34]. In mosquitoes, the principal carbohydrate stock is primarily composed of glycogen and other sugars such as trehalose. Glycogen is synthesized from blood and sugar meals and predominantly stored in the fat body. This sugar molecule is consumed in flight metabolism. Trehalose is also synthesized in the fat body but stored in the haemolymph and concentrated more than 10 times higher than glucose, serving as the principal energy storage and working as a stabilizer for dry membranes [34].

Three publications were retrieved and demonstrated a reduction of energy stocks and metabolic rate in insecticide resistant strains [28,29,35]. Only Otali et al. found an increase of glycogen in the population of *Anopheles gambiae* selected with permethrin for over ten years (Table 2) [30]. The development of insecticide resistance could deplete the energy storage of mosquitoes and reduce the available energy for the other biological functions as producing the energy-trade-offs between insecticide resistance and key life history traits such as the reproduction of female and preimaginal development [35]. However, in this review, we observed a lot of results which did not show any impacts of insecticide resistance on energy storage, whatever the class of insecticides and the mosquito species [29,30,35](Table 2).

Modulations in energy reserves generally occur during acute or prolonged stress and are quickly compensated within organisms to survive [36]. Actually, the enzymes and hormones of energy metabolism involved in the pathway of glycolysis and lipogenesis for example are able to compensate changes in reserves and may be more sensitive indicators than glycogen, sugars and / or lipid contents [37–39].



**Table 2. Cost, advantage or no effect provoked by insecticide resistance in aspect of energy storage in mosquitoes.**

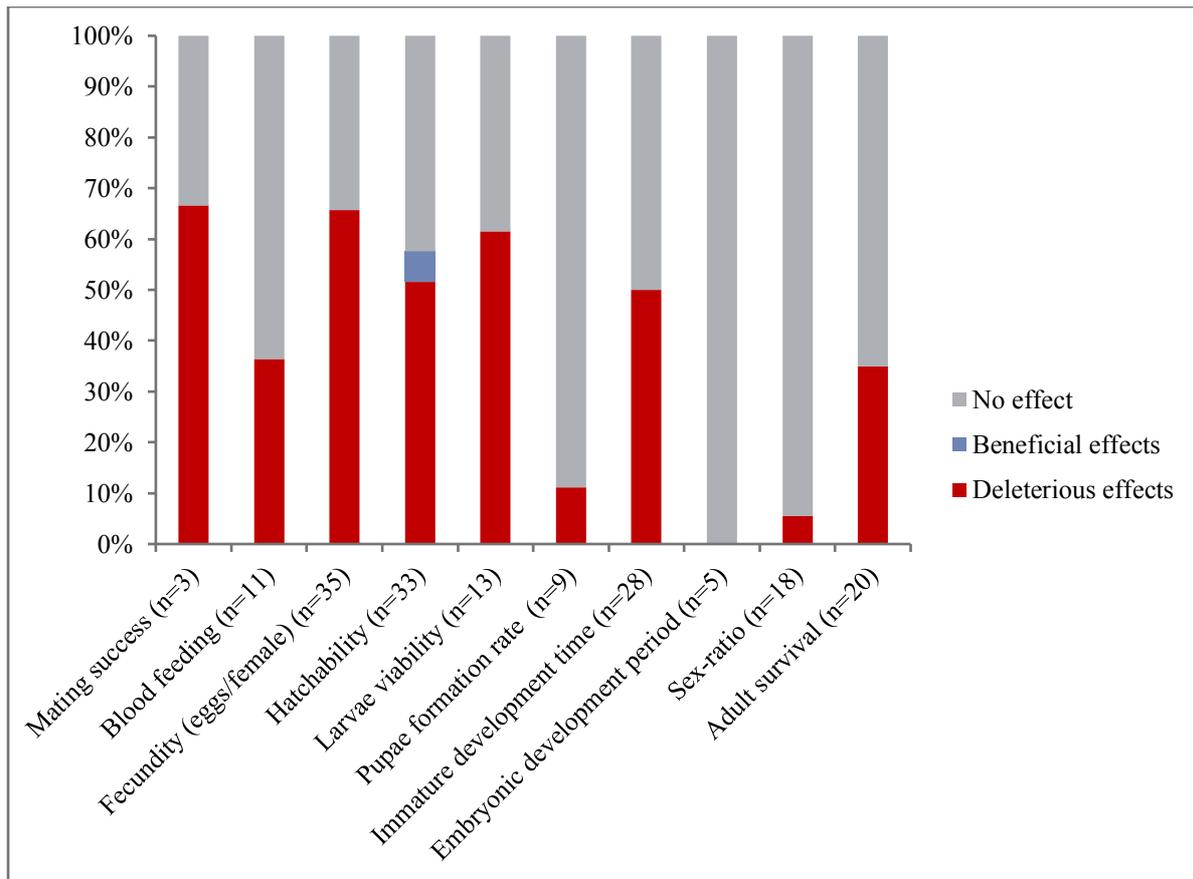
	Effects	Mechanisms	Species	Strain	Reference	Resistance
<b>Lipids</b>	Reduced	metabolic, <i>ace</i>	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx pipiens</i> , <i>Cx quinquefasciatus</i>	lab selected strain, experimental strain	Diniz et al 2015 [29], Rivero et al 2011 [35], Hardstone et al 2010 [28]	temephos, organophosphrate, permethrin
	No effect	<i>kdr</i> , <i>ace</i> , metabolic	<i>Ae. aegypti</i> , <i>An. gambiae</i> , <i>Cx pipiens</i>	field strain, experimental strain, lab selected strain	Diniz et al 2015 [29], Otali et al 2014 [30], Rivero et al 2011 [35]	temephos, permethrin, organophosphate
<b>Glycogen</b>	Reduced	metabolic	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx quinquefasciatus</i>	lab selected strain, experimental strain	Diniz et al 2015 [29], Hardstone et al 2010 [28]	Temephos, permethrin
	Increased	<i>kdr</i> , metabolic	<i>An. gambiae</i>	lab selected strain	Otali et al 2014 [30]	permethrin
	No effect	<i>ace</i> , metabolic	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx pipiens</i>	lab selected strain, field strain, experimental strain	Diniz et al 2015 [29], Rivero et al 2011 [35]	temephos, organophosphate
<b>Other sugars</b>	Reduced	<i>ace</i> , metabolic	<i>Cx pipiens</i>	experimental strain	Rivero et al 2011 [35]	organophosphate
	No effect	metabolic	<i>Cx pipiens</i>	experimental strain	Rivero et al 2011 [35]	organophosphate
<b>Total energy content</b>	Reduced	<i>ace</i> , metabolic	<i>Cx pipiens</i>	experimental strain	Rivero et al 2011 [35]	organophosphate
	No effect	metabolic	<i>Cx pipiens</i>	experimental strain	Rivero et al 2011 [35]	organophosphate
<b>Metabolic rate (CO2 production)</b>	Reduced	<i>kdr</i> , metabolic	<i>An. gambiae</i>	lab selected strain	Otali et al 2014 [30]	permethrin

## Reproduction and development

Characteristics of mosquito blood feeding, reproduction, development and survival are key components in their capacity to proliferate and to transmit pathogens. If insecticide resistance impacts life traits, density of resistant mosquito would be altered in absence of insecticides. The stronger the cost is, the faster susceptibility to insecticide will return by favouring proliferation of the most competitive susceptible individuals over resistant one [25]. Density,

biting rate, survival and feeding behaviour are important life traits for vector capacity modelling [40]. Parameters measured over 13 populations from four different species were not fully the same, but few papers recorded beneficial effect for the mosquito strains published (Table S1).

To improve readability, we decided to aggregate those data (Figure 1). The absence of significant differences (Fisher's test,  $p\text{-value} > 0.05$ ), amongst species, insecticide family, mechanisms and type of strains allowed us to proceed. We then noticed, that deleterious effect and absence of effect were often recorded. We can observe that reduction was recorded for mating success, blood feeding, fecundity, hatchability, larval viability and adult survival while a longer development time was observed for immature stages [25–27,29–31,35,41–48]. Few effects were observed for embryonic phase, pupae formation and sex-ratio [29,31,43,44] (Table S1, Figure 1). Although the correlation is not given in the cited studies, we suppose differences in the allocation of energy resources in insecticide resistant mosquitoes in comparison with susceptible ones could be the cause of the alteration of reproductive and developmental parameters. Because energy status could impact not only the reproduction of mosquito such as the egg-batch size [49], the fecundity [32,33] but also the preimaginal development and survival rate of mosquitoes [35].



**Figure 1. Proportion of resistance strain exhibiting beneficial, deleterious or no effects for each developmental and reproductive parameter regardless mosquito species or insecticide resistance profile. There n is the total number of mosquito strain used.**

Host seeking behaviour was studied under the spectra of vector control in malaria vector to better understand how *kdr Anopheles gambiae* behave in contact with long lasting impregnated nets [45,46]. Modified host seeking was observed in each case but with different results. The *kdr* L1014F homozygous resistant mosquitoes were more attracted by a host behind an insecticide treated net than an untreated net [45], however they had more difficulties to locate the hole in the net [46]. The *kdr* heterozygous mosquitoes were the most efficient at penetrating into the pyrethroid-treated net ([46]).

**Table 3. Host seeking behaviour impacted by contacting with Long lasting impregnated nets**

	Effects	Mechanisms	Species	Strain	Reference	Resistance
<b>Host seeking regarding vector control*</b>	Modified	<i>kdr</i>	<i>An. gambiae</i>	experimental strains	Porciani et al 2017 [45]	pyrethroid
	Reduced	<i>kdr</i>	<i>An. gambiae</i>	experimental strains	Diop et al 2015 [46]	pyrethroid
	Increased	<i>kdr</i>	<i>An. gambiae</i>	experimental strains	Diop et al 2015 [46]	pyrethroid

### Vector competence

The determination of vector competence in mosquito populations, defined as the competence of the vector to ingest, disseminate and transmit a pathogen is evaluated experimentally under laboratory conditions [50]. This measure disregards external parameters and is often qualified as intrinsic or genetic variable of transmission. It is one component of vector capacity, which includes external parameters [40].

**Table 4. Effects of insecticide resistance on vector competence of mosquitoes**

	Effects	Mechanisms	Species	Strain	Reference	Resistance
<b>Vector Competence</b>	Increased	<i>ace-1 G119S,</i>	<i>An. gambiae,</i> <i>An.s coluzzi</i>	experimental strain, field strains	Alout et al 2013 [51], Ndiath et al 2014 [52]	organophosphate, carbamate, pyrethroid
		<i>kdr-west L1014F,</i> <i>kdr-east L1014S</i>				
	Reduced	<i>kdr L1014F</i>	<i>An. gambiae,</i>	field strains	Hemingway et al 2013 [53]	deltamethrin
	Reduced	metabolic	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	field strains	L. McCarroll et al, 2002 [54]	organophosphate

The first report of a relationship between insecticide resistance and vector competence showed that esterase-related resistant *Culex quinquefasciatus* are less likely to transmit filarial parasite *Wuchereria bancrofti* than their insecticide-susceptible counterparts due to a reduced larval development [54]. More recently, laboratory and field studies have demonstrated opposite results on the relationship between *kdr* mutation and *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles gambiae*. L1014F *kdr* genotype were associated to an increase in

the prevalence of infection in both experimental strains from Burkina Faso [51] and selected strains colonized from Senegal [52]. While a homozygous *kdr* *Anopheles gambiae* population collected in the field at Bioko, the main island of Equatorial Guinea, appeared less likely to transmit *Plasmodium falciparum* than susceptible ones [53]. Modified vector competence was observed in each case but with different results, to investigate the impact of resistance on vector competence, it has to consider a lot of actual situations, including the principal mosquito species, the major control strategies and the climate, in this case, more data is asked to draw a concrete conclusion.

### **Immune defence activities**

When mosquitoes feed on infected host, some immune related genes coding for *defensin*, *cecropin* and nitric oxidase synthase will be activated to restrict the migration of pathogens and to form encapsulation to exclude these foreign bodies [55]. They were overexpressed in lab selected strains of *Culex pipiens* and *Anopheles gambiae* [55,56], but no significant difference was found in field strain [55] (Table 5).

Phenoloxidase, involved in *Culex pipiens* melanisation cascade, has an enhanced activity in esterase-resistant adult females and acetylcholine-esterase resistant males of lab selected strains than in susceptible counterparts. But, as observed for immune related genes, no such difference were found in field strain [57].

Reactive oxygen species (ROS), could help the host to compete against infection in *Anopheles gambiae* [58], but if produced in excess, they can oxidise and damage various cellular components. In insects, high levels of ROS production were associated with increased levels of P450 activity [59]. Serine proteases are involved in detoxifying insecticide molecules by hydrolysing deltamethrin [60,61] and could play a role in dengue virus infectivity in *Aedes aegypti* [62]. Finally, high level of ROS and altered expression of serine protease genes were found in the lab selected strains of *Anopheles gambiae* [30] and *Culex pipiens* [63].

Overall, immune system seems enhanced in lab selected strains mosquitoes (Table 5), the relationship between resistance and vector competence was based on the hypothesis that both metabolic and immune pathways could interact or trigger each other. The above results concur to that hypothesis, but further functional studies will be needed to unravel what kind of relation exists.

**Table 5. Altered immune defence activities related to the insecticide resistance**

Immune defence	Effects	Mechanisms	Species	Strain	Reference	Resistance
<b>Phenoloxidase activity</b>	Increased	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Cx. pipiens</i>	lab selected strain	Cornet et al 2013 [57]	organophosphate
	No effect	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Cx. pipiens</i>	field strain	Cornet et al 2013 [57]	organophosphate
<b>Defensin, Cecropin, Gambicin, Transferrin, Nitric oxidase synthase</b>	Increased	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Cx. pipiens</i>	lab selected strain	Vézilier et al 2012 [55]	organophosphate
		<i>kdr, metabolic</i>	<i>An. gambiae</i>	lab selected strains	Vontas et al 2005 [64]	permethrin, DDT,
	No effect	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Cx. pipiens</i>	field strain	Vézilier et al 2012 [55]	organophosphate
<b>Reactive oxygen species (ROS)</b>	Increased	<i>kdr, metabolic</i>	<i>An. gambiae</i>	lab selected strain	Otali et al 2014 [30]	permethrin
<b>Serine proteases</b>	Modified	<i>krd metabolic</i>	<i>Ae. aegypti</i>	experimental strains	Dusfour et al 2015 [65]	deltamethrin
	Increased	metabolic	<i>Cx. pipiens</i>	lab selected strains	Gong et al 2005 [63]	deltamethrin

## Discussion and conclusion

### *What cost for mosquito resistance to insecticide?*

The publications included in the review demonstrated a heterogeneity in experimental procedures and measured parameters making difficult data synthesis and conclusion. One of the reasons is the origin of the tested population, from the field or reared in laboratory. Indeed, this type of study requires a large number of mosquitoes that cannot usually be reached by

mosquitoes directly collected from the field. For this reason, mosquitoes are brought back to the laboratory (generally at larvae stages) to be raised in controlled conditions (temperature, humidity, photoperiod) and thus control several important parameters such as the age of the mosquitoes, their feeding, the density of the larvae and adults.

Overall, observations highlighted here tend to confirm the presence of an association between resistance to an insecticide and life history traits alteration [25,26,29–31,43,44] , energy shortage [29,30,35] , immune system enhancement [55,57,63–65] and vector competence modification [51–54]. However, this phenotypical association observed in lab strain, lab selected strain or experimental strain could artificially be produced by colonization or resistance selection. In addition, epistatic effect cannot then be left aside. This phenomenon could explain the discrepancy among results. For example, in a context of multiple resistance, different resistant mechanisms could combine in an additive, synergistic or antagonistic manners depending on a mosquito's resistance status, which was difficult and complicated to predict. Such as reported by Berticat *et al*, two resistance alleles *ace-1* and *kdr* which conferred resistance to carbamate and pyrethroid insecticides, respectively, both could provoke costs for emergence rate in the *Culex quinquefasciatus* mosquitoes [66]. But mosquito harbouring both *ace-1* and *kdr* resistant alleles, had a significant higher emergence rate than mosquito harbouring only the *ace-1* resistant allele [66]. To confirm the real relationship between insecticide resistance and some of these factors, functional genetics approaches have to be undertaken.

The other factors, for instance, microbiota composition of individuals [67–69], larval development environment [70], discrepancy of genetic background [71–73] or co-existence of insect-specific virus [74,75] could also alter the studied parameters in regardless of resistance status.

In addition, these associations are still restricted to phenotype-phenotype analysis. The publications we retrieve did not really go beyond that stage and the relation mechanisms remain difficult to obtain.

### *How does cost of insecticide resistance influence vector capacity?*

Vector capacity is important index for vector control, it describes the capacity of mosquitoes to transmit an arthropod-borne pathogen from one host to another, it is dependent of both vector-related intrinsic and extrinsic factors, such as vector and pathogen genetics, life-history traits, and environmental factors [50]. To estimate the potential intensity of transmission by the insect vectors, Ross and Macdonald first modelled an equation based on the malaria transmission model, the equation was modified later on by other medical entomologists [76]. Therefore, to date vector capacity (VC) can be formulated as:

$$VC = mp^n a^2 b / (-\ln p)$$

where **m** is the ratio of vectors to host, **p** is the daily survival rate of the vector, **a** is the human biting rate (the host preference index multiplied by the feeding frequency), **n** is the extrinsic incubation period (EIP), the time required by the pathogens to develop into a mosquito vector and to reach the saliva, and **b** is the vector competence [77].

We observed the negative effects of insecticide resistance for mosquito's reproduction and development, including mating success, blood feeding, fecundity, hatchability, larval viability and development as well as adult survival rate in insecticide free condition [25,26,29–31,35,41–46]. These costs could impact powerfully parameters such as population density (**m**), host feeding behaviours (**a**) and life span of vector (**p**), leading to modifications of vector capacity [40]. Indirect effects of immune response on resource allocation within the vector were observed to affect EIP (**n**) [78], although the number of published articles are limited, it is still possible to find the modifications of vector competence (**b**) related to existence of

resistance [51–54]. Overall, the five parameters involved in vector capacity are directly or indirectly influenced by existence of insecticide resistance, resulting in a strengthened or weakened effect on the vector capacity of resistant populations. For example in case of arbovirus infection in *Aedes* mosquitoes, Mousson et al studied the genetic structure of *Aedes aegypti* from Chiang Mai (Thailand), and then supposed that the local insecticide treatment could be related to dengue transmission [73].

### ***How could management of resistance benefit from cost of resistance?***

We agree that the interaction between insecticide resistance and vector capacity is not straightforward and the ecological interactions are equally important to be taken into account. Moreover, up to date, there was no direct correlation reported between entomological efficacy and epidemiological efficacy. Despite an increasing insecticide resistance, malaria incidence and parasite infection prevalence in children have decreased significantly in multiple endemic countries across Africa [79]. Current mosquito control strategy based on chemical insecticides remains the principal prevention and defence measures for disease control in absence of effective vaccinations and available treatments.

However fitness costs researches may help guide resistance management programs in some extent [80], for example, a longer development time was obviously observed for immature stages [29–31,44], which could provide enough buffering time to choose and implement the best larval control strategies. Traditional ways such as mechanical elimination of common oviposition and breeding sites, or by applications of biological larvicides *Bacillus thuringiensis var israelensis* (*Bti*) alone or in combination with *Bacillus sphaericus* [81] are widely used all around the world. *Bti* is a bacterio-insecticide that produces during sporulation four main insecticidal toxins specific to dipterans: [82]. These toxins bind to midgut membrane and lead to the disruption of membrane integrity and *in fine* kill the mosquito larvae [83]. Contrary to the previous cited insecticides, resistance to *Bti* is not a threat and very moderate

resistance has been observed after laboratory treatment during several generations [84,85] since the four toxins have different modes of action and consequently seem to delay the apparition and evolution of resistance.

Besides of use of *Bti*, more innovatively, predators can be used as an ecological, effective and self-sufficient tool for controlling larvae in particular situations. Some fish, particularly those belonging to the genera *Gambusia* and *Poecilia*, may be of interest for this purpose [86,87]. Recently, essential oils and extracts of leaves, seeds and fruits of some plants are becoming new alternatives to larvicides because of their ecological nature and their affordability [88,89].

The development and survival potential of resistant population was found lower than that of the susceptible population, the susceptibility to insecticide will return by favouring proliferation of the most competitive susceptible individuals over resistant one, which could prevent resistance from spreading to fixation [25,29].

Furthermore, the effect of resistance could be considered together with other traditional strategies during the development of integrated vector management, especially the fitness cost [25,26,29–31,35,41–46], the enhanced immune defence [55,57,63–65] and reduced vector competence [53,54] which could produce a weaken vector capacity in the resistant population. In addition, some resistant mosquitoes were more attracted by an insecticide treated net than an untreated net [45]. These are possible as a natural way to recompense the lost efficiency of insecticide controls to some extent or as an addictive force for genetic and autocidal control programme.

In conclusion, negative pleiotropic effects of resistance were found on life history traits and energy storage, meanwhile immune system enhancement and vector competence modification were observed in the mosquitoes resistant to insecticides. The vector capacity

could be influenced by the complexity of all these parameters. Nowadays the principal strategy for resistance management is to accelerate the development of wide-scaled resistance surveillance networks and alternative or complementary control methods independent on neurotoxic insecticide. We suppose the review of impacts of insecticide resistance on vector capacity will be useful for determining the suitable vector control strategies and help to develop policies for effective integrated managements and controls.

## References

- [1] WHO | Vector-borne diseases [Internet]. WHO. [cited 2018 Feb 8]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>.
- [2] Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, et al. Zika, chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu. Rev. Med.* 2017;
- [3] Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017;11.
- [4] Rivero A, Vézilier J, Weill M, et al. Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathog.* 2010;6.
- [5] Kliot A, Ghanim M. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 2012;68:1431–1437.
- [6] Carrière Y, Deland J-P, Roff DA, et al. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proc R Soc Lond B.* 1994;258:35–40.
- [7] Holloway GJ, Povey SR, Sibly RM. The effect of new environment on adapted genetic architecture. *Heredity.* 1990;64:323–330.
- [8] Brown ZS, Dickinson KL, Kramer RA. Insecticide Resistance and Malaria Vector Control: The Importance of Fitness Cost Mechanisms in Determining Economically Optimal Control Trajectories. *J. Econ. Entomol.* 2013;106:366–374.
- [9] Resistance [Internet]. IRAC. [cited 2018 Feb 8]. Available from: <http://www.irac-online.org/about/resistance/>.
- [10] WHO. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2006 [cited 2017 Apr 20]. Available from: <http://www.who.int/whopes/guidelines/en/>.
- [11] Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 2015;60:537–559.
- [12] Dong K, Du Y, Rinkevich F, et al. Molecular Biology of Insect Sodium Channels and Pyrethroid Resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2014;50:1–17.
- [13] Soderlund DM. Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Arch. Toxicol.* 2012;86:165–181.
- [14] Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life.* 2007;59:151–162.
- [15] Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 1990;87:245–254.
- [16] Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2004;34:653–665.

- [17] Assogba BS, Djogbénu LS, Saizonou J, et al. Phenotypic effects of concomitant insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) and knockdown resistance (kdrR) in *Anopheles gambiae*: a hindrance for insecticide resistance management for malaria vector control. *Parasit. Vectors*. 2014;7.
- [18] Ibrahim SS, Ndula M, Riveron JM, et al. The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid cross-resistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Mol. Ecol*. 2016;25:3436–3452.
- [19] Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infect. Genet. Evol*. 2008;8:414–421.
- [20] Yeap HL, Endersby NM, Johnson PH, et al. Body Size and Wing Shape Measurements as Quality Indicators of *Aedes aegypti* Mosquitoes Destined for Field Release. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2013;89:78–92.
- [21] Juliano SA, Ribeiro GS, Maciel-de-Freitas R, et al. She's a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2014;109:1070–1077.
- [22] Xue RD, Barnard DR, Schreck CE. Influence of body size and age of *Aedes albopictus* on human host attack rates and the repellency of deet. *J. Am. Mosq. Control Assoc*. 1995;11:50–53.
- [23] Lyimo EO, Takken W. Effects of adult body size on fecundity and the pre-gravid rate of *Anopheles gambiae* females in Tanzania. *Med. Vet. Entomol*. 1993;7:328–332.
- [24] Morales Vargas RE, Ya-umphan P, Phumala-Morales N, et al. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infect. Genet. Evol*. 2010;10:580–585.
- [25] Jaramillo-O. N, Fonseca-González I, Chaverra-Rodríguez D. Geometric Morphometrics of Nine Field Isolates of *Aedes aegypti* with Different Resistance Levels to Lambda-Cyhalothrin and Relative Fitness of One Artificially Selected for Resistance. *PLoS ONE*. 2014;9.
- [26] Plernsub S, Stenhouse SA, Tippawangkosol P, et al. Relative developmental and reproductive fitness associated with F1534C homozygous knockdown resistant gene in *Aedes aegypti* from Thailand. *Trop. Biomed*. 2013;30:621–630.
- [27] Bourguet D, Guillemaud T, Chevillon C, et al. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evol. Int. J. Org. Evol*. 2004;58:128–135.
- [28] Hardstone MC, Huang X, Harrington LC, et al. Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol*. 2010;47:188–198.
- [29] Diniz DFA, Melo-Santos MAV de, Santos EM de M, et al. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasit. Vectors*. 2015;8.
- [30] Otali D, Novak RJ, Wan W, et al. Increased production of mitochondrial reactive oxygen species and reduced adult life span in an insecticide-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Bull. Entomol. Res*. 2014;104:323–333.
- [31] Alam M, Waqas Sumra M, Ahmad D, et al. Selection, Realized Heritability, and Fitness Cost Associated With Dimethoate Resistance in a Field Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol*. 2017;110:1252–1258.
- [32] Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol*. 1990;36:165–172.

- [33] Briegel H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J. Med. Entomol.* 1990;27:839–850.
- [34] Clements AN. *The biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.* 1st ed. Chapman & Hall; 1991.
- [35] Rivero A, Magaud A, Nicot A, et al. Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 2011;48:694–700.
- [36] Sawabe K, Mogi M. Differences in energy metabolism and adult desiccation resistance among three *Aedes* (*Stegomyia*) species (Diptera: Culicidae) from South Sulawesi, Indonesia. *J. Med. Entomol.* 1999;36:101–107.
- [37] Wang X, Hou Y, Saha TT, et al. Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017;114:E2709–E2718.
- [38] Dong D, Zhang Y, Smykal V, et al. HR38, an ortholog of NR4A family nuclear receptors, mediates 20-hydroxyecdysone regulation of carbohydrate metabolism during mosquito reproduction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2018;96:19–26.
- [39] Kaufmann C, Brown MR. Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol.* 2008;54:367–377.
- [40] Lounibos LP, Kramer LD. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and Vectorial Capacity for Chikungunya Virus. *J. Infect. Dis.* 2016;214:S453–S458.
- [41] Diniz MMC de SL, Henriques AD da S, Leandro R da S, et al. Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Rev. Saúde Pública.* 2014;48:775–782.
- [42] Belinato TA, Martins AJ, Valle D. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012;107:916–922.
- [43] Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, et al. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* *kdr* Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS ONE.* 2013;8.
- [44] Martins AJ, Ribeiro CD e M, Bellinato DF, et al. Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. *PLoS ONE.* 2012;7.
- [45] Porciani A, Diop M, Moiroux N, et al. Influence of pyrethroid-treated bed net on host seeking behavior of *Anopheles gambiae* s.s. carrying the *kdr* allele. *PLoS ONE.* 2017;12.
- [46] Diop MM, Moiroux N, Chandre F, et al. Behavioral cost & overdominance in *Anopheles gambiae*. *PloS One.* 2015;10:e0121755.
- [47] Kumar S, Thomas A, Samuel T, et al. Diminished reproductive fitness associated with the deltamethrin resistance in an Indian strain of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Trop. Biomed.* 2009;26:155–164.
- [48] Kumar S, Pillai MKK. Correlation between the reproductive potential and the pyrethroid resistance in an Indian strain of filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 2011;101:25–31.
- [49] Mostowy WM, Foster WA. Antagonistic effects of energy status on meal size and egg-batch size of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* 2004;29:84–93.
- [50] Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2015;15:112–118.
- [51] Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, et al. Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* Field Isolates. *PLoS ONE.* 2013;8.

- [52] Ndiath MO, Cailleau A, Diedhiou SM, et al. Effects of the *kdr* resistance mutation on the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* populations to *Plasmodium falciparum*: a hindrance for vector control. *Malar. J.* 2014;13.
- [53] Hemingway J, Vontas J, Poupardin R, et al. Country-level operational implementation of the Global Plan for Insecticide Resistance Management. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:9397–9402.
- [54] McCarroll L, Hemingway J. Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002;32:1345–1351.
- [55] Vézilier J, Nicot A, Lorgeril J, et al. The impact of insecticide resistance on *Culex pipiens* immunity. *Evol. Appl.* 2012;6:497–509.
- [56] Vontas J., Blass C., Koutsos A. C., et al. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.* 2005;14:509–521.
- [57] Cornet S, Gandon S, Rivero A. Patterns of phenoloxidase activity in insecticide resistant and susceptible mosquitoes differ between laboratory-selected and wild-caught individuals. *Parasit. Vectors.* 2013;6:315.
- [58] Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, et al. Reactive Oxygen Species Modulate *Anopheles gambiae* Immunity against Bacteria and *Plasmodium*. *J. Biol. Chem.* 2008;283:3217–3223.
- [59] Oliver SV, Brooke BD. The Role of Oxidative Stress in the Longevity and Insecticide Resistance Phenotype of the Major Malaria Vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *PLoS ONE.* 2016;11.
- [60] Gong M, Shen B, Gu Y, et al. Serine proteinase over-expression in relation to deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005;438:53–62.
- [61] Yang Q, Zhou D, Sun L, et al. Expression and characterization of two pesticide resistance-associated serine protease genes (*NYD-tr* and *NYD-ch*) from *Culex pipiens pallens* for metabolism of deltamethrin. *Parasitol. Res.* 2008;103:507–516.
- [62] Barón OL, Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA, et al. Differential Gene Expression from Midguts of Refractory and Susceptible Lines of the Mosquito, *Aedes aegypti*, Infected with Dengue-2 Virus. *J. Insect Sci.* 2010;10.
- [63] Gong M, Shen B, Gu Y, et al. Serine proteinase over-expression in relation to deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005;438:53–62.
- [64] Vontas J, Blass C, Koutsos AC, et al. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.* 2005;14:509–521.
- [65] Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, et al. Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9.
- [66] Berticat C, Bonnet J, Duchon S, et al. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol. Biol.* 2008;8:104.
- [67] Coon KL, Brown MR, Strand MR. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Mol. Ecol.* 25:5806–5826.
- [68] Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol. Ecol.* 23:2727–2739.
- [69] Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr. Opin. Virol.* 2015;15:97–102.

- [70] Bara J, Rapti Z, Cáceres CE, et al. Effect of Larval Competition on Extrinsic Incubation Period and Vectorial Capacity of *Aedes albopictus* for Dengue Virus. *PLoS ONE*. 2015;10.
- [71] Weitzel T, Collado A, Jöst A, et al. Genetic Differentiation of Populations within the *Culex pipiens* Complex and Phylogeny of Related Species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2009;25:6–17.
- [72] Zhou D, Zhang D, Ding G, et al. Genome sequence of *Anopheles sinensis* provides insight into genetics basis of mosquito competence for malaria parasites. *BMC Genomics*. 2014;15:42.
- [73] Mousson L, Vazeille M, Chawprom S, et al. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chiang Mai (Thailand) and relation with dengue transmission. *Trop. Med. Int. Health*. 2002;7:865–872.
- [74] Vasilakis N, Tesh RB. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr. Opin. Virol.* 2015;15:69–74.
- [75] Bolling BG, Vasilakis N, Guzman H, et al. Insect-Specific Viruses Detected in Laboratory Mosquito Colonies and Their Potential Implications for Experiments Evaluating Arbovirus Vector Competence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015;92:422–428.
- [76] Smith DL, Battle KE, Hay SI, et al. Ross, Macdonald, and a Theory for the Dynamics and Control of Mosquito-Transmitted Pathogens. *PLoS Pathog.* 2012;8.
- [77] Severson DW, Behura SK. Genome Investigations of Vector Competence in *Aedes aegypti* to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches. *Insects*. 2016;7:58.
- [78] Ohm JR, Baldini F, Barreaux P, et al. Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasit. Vectors* [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 26];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5848458/>.
- [79] Alout H, Roche B, Dabiré RK, et al. Consequences of insecticide resistance on malaria transmission. *PLOS Pathog.* 2017;13:e1006499.
- [80] Martins TAB and AJ. Insecticide Resistance and Fitness Cost. *Insectic. Resist.* [Internet]. 2016 [cited 2018 Jul 16]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/insecticides-resistance/insecticide-resistance-and-fitness-cost>.
- [81] Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop. Med. Int. Health*. 2013;18:564–577.
- [82] Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62:807–813.
- [83] Zhang Q, Hua G, Adang MJ. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Sci.* 2017;24:714–729.
- [84] Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, et al. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Appl. Entomol.* 127:29–32.
- [85] Paris M, David J-P, Despres L. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology*. 2011;20:1184–1194.
- [86] Chandra G, Bhattacharjee I, Chatterjee SN, et al. Mosquito control by larvivorous fish. *Indian J. Med. Res.* 2008;127:13–27.
- [87] Kant R, Haq S, Srivastava HC, et al. Review of the bioenvironmental methods for malaria control with special reference to the use of larvivorous fishes and composite fish culture in central Gujarat, India. *J. Vector Borne Dis.* 2013;50:1–12.
- [88] Dias CN, Moraes DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol. Res.* 2014;113:565–592.

[89] Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. Indian J. Med. Res. 2012;135:581–598.

**Table S1**

Fitness effects found in resistant mosquito strains	Effects	Known resistance mechanism associated with fitness cost	Tested resistant mosquito species	Origin	Reference	Family of insecticide associated with resistant	
Biometry	Wing size	<i>kdr</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Lab strain, lab selected strains	Jaramillo et al 2014, Plernsub et al 2013	Lambda-cyhalothrin, permethrin	
		Reduced	<i>ester, ace-1</i>	<i>Culex pipiens</i>	Filed strains	Bourguet et al 2004	Organophosphate
			Metabolic	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Experimental strain	Hardstone et al 2010	Permethrin
		No effect	NA	<i>Aedes aegypti</i>	Lab strain	Jaramillo et al 2014	Lambda-cyhalothrin
	Wing shape	Modified	NA	<i>Aedes aegypti</i>	Lab strain	Jaramillo et al 2014	Lambda-cyhalothrin
	Wet body weight of adults	Reduced	metabolic	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strains	Diniz et al 2015	Temephos
		No effect	metabolic	<i>Aedes aegypti</i>	Field strain	Diniz et al 2015	Temephos
		Increased	<i>kdr</i> , metabolic	<i>An. gambiae</i>	Lab selected strain	Otali et al 2014	Permethrin
	Dry body weight of adults	No effect	<i>kdr</i> , metabolic	<i>An. gambiae</i>	Lab selected strain	Otali et al 2014	Permethrin
	Body weight of larvae	Reduced	NA	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field selected strain	Alam et al 2017	Dimethoate
	Body weight of pupae	Reduced	metabolic	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strains	Diniz et al 2015	Temephos
No effect		NA	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i>	Field strain, field selected strain	Diniz et al 2015, Alam et al 2017	Temephos, dimethoate	
Developmental and reproductive parameters	Insemination	Reduced	<i>kdr V1016I</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Field strains	Belinato et al 2012	Deltamethrin, temephos
		No effect	<i>kdr V1016I + F1534C</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Experimental strain	Brito et al 2013	Deltamethrin
	Blood meal acceptance	Reduced	<i>kdr V1016I</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Field strains	Belinato et al 2012	Deltamethrin, temephos
		No effect	<i>kdr V1016I + F1534C</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Experimental strain	Brito et al 2013	Deltamethrin
	Relative amount of ingested blood	Reduced	<i>kdr V1016I</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strain, field strain	Martins et al 2012, Belinato et al 2012	Deltamethrin, temephos
		No effect	<i>kdr V1016I</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Field strains	Martins et al 2012, Belinato et al 2012	Deltamethrin, temephos
	Fecundity (number of eggs/female)	Reduced	<i>kdr V1016I, F1534C, metabolic, ace-1 G119S, kdr-west L1014F</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae, Culex quinquefasciatus</i>	Field strains, lab selected strains, experimental strains, field selected strains	Jaramillo et al 2014, Belinato et al 2012, Brito et al 2013, Martins et al 2012, Diniz et al 2015, Alout et al 2016, Alam et al 2017, Kumar et al 2009, Kumar et al 2011	Lambda-cyhalothrin, deltamethrin, temephos, Organophosphate, Dimethoate, Deltamethrin + piperonyl butoxide
		No effect	<i>kdr V1016I, F1534C, L1014S, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae</i>	Lab selected strains, field strains	Martins et al 2012, Belinato et al 2012, Diniz et al 2014, Plernsub et al 2013, Otali et al 2014	Temephos, deltamethrin, permethrin

<b>Embryonic development period</b>	No effect	NA	<i>Aedes aegypti</i>	Field strains	Diniz et al 2014	Temephos
<b>Proportion of egg laying females</b>	Reduced	NA	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strain	Martins et al 2012	Deltamethrin
<b>Hatchability (% d'œufs viables)</b>	Reduced	<i>metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strains, field strains	Martins et al 2012, Diniz et al 2015, Alam et al 2017	Deltamethrin, temephos, dimethoate
		NA	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strains	Kumar et al 2009	Deltamethrin + piperonyl butoxide
	NA	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strains	Kumar et al 2011	Deltamethrin + piperonyl butoxide	
	Increased	<i>kdr F1534C</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strains, field strains	Plernsub et al 2013, Diniz et al 2014	Permethrin, temephos
<b>Time to pupation</b>	No effect	<i>kdr V1016I, F1534C, L1014S, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae</i>	Lab selected strains, lab strain, experimental strain, field strains	Jaramillo et al 2014, Belinato et al 2012, Brito et al 2013, Martins et al 2012, Diniz et al 2014, Otali et al 2014	Lambda-cyhalothrin, deltamethrin, temephos, permethrin
		<i>kdr L1014S, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strain, field strains, field selected strains	Martins et al 2012, Diniz et al 2015, Otali et al 2014, Alam et al 2017	Deltamethrin, temephos, dimethoate
<b>Pupae formation rate</b>	No effect	<i>Kdr F1534C, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strain, lab strain, field strains, experimental strain	Jaramillo et al 2014, Plernsub et al 2013, Martins et al 2012, Hardstone et al 2010	Lambda-cyhalothrin, permethrin, temephos
		Reduced	NA	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strain	Martins et al 2012
<b>Development time until adult</b>	No effect	<i>kdr V1016I, F1534C, L1014S, metabolic, ace-1, ester 1, 4</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strains, field strains, field selected strains, experimental strain	Brito et al 2013, Martins et al 2012, Plernsub et al 2013, Alam et al 2017, Hardstone et al 2010	Deltamethrin, temephos, permethrin, dimethoate
		Increased	NA	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strain, lab strain, field strain	Jaramillo et al 2014, Diniz et al 2014
<b>Larvae viability</b>	Reduced	NA	<i>Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus</i>	Field strain, field selected strain	Diniz et al 2014, Alam et al 2017	Temephos, dimethoate
		NA	<i>Aedes aegypti</i>	Field strains	Diniz et al 2014	Temephos
	No effect	<i>metabolic</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Experimental strain	Hardstone et al 2010	Permethrin
<b>Sex-ratio</b>	Reduced	<i>kdr F1534C</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strain	Plernsub et al 2013	Permethrin
		<i>metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strains, lab strain, field strains, field selected strains	Jaramillo et al 2014, Martins et al 2012, Diniz et al 2014, Diniz et al 2015, Alam et al 2017	Lambda-cyhalothrin, deltamethrin, temephos, dimethoate
<b>Adult survival</b>	Reduced	<i>kdr L1014S, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae</i>	Lab selected strains, field strains	Jaramillo et al 2014, Martins et al 2012, Diniz et al 2015, Otali et al 2014	Lambda-cyhalothrin, deltamethrin, temephos, permethrin

		No effect	<i>kdr V1016I, F1534C, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus</i>	Field strains, experimental strains, field selected strains	Belinato et al 2012, Brito et al 2013, Martins et al 2012, Diniz et al 2014, Alam et al 2017	Deltamethrin, temephos, dimethoate
	<b>Locomotor activity</b>	Increased	<i>kdr V1016I + F1534C</i>	<i>Aedes aegypti</i>	experimental strain	Brito et al 2013	Deltamethrin
<b>Vector competence</b>	<b>Plasmodium infection</b>	Increased	<i>ace-1 G119S, kdr-west L1014F, kdr-east L1014S</i>	<i>Anopheles gambiae, Anopheles coluzzi</i>	Experimental strain, field strains	Alout et al 2013, Ndiath et al 2014	Organophosphate, Carabate, Pyrethroid
	<b>Plasmodium infection</b>	Reduced	<i>kdr L1014F</i>	<i>Anopheles gambiae,</i>	Field strains	Hemingway et al 2013	Deltamethrin
	<b>Filariasis infection</b>	Reduced	metabolic	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Field strains	L. McCarroll et al, 2002	Organophosphate
<b>Energy</b>	<b>Lipids</b>	Reduced	<i>ester 4, ace-1, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Culex pipens, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strains, experimental strains	Diniz et al 2015, Rivero et al 2011, Hardstone et al 2010	Temephos, Organophosphate, permethrin
		No effect	<i>kdr L1014S, ace-1, Ester B1, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Anopheles gambiae, Culex pipiens</i>	Field strain, experimental strain, lab selected strain	Diniz et al 2015, Otali et al 2014, Rivero et al 2011	Temephos, permethrin, Organophosphate
	<b>Glycogen</b>	Reduced	metabolic	<i>Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus</i>	Lab selected strain, Experimental strain	Diniz et al 2015, Hardstone et al 2010	Temephos, permethrin
		Increased	<i>kdr L1014S, metabolic</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Lab selected strain	Otali et al 2014	Permethrin
		No effect	<i>ace-1, ester B1, ester 4, metabolic</i>	<i>Aedes aegypti, Culex pipiens</i>	Lab selected strain, field strain, experimental strain	Diniz et al 2015, Rivero et al 2011	Temephos, Organophosphorus
	<b>Other sugars</b>	Reduced	<i>agfce-1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strain	Rivero et al 2011	Organophosphate
		No effect	<i>ester B1</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strain	Rivero et al 2011	Organophosphate
	<b>Total energy content</b>	Reduced	<i>ace-1, ester 4,</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strain	Rivero et al 2011	Organophosphate
		No effect	<i>ester B1</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strain	Rivero et al 2011	Organophosphate
	<b>Metabolic rate (CO2 production)</b>	Reduced	<i>kdr L1014S, metabolic</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Lab selected strain	Otali et al 2014	Permethrin
<b>Body water content</b>		Increased	<i>kdr L1014S, metabolic</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Lab selected strain	Otali et al 2014	Permethrin
<b>Host seeking</b>	<b>regarding vector control*</b>	Modified	<i>kdr-west L1014F</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Experimental strains	Porciani et al 2017	Pyrethroid
		Reduced	<i>kdr-west L1014F</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Experimental strain	Diop et al 2015	Pyrethroid
		Increased	<i>kdr-west L1014F</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Experimental strain	Diop et al 2015	Pyrethroid
<b>Mating success</b>		Reduced	<i>ace-1, ester B1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strains	Berticat et al 2002	Organophosphate
		No effect	<i>kdr F1534C</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Lab selected strain	Plernsub et al 2013	Permethrin
<b>Predation success</b>	<b>Larvae</b>	Increased	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strains	Berticat et al 2004	Organophosphate
		No effect	<i>ester B1</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strain	Berticat et al 2004	Organophosphate
	<b>Adults</b>	Increased	<i>ester 4, ester B1</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strains	Berticat et al 2004	Organophosphate
		No effect	<i>ace-1</i>	<i>Culex pipiens</i>	Experimental strain	Berticat et al 2004	Organophosphate
<b>Immune defense</b>	<b>Phenoloxidase activity</b>	Increased	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Lab selected strain	Cornet et al 2013	Organophosphate
		No effect	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Field strain	Cornet et al 2013	Organophosphate

<b>Defensin, Cecropin, Gambicin, Transferrin,</b>	Increased	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Lab selected strain	Vézilier et al 2012	Organophosphate
		<i>kdr, metabolic</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Lab selected strains	Vontas et al 2005 Vontas et al 2007	Permethrin, DDT,
<b>Nitric oxidase synthase</b>	No effect	<i>ace-1, ester 4</i>	<i>Culex pipiens</i>	Field strain	Vézilier et al 2012	Organophosphate
<b>Reactive oxygen species (ROS)</b>	Increased	<i>kdr L1014S, metabolic</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	Lab selected strain	Otali et al 2014	Permethrin
<b>Serine proteases</b>	Modified	<i>kdr V1016I, F1534C metabolic</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Experimental strains	Dusfour et al 2015	Deltamethrin
	Increased	metabolic	<i>Culex pipiens</i>	Lab selected strains	Gong et al 2005	Deltamethrin

## 1.6.2. De l'intérêt des lignées isofemelles pour l'étude du coût de la résistance

Une lignée isofemelle est une lignée d'insectes fondée initialement depuis une seule femelle inséminée collectée dans la nature sur le même site de reproduction (Parsons, Hosgood, and Lee 1967). L'avantage est qu'il n'y a pas besoin de connaître les phénotypes des femelles parentales, et pour un trait donné, la valeur moyenne et la plasticité sont génétiquement indépendantes (J. R. David et al. 2004). Cette méthode a été initialement mise en place pour la recherche sur les traits morphologiques chez *Drosophila melanogaster*, plus tard elle a été étendue au comportement, à la physiologie, et aux études écologiques (Hosgood and Parsons 1971) (Nouhaud et al. 2016) (Ramniwas and Kajla 2012).

Des lignées isofemelles résistantes et sensibles de *Drosophila melanogaster* issues de la même population sauvage ont déjà été utilisées pour étudier la variation génétique, le coût d'appétit et la résistance croisée à de multiples insecticides (T. Miyo et al. 2001; Takahiro Miyo and Oguma 2002; Takahiro Miyo, Akai, and Oguma 2000). Chez les moustiques, cette méthode a été appliquée à la recherche afin d'évaluer l'influence de la dérive génétique sur la taxonomie, en particulier la taille et la forme des ailes des moustiques (Jirakanjanakit, Leemingsawat, and Dujardin 2008). De plus, les populations isofemelles peuvent diminuer au maximum le bruit de fond génétique. Ainsi des lignées isofemelles d'*Aedes aegypti* ont été choisies pour mesurer les variations dans la susceptibilité à une infection virale et les mécanismes moléculaires associés (Tardieux 1991, Miller et Mitchell 1991).

## 2. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

---

La lutte contre les maladies transmises par les moustiques en Guyane a principalement été réalisée grâce à des luttes anti-vectorielles (pour la dengue, le chikungunya et le Zika), en plus des vaccins 17D (pour la fièvre jaune) et de la chimioprophylaxie (pour le paludisme). Les stratégies de lutte antivectorielle reposaient largement sur l'application d'insecticides en tant que première ligne de défense pour lutter contre les populations de moustiques au cours de plusieurs décennies (Y. Epelboin et al. 2018). Le programme d'éradication des moustiques a été lancé en mai 1949 avec la pulvérisation résiduelle intérieure de DDT. Cependant, entre 1959 et 1963, la résistance au DDT et à la dieldrine s'est développée chez *Aedes aegypti*. L'utilisation d'organophosphorés, tels que le malathion, le fenthion et le fénitrothion, était très controversée à cette époque, en raison de leur menace pour la santé humaine, de la faible persistance des produits et de leur coût élevé. Le contrôle chimique était donc dominé par le DDT jusqu'en 1991, où l'interdiction internationale du DDT a été mise en œuvre dans au moins 26 pays à travers le monde, cette molécule ayant été remplacée par la deltaméthrine. Depuis 1992, la pulvérisation spatiale de malathion a été utilisée contre *Aedes aegypti* et également pour lutter contre les moustiques nuisibles jusqu'à son interdiction par l'Union Européenne en 2009. Ainsi depuis 2010, bien que la résistance à la deltaméthrine s'aggrave, cette molécule reste la seule molécule autorisée pour la lutte chimique contre les moustiques adultes.

Parallèlement, en Guyane Française, la dengue devient une maladie hyper-endémique à cause de sa fréquence d'émergence (Adde et al. 2016). Le chikungunya est apparu lors de l'épidémie de 2015 (Girod et al. 2016), et le Zika lors d'une épidémie de 36 semaines (L. Epelboin et al. 2016).

Afin d'établir le meilleur compromis entre l'efficacité de la lutte et l'augmentation de la résistance, il faut tout d'abord comprendre les effets de la résistance dans le contexte de la transmission de la maladie chez le moustique. L'interaction entre la résistance aux insecticides et l'infection parasitaire chez le moustique a déjà été observée (Alout et al. 2013, 2014). La complexité des mécanismes provoqués par la résistance aux insecticides induit des changements physiologiques et des effets pléiotropes sur le système immunitaire qui peuvent causer des variations de compétence vectorielle (Rivero et al. 2010). Dans le cas d'infection arbovirale aucune étude n'a encore été publiée.

Pour répondre à cette problématique, dans ce projet, nous allons nous intéresser à l'impact de la résistance à la deltaméthrine sur la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* pour le chikungunya, à comprendre l'impact de la résistance sur la multiplication du virus, sa propagation dans le corps du moustique. Plus précisément, nous voudrions investiguer les rôles de différents mécanismes de résistance pendant la transmission de virus, tel que comment les

résistances *kdr* et métabolique collaborent ou s'attribuent des tâches. De plus, le coût de résistance qui peut influencer la capacité vectorielle des moustiques et le contrôle vectoriel est aussi un sujet important à étudier si le temps le permet. Enfin, l'évolution virale entre différents organes et différentes lignées est aussi intéressant, et servira à prédire la vitesse de mutation du virus dans les populations résistantes et évaluer la possibilité de déclenchement d'une épidémie.

Ces données permettront de mieux décrire la dynamique épidémique dans les Amériques, de fournir des éléments d'anticipation dans les territoires où la résistance est sélectionnée ou bien dans les pays où certaines arboviroses ont un risque d'émerger.

Des lignées isofemelles de phénotypes résistants et différents seront le modèle pour tous les travaux, elles ont été isolées à partir d'une population de Guyane qui permet de mieux comprendre les interactions entre la résistance aux insecticides et la compétence vectorielle sans trop de bruit de fond génétique.

Des objectifs plus spécifiques seront de :

- (i) Caractériser les profils et les mécanismes de résistance aux pyréthrinoides.
- (ii) Évaluer l'influence des phénotypes de résistance sur la compétence vectorielle.
- (iii) Investiguer les mécanismes de résistance sur la compétence vectorielle (particulièrement la barrière de l'intestin moyen).
- (iv) Détecter les coûts de résistance sur les traits d'histoire de vie.
- (v) Tracer l'évolution virale entre différents organes et différentes lignées.
- (vi) Interpréter la capacité vectorielle des lignées isofemelles.

### 3. MISE EN PLACE DES METHODES

---

## 3.1. Production et caractérisation de lignées isofemelles

Dans le but de limiter la variabilité interindividuelle, nous avons produits des lignées isofemelles (appelées ci-après IR03, IR05, IR13 et IR36) qui présentent après plusieurs générations d'élevage en insectarium, différents niveaux de résistance à la deltaméthrine. L'objectif a été d'évaluer les variations potentielles du coût de la résistance aux insecticides entre ces lignées, ainsi que l'influence de la résistance sur la compétence vectorielle.

### 3.1.1. Étapes de l'obtention des lignées

**(1) Collecte des moustiques F0** : les moustiques *Aedes aegypti* de la génération F0 ont été récoltés au stade larvaire sur le terrain à "Ile Royale" en Guyane française (5,287° N, 52,590° W). Ce territoire français d'outre-mer situé en Amérique du sud est assujéti à la législation française et européenne en matière d'utilisation des insecticides. Les larves ont été transférées du terrain à l'insectarium de l'Institut Pasteur de la Guyane (~80% humidité et 28°C, 12h jour : 12h nuit).

**(2) Isolation des lignées isofemelles** : après émergence, les adultes ont été laissés libres de s'accoupler. Des souris ont été proposées aux femelles pour prendre un repas sanguin. Les femelles ont été individualisées avant oviposition. Un total de 60 femelles a été isolé, nommées de IR1 à IR60, les femelles qui n'ont pas pondu ou qui ont pondu moins de cent œufs ont été éliminées, finalement seulement 9 femelles et leurs œufs ont été conservés individuellement.

**(3) Amplification des lignées** : Initialement il y avait 9 lignées qui ont été amplifiées par croisements consanguins des descendants et maintenues en colonie. 5 lignées ont été perdues pendant la production de colonie, mais IR03, IR05, IR13 et IR36 se sont bien maintenues.

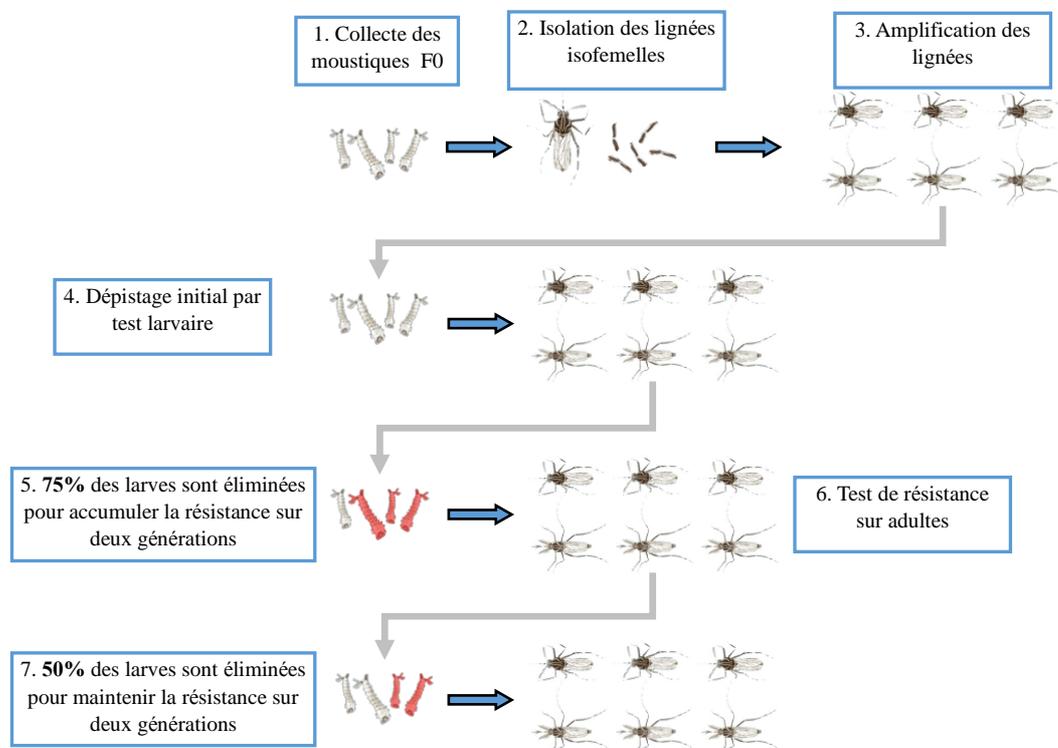
**(4) Dépistage initial par test larvaire** : Les larves de 4<sup>ème</sup> stade de ces 4 lignées ont été utilisées pour évaluer rapidement le niveau initial de résistance à la deltaméthrine. Ce test larvaire a été effectué avec une dose de 0,001mg/L par le protocole OMS modifié. IR03 et IR05 ont montré une mortalité < 96%, en revanche, 100% pour IR13 et IR36.

**(5) Accumulation de la résistance sous la pression de sélection** : les lignées IR03 et IR05 ont été sélectionnées à la deltaméthrine en éliminant 75% des larves toutes les 2 générations de la 8<sup>ème</sup> génération jusqu'à la 12<sup>ème</sup> génération par exposition à la LD<sub>75</sub>. Les lignées IR13 et

IR36 ont été élevées simultanément sans aucune pression de sélection à la deltaméthrine jusqu'à la 4<sup>ème</sup> génération. Travailler avec les larves permet de gagner le temps de développement de la larve à l'adulte, afin d'accélérer le processus de production, car les moustiques sont les matériels de base des autres manipulations, il faut les produire le plus vite possible. De plus, la dose éliminant 75% de femelles adultes est plus élevée que celle éliminant les mâles adultes, mais au stade larvaire, il est possible d'utiliser une dose pour éliminer presque autant de mâles que de femelles, afin de conserver au maximum un équilibre sexuel.

**(6) Surveillance par test de résistance sur adultes** : un test sur femelles adultes a été effectué pour surveiller la croissance des niveaux de résistance par le protocole OMS. L'utilisation de mâles n'est pas recommandée pour le test de la résistance, car ils sont généralement plus petits, ont une espérance de vie plus courte et sont plus fragiles que les femelles et ont donc tendance à avoir des taux de mortalité plus élevés. Les tests de sensibilité sont donc effectués en utilisant uniquement des moustiques femelles.

**(7) Maintien du niveau de résistance** : une fois que IR03 et IR05 ont atteint le niveau de résistance désiré (> 40 fois plus forte que la souche de référence), il faut les maintenir en éliminant 50 % des larves toutes les 2 générations.



**Figure 10. Schéma détaillé de production des lignées isofemelles.**

### 3.1.2. Caractérisation de la résistance des isofemelles

De multiples mécanismes de résistances ont été trouvées chez les moustiques guyanais, y compris kdr provoquée par les mutations non synonymes V1016I et F1534C, la résistance métabolique conduisant à la surexpression de certains gènes de détoxification, la majorité de ces gènes de détoxification appartiennent à la famille des cytochromes P450, GST et CCE. En outre, d'autres enzymes comme les trypsines de digestion appartenant à la voie de détoxification ont été également différemment exprimés chez les moustiques résistants. Ici, la caractérisation de la résistance des isofemelles a été réalisée par les tests suivants : le test phénotypique en test en tubes, le test de génotypage sur l'ADN et le test transcriptomique sur l'ARNm.

#### 3.1.2.1. Phénotypage de la résistance par les tests en tubes

L'expression phénotypique de résistance à la deltaméthrine peut être mesurée en utilisant les tests en tube sur femelles adultes recommandé par l'OMS ("WHO | Guidelines for Testing" 2005) isofemelles et la souche de référence Nouvelle Orléans (NO), ont été triées et placées par lots de 25 dans des tubes d'observation contenant des papiers non imprégnés (25 femelles par tube, 4 répliques, soit 100 femelles). Elles ont ensuite été exposées pendant 1h au papier imprégné avec de la deltaméthrine (CAS-No 52918-63-5, sigma-Aldrich, Germany) dissoute dans de l'huile de silicone et de l'acétone, puis placées 24h en observation. Deux répliques de femelles exposés à du papier avec seulement de l'acétone ont été utilisés comme contrôle (Figure 11).

**Test 1**, les moustiques sont exposés à la dose diagnostique de la résistance utilisée au laboratoire qui est de 0,06% de deltaméthrine (Jirakanjanakit et al. 2007). Deux mesures ont alors été obtenues lors du test. Premièrement, le nombre de femelles sous effet choc ou « KD » (knock-down = tomber par terre sur le dos, incapacité à voler ou se déplacer) a été enregistré toutes les 3 minutes pendant l'heure d'exposition. Deuxièmement, la mortalité a été enregistrée après 24h (% 24hM).

**Test 2**, les moustiques sont exposés à une série de dilutions de deltaméthrine provoquant entre 0 et 100% de mortalité. La mortalité a été enregistrée après 24h (% 24hM) à chaque dose pour évaluer le niveau de résistance.

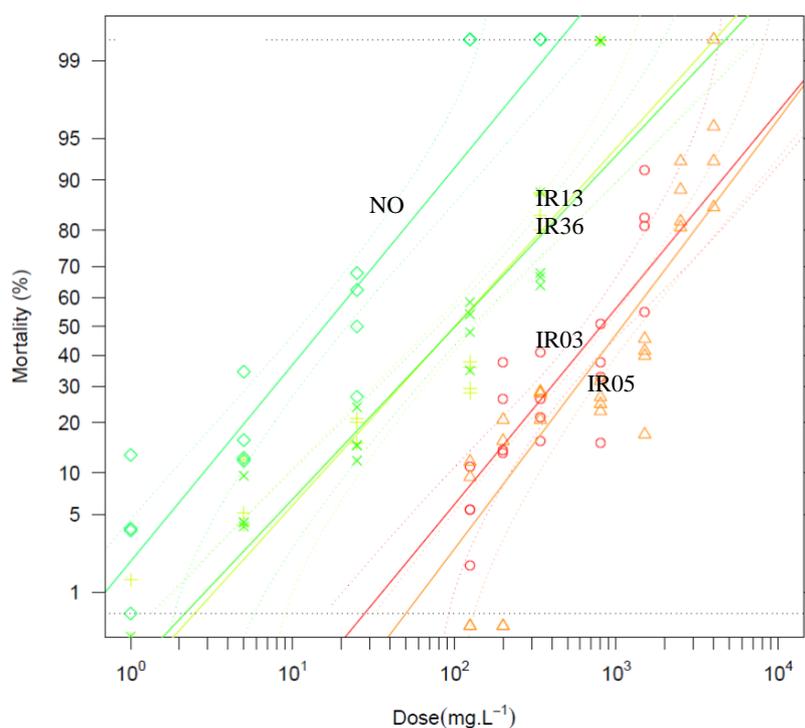
Les analyses statistiques ont été réalisées dans le logiciel R, version 3.2.0, en utilisant un script « bioRassay » rédigé par Milesi et al (Milesi, Pocquet, and Labbé 2013). Les résultats incluent : KD 1h, le pourcentage de moustiques « knock-down » après 1 heure d'exposition au papier imprégné de 0,06% de deltaméthrine ; KDT50, le temps théorique qui permet d'abattre 50% de la population KD exposée au papier imprégné de 0,06% de deltaméthrine; M % 24h, la mortalité des moustiques après 1 heure d'exposition au papier imprégné de 0,06% de deltaméthrine, DL50, la dose létale 50% ; Résistance Ratio (RR50), qui est décrit comme la DL50 de la population testée divisée par la DL50 de la souche de référence.



**Figure 11. Test de l'adulte.** Quatre répliques contenant des papiers imprégnés d'insecticide, avec coton mouillé à 10% de sucre (coton bleu). Deux répliques contenant des papiers imprégnés avec seulement de l'acétone comme contrôle (coton jaune).

**Table 1. Résultats des tests en tubes des lignées isofemelles et de la souche sensible NO.**

Moustiques	KD 1h	KDT <sub>50</sub>	M % 24h	RR <sub>50</sub>	[95% CI]	
IR03 (F12)	100%	6 min	25%	51,5	37,3	71,2
IR05 (F12)	42%	+ 60 min	26%	69,5	50.8	95.2
IR13 (F4)	100%	5 min	96%	6.42	4.56	9.03
IR36 (F4)	100%	5 min	97%	6,47	4,59	9,10
NO	100%	5 min	100%	1	0	0



**Figure 12. Graphique des tests dose-réponse des lignées isofemelles et NO.**

Les tests en tubes sur la souche NO indiquent qu'il a fallu 5 minutes pour que 50% des moustiques présentent l'effet choc lors de l'exposition au papier imprégné de la dose diagnostique (0,06% de deltaméthrine), et 1 heure d'exposition pour que 100% des moustiques

soient sous effet choc. 100% d'entre eux sont morts sur 24 heures d'observation. Par conséquent, le témoin NO était sensible avec RR50 égal à 1 (Table 1 et Figure 12).

Dans le cas des lignées isofemelles, pour IR 03, il a fallu 6 minutes pour que 50% des moustiques tombent lors de l'exposition au papier imprégné de la dose diagnostique et 1 heure d'exposition pour 100% des moustiques, 25% d'entre eux sont morts au cours des 24 heures d'observation, 75% des moustiques se sont donc réveillés en raison de la présence d'une résistance métabolique. Selon l'analyse de dose-réponse, la résistance d'IR 03 était 51,5 fois plus forte que celle de NO.

Pour IR 05, seulement 42% des moustiques étaient « knock-down » après 1 heure d'exposition et 26% d'entre eux sont morts, 16% se sont réveillés après 24 heures d'observation. Et IR 05 était 69,5 fois plus résistant que le NO.

Pour IR 13 (36), il faut 5 min pour faire tomber 50% des moustiques exposés à la dose diagnostique et 100% des moustiques sont tombés après 1 heure d'exposition, 96% (97%) d'entre eux sont morts, ce qui signifie que moins de 4% se sont réveillés en 24 heures observation.

Ainsi, IR03 et IR05 sont sélectionnées sous les mêmes processus, mais différents profils résistants ont été mis en évidence par les tests en tubes (Chi,  $P < 0,001$ ). IR13/36 ont montré une faible résistance par rapport à la souche NO, mais elles sont plus sensibles comparées à IR03 et IR05 (Chi2,  $P < 0,0001$ ).

### 3.1.2.2. Génotypage : V1016I et F1534C

l'ADN de femelle adulte individualisée a été extrait par « DNA extraction kit » (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 30 moustiques par lignée, pour toutes les lignées IR03, IR05, IR13 et IR36, les amorces et les sondes sont conçues par Dusfour et al (Dusfour et al. 2015), présentés dans la Table 2.

Le mélange PCR est composé de 12,5  $\mu$ l de « Taqman genotyping Master Mix » (Applied Biosystems, USA), 1,8  $\mu$ l de 10  $\mu$ M d'amorce reverse, 1,8  $\mu$ l de 10  $\mu$ M d'amorce forward, 0,5  $\mu$ l de 10  $\mu$ M de sonde pour allèle de type sauvage et 0,5  $\mu$ l of 10  $\mu$ M sonde pour allèle mutant, 0,9  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, et 3  $\mu$ l d'échantillon d'ADN. Les conditions de thermocyclage étaient : une étape de dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C suivie de 45 cycles composés d'une dénaturation de 15 sec à 95°C, d'une hybridation de 1 minute à 60°C et d'une étape post-read de 1 minute à 60°C.

**Table 2. Amorces et sondes utilisées pour le génotypage *kdr***

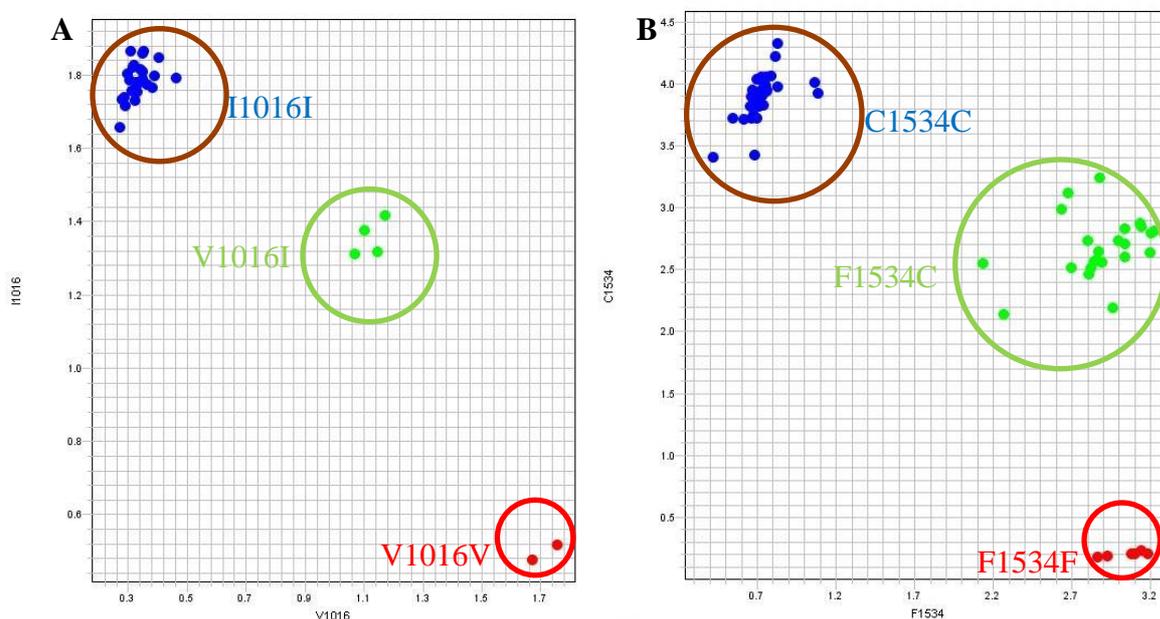
Mutation <i>kdr</i>	Amorces et sondes <sup>1</sup>	Séquence d'amorces (5' - 3')
<b>V1016I</b>	1016-primer F	GCT-AAC-CGA-CAA-ATT-GTT-TCC-C
	1016-primer R	CAG-CGA-GGATGA-ACC-GAA-AT
	Val1016-probe	VIC <sup>2</sup> - CAC-AGG-TAC-TTA-ACCTTT-T
	Iso1016-probe	FAM <sup>3</sup> -CAC-AGA-TAC-TTA-ACC-TTT-TC
<b>F1534C</b>	Phe1534 primer F	GAT-GAT-GAC-ACC-GAT-GAACAG-ATC
	Cys1534 primer R	CGA-GAC-CAA-CAT-CTA-GTA-CCT
	Phe1534-probe	VIC-AAC-GAC-CCG-AAG-ATG-A
	Cys1534-probe	FAM- ACGACC-CGC-AGA-TGA

<sup>1</sup> Chaque sonde consiste en un fluorochrome émetteur (reporter) 5', un fluorochrome suppresseur (quencher) non-fluorescent 3' et un minor groove binder à l'extrémité de 3'.

<sup>2</sup> 6-VIC dye fluorescence à l'extrémité de 5' pour la détection d'allèle de type sauvage.

<sup>3</sup> FAM dye fluorescence à l'extrémité de 5' pour la détection d'allèle mutant.

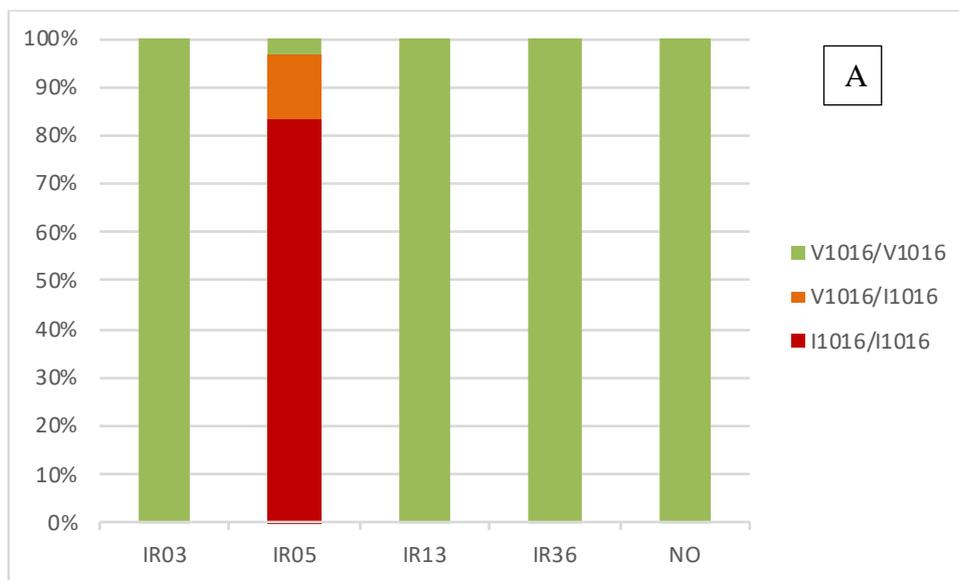
La discriminante des V1016I et F1534C a été réalisée avec un système StepOnePlus Real-Time PCR version 2,3 (Life technologies, Gaithersbourg, MD, USA), présenté en Figure 13.

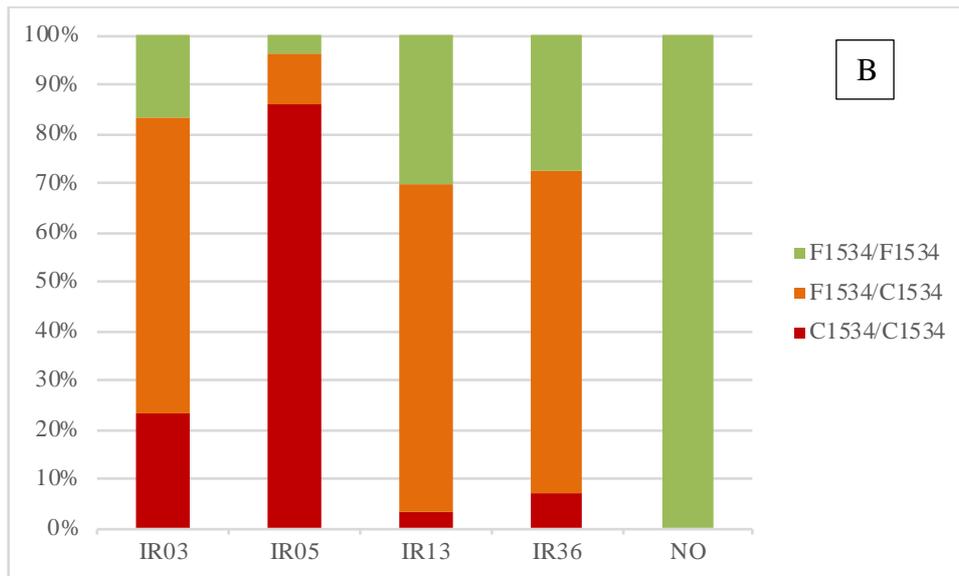


**Figure 13. Discrimination pour le génotypage de V1016I (A) et F1534C (B) pour IR05.**

**Table 3. Génotypage kdr pour les lignées isofemelles et NO : proportion de génotypes (V / V, V / I, I / I, F / F, F / C et C / C), fréquence allélique (V%, I%, F% et C%).**

Moustique	V1016I					F1534C				
	V/V	V/I	I/I	V%	I%	F/F	F/C	C/C	F%	C%
IR03 (F11)	100%	0%	0%	100	0	16,7%	60%	23, 3%	46,7	53,3
IR05 (F11)	3,3%	13,3%	83,3%	90	10	3,6%	10,7%	85,7%	9,9	90,1
IR13 (F3)	100%	0%	0%	100	0	30%	66,7%	3,3%	63,4	36,6
IR36 (F3)	100%	0%	0%	100	0	27,6%	65,5%	6,9%	60,4	39,6
NO	100%	0%	0%	100	0	100%	0%	0%	100	0





**Figure 14. Histogramme de génotypage de V1016I et F1534C chez les isofemelles et NO**

Les résultats pour la souche NO étaient en accord avec les tests en tubes, seul le génotype sauvage (homozygote sensible V1016V et F1534F) a révélé deux mutations.

IR03 (F11) présentait 100% du V1016V homozygote sensible de type sauvage et une fréquence de 53,3% de l'allèle résistant 1534C.

IR13 (F3) était similaire à IR03 avec 100% du V1016V homozygote de type sauvage et une fréquence de 36,6% de l'allèle résistant 1534C. IR36 (F3) a présenté le même cas que IR13 avec 100% du V1016V homozygote de type sauvage et une fréquence de 39,6% de l'allèle résistant 1534C.

IR05 (F11) était la seule lignée présentant une forte proportion des deux mutations, présentant une fréquence de 81,5% d'allèle résistant 1016I et 81,5% d'allèle résistant 1534C.

### 3.1.2.3. Etude transcriptomique pour la résistance métabolique

#### 3.1.2.3.1. Protocole de PCR métabolique

L'ARNm dans l'intestin moyen a été extrait individuellement de chaque lignée (environ 30 échantillons par lignée) avec le kit RNeasy de Qiagen, selon les instructions du fabricant. 30 moustiques par lignée, pour toutes les lignées IR03, IR05 et IR13. L'intestin moyen est l'organe où sont rassemblés les protéines de détoxification et de digestion. La concentration et la qualité de l'ARN complet ont été détectées avec un spectrophotomètre (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific).

La concentration d'ARN ajusté était de 60 ng/μL pour tous les échantillons, l'ARN a été traité avec de la DNase afin d'éviter toute contamination avec l'ADN génomique en utilisant le kit Ambion Turbo DNA-free de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Des brins de synthèse d'ADN complémentaire (cDNA) ont été réalisés avec le kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), en suivant le protocole du fabricant.

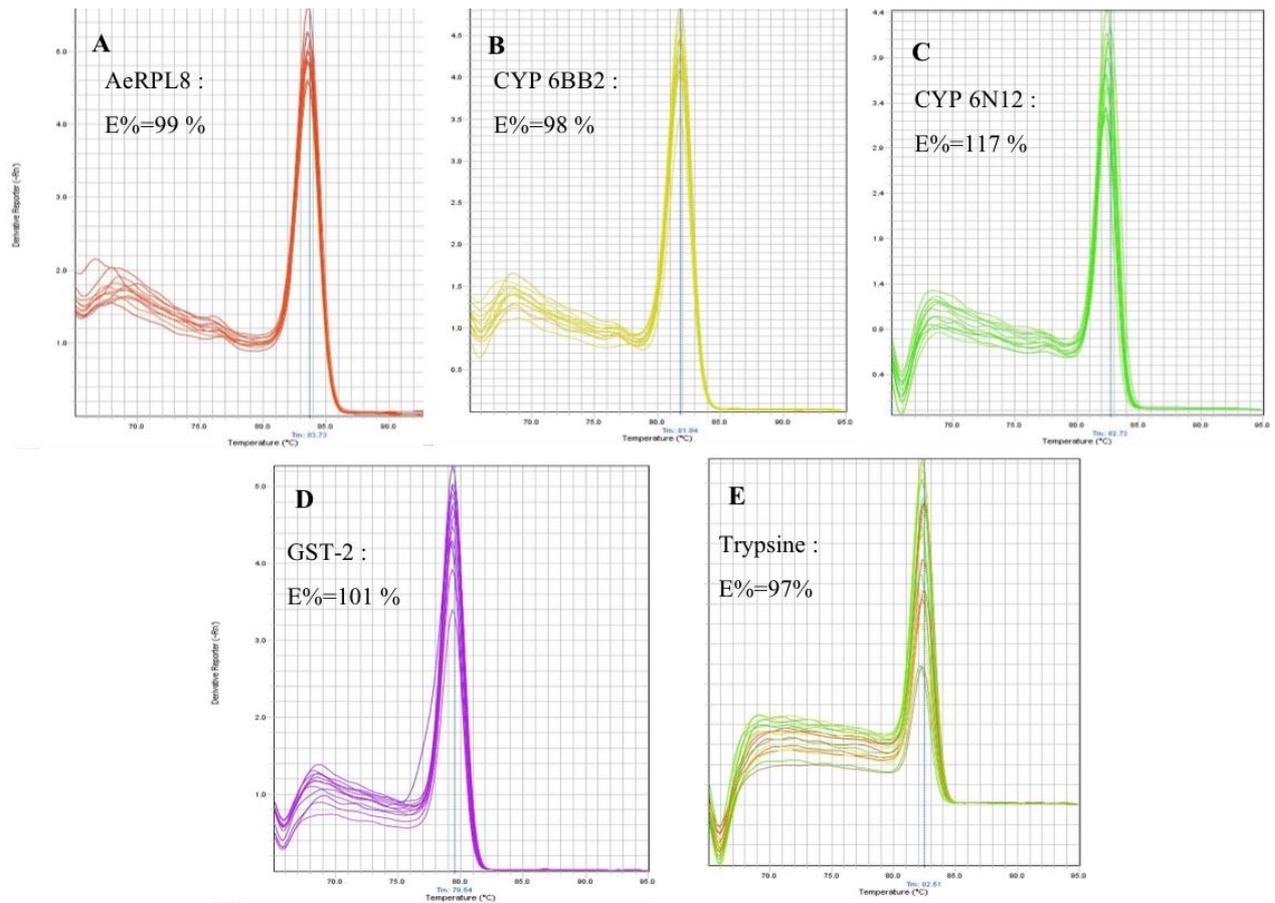
Les amorces pour ces gènes (Table 4) ont été conçues par Dusfour et al (Dusfour et al. 2015), les gènes candidats incluent : un gène de référence RpL8 ; 2 gènes venant de la famille CYP450 (CYP6BB2, CYP6N12) ; un gène venant de la famille GST, (GST2) ; en plus d'un gène de trypsine. Parce que tous ces gènes y compris le gène de trypsine se sont exprimés différemment chez les populations résistantes au deltaméthrine en Guyane (Dusfour et al. 2015; Faucon et al. 2015).

**Table 4. Séquences d'oligonucléotides pour PCR.**

Gène	Accession No.	Type d'enzyme	Amorces
RpL8	AGAP005802	60S protéine ribosomique L8	Fw-CCT-CGG-GTA-ACT-ACG-CTT-CC
			Rv -CCG-CCA-GCA-ACA-ATA-CCA-AC
CYP6BB2	AAEL014893	Cytochrome P450	Fw-AAT-CCC-GAC-ACC-CAT-ACT-GC
			Rv -CGC-AGC-AAC-GTA-ACC-AAT-CC
CYP6N12	AAEL009124	Cytochrome P450	Fw -GCG-CTT-CGG-TAT-GAT-GCA-AG
			Rv -TCA-CCA-CTC-TAC-AGC-TTC-TGG
GST2	AAEL007951	Glutathion transférase	Fw -TGC-CGG-TGC-TAG-ACG-ATA-AC
			Rv -ACA-CCG-CTC-TCG-AAG-TGA-AG
Trypsine	AAEL013712	Trypsine	Fw -TCC-GAA-ATA-CGA-TGA-TGC-TG
			Rv -TAT-TAC-CCC-AGC-CTG-AAA-CC

Fw = amorce forward ; Rv = amorce reverse. Le RpL8 est le gène de référence.

Une échelle de dilution des amorces a été utilisée pour mesurer l'efficacité de la PCR  $E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) * 100$  (Pfaffl 2001). La quantité de l'ARN extrait d'un intestin moyen peut seulement permettre de tester l'expression de quatre gènes, en considérant avec leur efficacité de PCR et la courbe de fusion n'ayant qu'un pic (Figure 15), les gènes CYP6BB2, CYP6N12, GSTe2, Trypsine ont été choisis comme les meilleurs candidats.



**Figure 15. Courbe de fusion et efficacité de PCR pour des gènes candidats.** Condition de sélection : la courbe n'a qu'un pic, leur efficacité est autour de 100%.

La qPCR a été réalisée selon le protocole de Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les mélanges réactionnels ont été faits dans des microtubes de 1,5 mL, un pour chaque set d'amorce, contenant 7,5  $\mu$ L de SYBR Green Master Mix, 3,5  $\mu$ L d'eau Nulease-Free, 0,5  $\mu$ L d'amorces forward et reverse (10  $\mu$ M), et 3  $\mu$ L de cDNA, pour un volume total de 15  $\mu$ L. Ensuite, les échantillons ont été répartis sur des microplaques MicroAmp Optical 96-well microplates (Applied Biosystems) avec 3 réplicas. Les conditions de thermocyclage étaient : une étape de dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une dénaturation de 15 sec à 95°C, de 20 sec à 62°C, de 30 sec à 60°C et d'une étape melt curve, les données ont été analysées directement par le logiciel StepOne Software version 2.3.

### 3.1.2.3.2. *Analyse des données*

Selon Pfaffl, la quantification relative du niveau d'expression des gènes cibles dans l'intestin moyen d'un moustique individuel testé est comparé à celle de la souche NO en utilisant RpL8 comme gène de référence (Pfaffl 2001).

La quantification relative du niveau d'expression des gènes a été déterminée en utilisant la méthode comparative Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (conçue par PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, CA) avec la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , les résultats de la qRT-PCR ont été normalisés en utilisant le gène RpL8.

Par exemple, pour quantifier le niveau d'expression du gène CYP 6BB2 chez la lignée IR03 :

$$\Delta Ct (IR03) = Ct (CYP6BB2) - Ct (\text{référence RpL8}) ;$$

$$\Delta Ct (NO) = Ct (CYP6BB2) - Ct (\text{référence RpL8}) ;$$

$$\Delta\Delta Ct (CYP6BB2) = \Delta Ct (IR03) - \Delta Ct (NO) ;$$

Le niveau d'expression du gène CYP6BB2 chez IR03 comparé avec NO :  $2^{-\Delta\Delta Ct (CYP6BB2)}$ .

### 3.2. Définir la compétence vectorielle des isofemelles pour la transmission de CHIKV

## 3.2.1. Préparations de la manipulation

### 3.2.1.1. Préparation du virus

Le titre de CHIKV utilisé pour la manipulation de la compétence vectorielle varie normalement de  $10^5$  à  $10^7$  PFU/ mL selon les manipulations similaires publiées, par conséquent le titre de la solution mère utilisé doit être supérieur à  $10^7$  PFU/mL. Le virus est conservé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à la préparation du repas et chaque tube ne peut servir qu'une fois, car l'acte de décongélation va modifier le titre noté.

Le titrage viral sert à détecter à la fois la qualité infectieuse et la quantité du titre du virus en procédant à une série de dilutions comme inoculum à partir d'une solution "titre inconnu" ou d'une solution après un long voyage qui risque d'avoir un titre modifié. La majorité du virus utilisé ici a été envoyé de l'Institut Pasteur Paris à l'Institut Pasteur de la Guyane, dont une étape de titrage viral a été réalisée pour vérifier si le titre est correct. Pour déterminer le titre de virus choisi pour l'infection orale, trois méthodes basées sur la capacité du virus à infecter les cellules ont été réalisées localement à l'Institut Pasteur de la Guyane, comme montrées par la Figure 16.

La solution "titre non-sûr" a été diluée en série d'un facteur 10, chaque dilution de l'inoculum est inoculée sur une plaque 96 puits avec une monocouche de cellules préparées la veille. Pendant 3 à 7 jours d'incubation, l'état cellulaire est examiné quotidiennement sous microscope inversé. Si un cytopathogène (ECP) est observé, son importance et son évolution sont notées sur une fiche de lecture. Les ECP sont décrits comme des changements morphologiques visibles des cellules lors d'une multiplication virale permettant d'identifier et de classer les virus infectieux, par exemple la fusion des cellules, l'augmentation de volume cellulaire, la lyse cellulaire. En fonction du type de cellules, l'ECP est différent : (i) sur cellule de mammifère (VERO), une plage de cellules lysées va apparaître sur le tapis cellulaire, (ii) en revanche sur cellule d'insecte (C636), les cellules infectées montrent une augmentation de volume sans lyse.

#### **(1) Le test d'unité formant des plages (PFU)**

Cette méthode standard est utilisée pour déterminer la concentration virale en termes de dose infectieuse en unité formant des plages par unité de volume d'échantillon (PFU/mL).

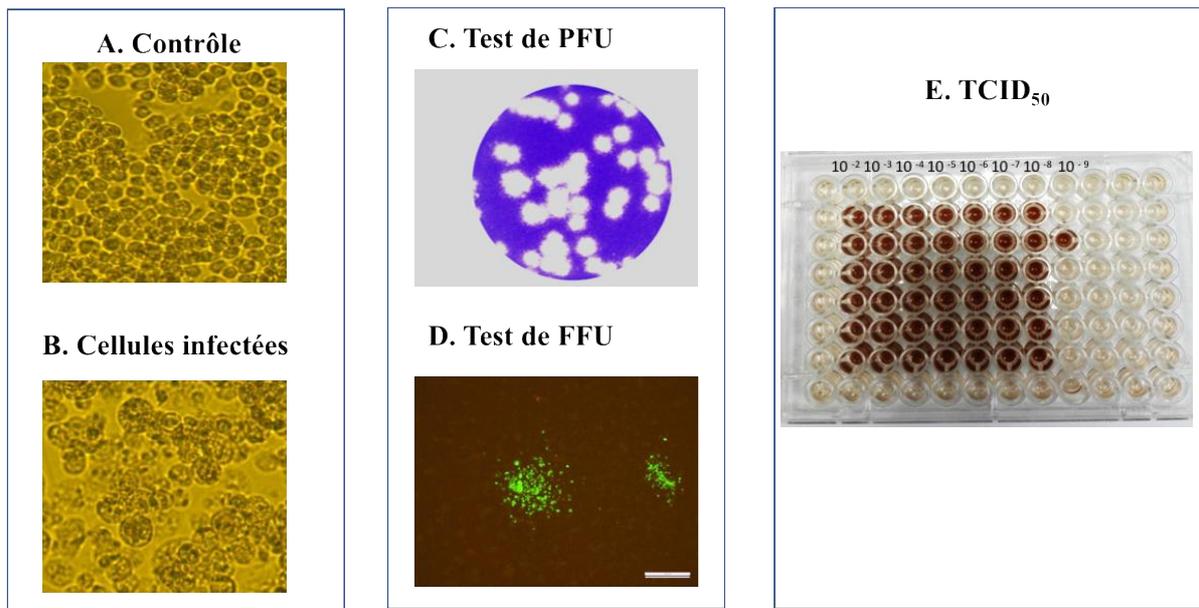
Ce test est basé sur une méthode microbiologique. Une plaque virale est formée lorsqu'un virus infecte une cellule à l'intérieur de la monocouche de cellules fixées, qui est recouverte d'un milieu semi-solide, tel que l'agar ou la carboxyméthylcellulose, pour empêcher la propagation indiscriminée de l'infection virale. Le résultat PFU/mL représente le nombre de particules infectieuses dans l'échantillon en considérant que chaque plaque formée est représentative d'une particule virale infectieuse. Les plaques sont généralement comptées manuellement et les résultats sont calculés en combinaison avec le facteur de dilution utilisé pour préparer la plaque.

### **(2) Le test d'unité formant des foyers (FFU)**

Ce test est particulièrement utilisé pour quantifier les classes de virus qui ne lysent pas les membranes cellulaires telle que pour les cellules C636. Le processus du test FFU est le même que pour le test PFU excepté que les foyers infectés sont détectés par immunofluorescence (IF) en utilisant un anticorps spécifique d'un antigène viral.

### **(3) Le test TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Dose 50)**

Ce test consiste à déterminer la dose infectieuse nécessaire pour infecter 50% des cellules monocouches inoculées avec l'inoculum défini. Pour chaque dilution de virus, après l'incubation, la monocouche cellulaire est observée directement sous microscope inversé ou par une révélation d'immuno-coloration, pour calculer un résultat TCID<sub>50</sub>.



**Figure 16. Techniques de détection virale.** Par rapport aux cellules C636 non infectées (A), les cellules C636 infectées (B) à 5 jours post-infection par le virus de la dengue, présentent un gonflement cellulaire et la formation de syncytia. Sur le test de PFU (C), les formes circulaires blanches correspondent aux cellules lysées par le virus du chikungunya. En bleu, le tapis cellulaire de cellules VERO coloré au Bleu Trypan 0,4%. Sur le test FFU (D), le foyer de cellules infectées par le virus du chikungunya est révélé par IF en vert. En noir, le tapis cellulaire de cellules C636 non marqué. Dans le cas du test TCID<sub>50</sub> (E), une dilution en série est déposée sur le tapis cellulaire de cellules C636 en 6 répliques. Après coloration au DAB (pastilles, Sigma), les puits positifs (colorés en marron) vont permettre de calculer le titre selon une formule mathématique.

### 3.2.1.2. Préparation des moustiques

Les moustiques (IR03, IR05, IR13 et NO) âgés de 5-7 jours, sont anesthésiés par le froid en les plaçant dans un réfrigérateur à 4°C ou en les déposant sur de la glace pilée. Le tri des moustiques est effectué dans la pièce de tri climatisée de l'insectarium, parce que les moustiques se réveillent et s'échappent souvent pendant le tri. Seules les femelles sont placées dans une boîte de gorgement à piston ( Figure 17 B) sur laquelle est noté le nombre exact, la souche de femelles, le nombre peut varier entre 60 et 80. Ces boîtes sont transportées dans un panier jusqu'à l'insectarium du LSB3 pour permettre aux moustiques de s'adapter aux conditions de dépression du laboratoire avant le gorgement artificiel. Les femelles sont laissées à jeun pendant 24-36 h pour stimuler leur appétit en prévision du repas de sang infectieux.

### 3.2.1.3. Lavage du sang frais

Le sang prélevé doit être utilisé le plus vite possible, car plus le sang est frais, plus le taux de gorgement est important. Ce sang contenant alors un produit anticoagulant (Héparine sodique, Choay, SANOFI) subit une étape de lavage. Cette étape va permettre d'éliminer à la fois le produit anticoagulant et le sérum de lapin. Les globules rouges ainsi obtenus sont lavés trois fois avec une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline, P4417-100TAB, Sigma) à 5000 g pendant 2 min à chaque lavage. A la suite du dernier lavage, le culot est re-suspendu dans du SVF (Sérum de Veau Fœtal) stérile pour atteindre le volume initial ( Figure 17 C).

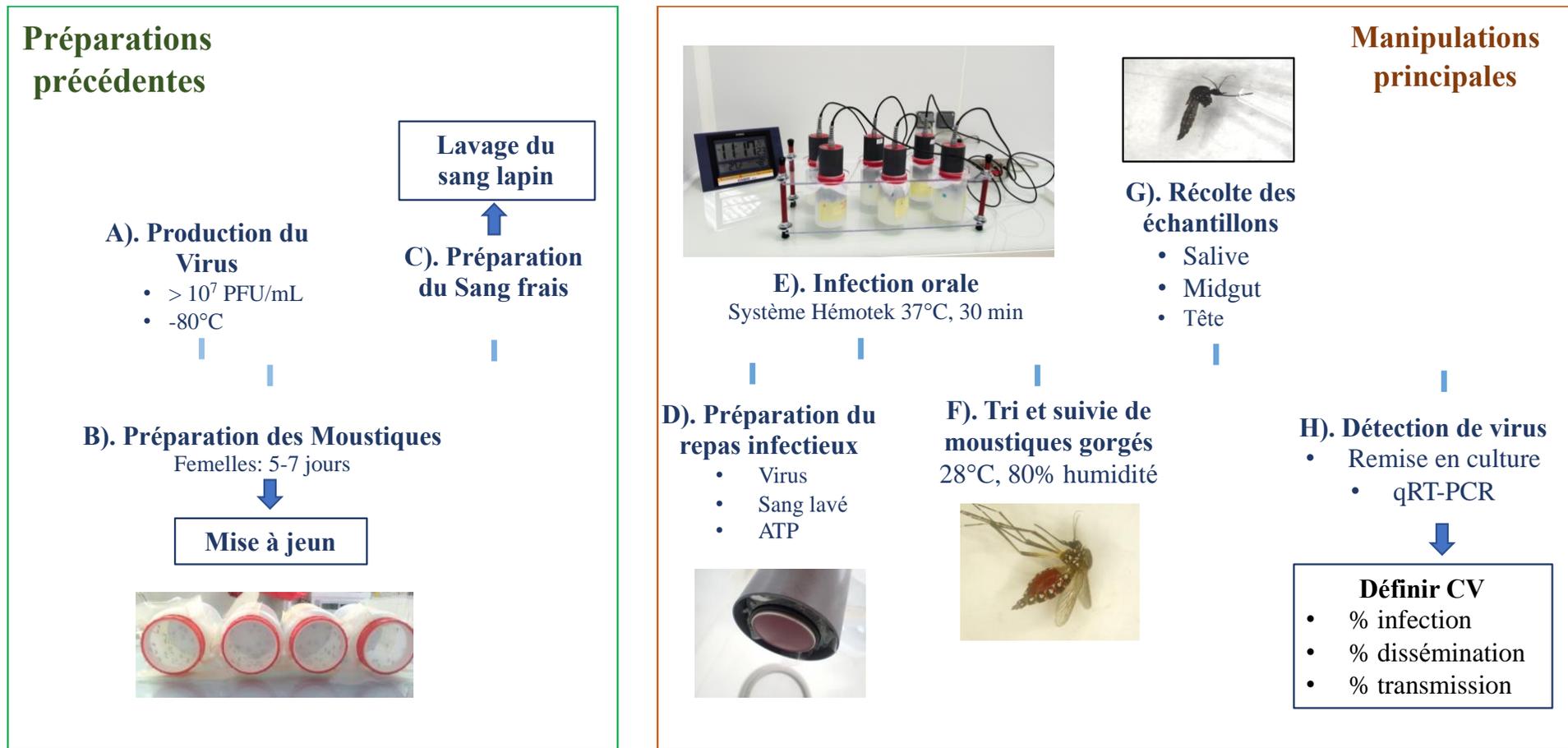


Figure 17. Protocole principal de manipulation entière de la compétence vectorielle.



### 3.2.2. Infection orale

Le laboratoire de sécurité (P3) est l'environnement de travail indispensable à étudier et analyser des agents pathogènes, qu'ils soient liés à des risques sanitaires pandémiques ou bio-terroristes. Un SLB3 est un laboratoire confiné dans lequel sont analysés des agents pathogènes de classe 3 (par exemple : tuberculose, chikungunya...), l'accès y est réglementé, réservé au personnel formé et autorisé. Un laboratoire LSB3 est doté d'une étanchéité de l'enceinte, d'une mise en dépression des locaux (évitant toute fuite vers l'extérieur), et d'une filtration de l'air rejeté.

#### 3.2.2.1. Préparation des repas infectieux

Le repas sanguin artificiel est à base de sang bien lavé, il est composé du CHIKV avec un titre final de  $10^6$  PFU/ mL, un phago-stimulant ATP (Adénosine Tri Phosphate, A2383-5g, Sigma) à une concentration finale de 5 mM pour optimiser le taux de gorgement (Figure 17 D).

#### 3.2.2.2. Gorgement à l'aide du système Hemotek

Les femelles à jeun (entre 60-80 femelles par boîte de gorgement à piston, 6 pistons par lignée) sont infectées oralement par le repas sanguin infectieux avec un système d'alimentation à membrane artificielle (Hemotek, Discovery Workshops, UK). Ce système comprend des capsules métalliques reliées à une unité de chauffage électrique, afin de maintenir le sang à la température désirée, qui est dans notre cas  $37^{\circ}\text{C}$  (Figure 17 E).

Après 30 minutes de repas, les femelles sont anesthésiées par le froid et les moustiques entièrement gorgés sont transférés vers des boîtes en carton avec double moustiquaire pour l'incubation et maintenus jusqu'à 14 jours à  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\%\pm 5\%$  d'humidité relative, avec un cycle de photopériodes de 12h : 12h dans l'incubateur (KBWF 720, Binder, Tuttlingen, Germany) (Figure 17 F) et avec l'apport d'une solution stérile d'eau sucrée à 10%. Toutes les souches de moustiques ont été infectées en parallèle et l'expérience entière a été répétée au moins trois fois.

#### 3.2.2.3. Récolte et traitement des échantillons

Pendant la dissection de moustiques, les échantillons sont collectés à 3, 5, 7 et 10 jours post-infection (DPI), au moins 30 individus par point, au moins 120 individus totaux par lignée, en fonction du taux de gorgement. Pour chaque individu, l'intestin moyen, la tête et la salive ont

été collectés à la fois pour mesurer simultanément le taux d'infection, de dissémination, et de transmission. Pour commencer, les moustiques sont anesthésiés par le froid, les pattes et les ailes sont enlevées, et la trompe est insérée dans un cône à filtre spécial (ART, Molecular BioProducts, USA) avec 20 µL de FBS. La salive est collectée durant 30 minutes puis stockée dans un tube avec 130 µL de milieu de culture cellulaire (L-15 Medium, Sigma). Ensuite, la tête est placée dans un tube contenant 500 µL de 20 % de milieu de culture cellulaire FBS. Finalement, l'intestin moyen est placé dans un tube avec 150 µL de 10 % de milieu de culture cellulaire FBS. Tous les échantillons ont été conservés à -80°C (Figure 17 G).

### 3.2.3. Mesure de la compétence vectorielle

#### 3.2.3.1. Détection virale par qRT-PCR

Pour détecter le virus dans les échantillons, la tête et l'intestin moyen sont homogénéisés par broyage par microbilles pendant 20 secondes à une fréquence de 40Hz (Mini-BeadBeater-16, Biospec, USA). Pour les tests en plaque, avant la remise en culture, le surnageant de broyage et la récolte de salive doivent passer par une filtration (2 micromètres). Pour le test qRT-PCR, 150 µL de surnageant ou de la salive totale sont directement pris pour l'extraction ARN par QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen, Germany), en suivant une digestion complète en tampon de lyse pour 30 minutes à température ambiante, soit environ 25°C. Seulement les échantillons traités par tampon de lyse peuvent sortir du laboratoire de SLB 3.

La qRT-PCR a été exécutée sur le système Step-One Software v2.3 en utilisant le kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR w/ROX (INVITROGEN, CA) avec les amorces et les sondes construites par le laboratoire virologie médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane (Table 5). La réaction one-step qRT-PCR a été réalisée dans un volume réactionnel final de 25 µL contenant 5 µL de matrice ARN, 5 µL de ddH<sub>2</sub>O, 12,5 µL de RT-PCR buffer (2X), 0,5 µL de 10 µM d'amorce forward, 0,5 µL de 10 µM d'amorce reverse, 0,5 µL de 5 µM de sondes, 0,5 µL de Taqman enzyme mix. Le programme d'amplification réalisé est le suivant : une transcription inverse de 30 minutes à 50°C, une activation de l'enzyme Taqman 10 minutes à 95°C, suivi de 45 cycles de 15s à 95°C et 30s à 58°C.

**Table 5. Amorces et sondes utilisées pour la qRT-PCR de CHIKV**

Nom	Séquence d'amorce (5' - 3')
Amorce forward	TGA-TCC-CGA-CTC-AAC-CAT-CCT

**Amorce reverse**

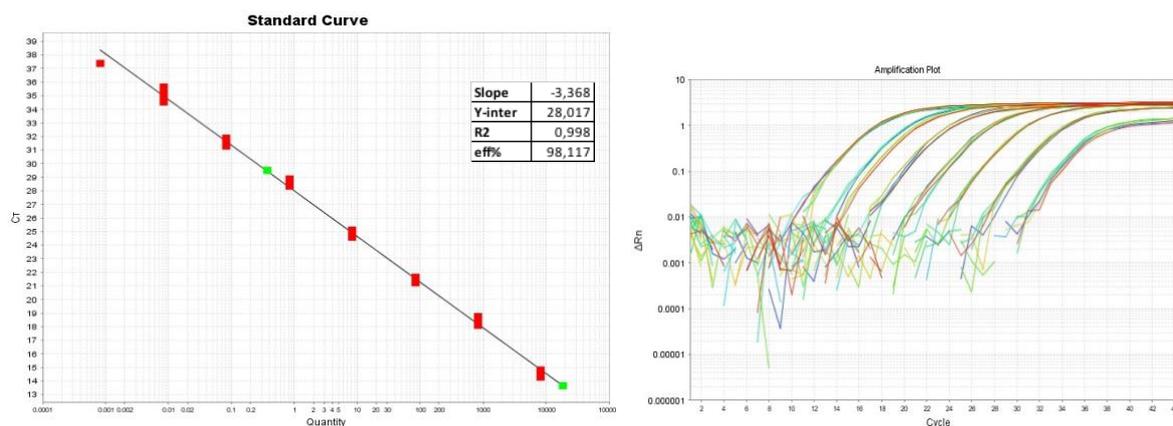
GGC-AAA-CGC-AGT-GGT-ACT-TCC-T

**Sonde**

FAM<sup>1</sup>-TCC-GAC-ATC-ATC-CTC-CTT-GCT-GGC-TAMARA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FAM et <sup>2</sup> TAMARA sont des double fluorescence marqueurs de la sonde.

Pour effectuer la courbe standard le plasmide produit par l'Unité des Populations Virales et de la Pathogénie, Institut Pasteur de Paris, à une concentration de 10<sup>9</sup> copies / ml, a été dilué en série d'un facteur 10, en tripliquas. La copie du génome a été calculée en comparant le Ct des échantillons à la courbe des standards.



**Figure 18. Courbe étalon pour la quantification de virus.** La quantité de virus dans l'échantillon est calculée en comparant le Ct des échantillons à la courbe des standards.

### 3.2.3.2. Mesure de la compétence vectorielle pour le CHIKV

Le taux d'infection correspond au pourcentage de moustiques ayant un intestin moyen positif par rapport au total de moustiques testés. Le taux de dissémination correspond au pourcentage de moustiques ayant une tête positive parmi ceux qui ont un intestin moyen positif. Le taux de transmission correspond au pourcentage de moustiques ayant une salive positive parmi ceux qui ont une tête positive. L'efficacité de transmission correspond au pourcentage de moustiques ayant une salive positive par rapport au total de moustiques testés (Figure 17 H).

3000 moustiques ont été infectés, le protocole précisé précédemment constitue une bonne amélioration pour l'adaptation à notre environnement de laboratoire. Désormais la compétence vectorielle de moustiques pour les autres pathogènes peut aussi commencer à profiter ce modèle.

## 4. INTERACTIONS ENTRE LE RESISTANCE ET COMPETENCE VECTORIELLE

---

## 4.1. Modulation de la dissémination entre les lignées résistantes et sensibles (Publication 2 - soumission pour Science Reports)

### Résumé

*Aedes aegypti* est une espèce de moustiques urbaine considérée comme le vecteur principal du chikungunya dans le monde. Parce qu'aucun vaccin approuvé ou traitement efficace n'a été mis au point, la lutte contre les moustiques basée sur l'utilisation d'insecticides demeure la stratégie la plus répandue et la plus efficace pour prévenir la transmission.

Cependant, l'utilisation intensive d'insecticides a conduit au développement de la résistance chez les moustiques dans le monde entier, alors que les épidémies provoquées par le chikungunya ont augmenté. Notre travail se concentre sur les interactions entre la résistance et la compétence vectorielle chez des moustiques résistants.

Trois lignées isofemelles IR03, IR05 et IR13 présentant différents profils de résistance à la deltaméthrine ont été isolées et puis infecté oralement par le CHIKV dans laboratoire SLB 3. Parmi eux, une seule des lignées IR05 possédait le phénotype *kdr* et l'allèle résistant I1016.

Des différences significatives ont été observées entre les trois lignées isofemelles en ce qui concerne la proportion cumulative de moustiques infectés par le virus du chikungunya disséminés du l'intestin moyen à la tête au fil du temps. Chaque lignée présentait différentes proportions d'allèles résistants pour les deux principales mutations impliquées dans la résistance *kdr*. L'IR05 avec le plus haut niveau de résistance *kdr* présentait une compétence vectorielle la plus faible.

Les niveaux d'expression de certains gènes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsine) ont été mesurés sur des intestins moyens datant de 7 jours après le repas sanguin infectieux, les résultats montrent que la surexpression des enzymes de détoxification et l'existence des mutations *kdr* pourraient avoir un effet significatif sur la dissémination du virus dans le corps des moustiques.

Les luttes anti-vectorielles à base d'insecticides sont largement utilisées pour contrôler les épidémies d'arbovirus. Nos travaux montrent que la pression de sélection des insecticides peut influencer la dissémination du virus chez le moustique. Il est possible que ce soit en raison des systèmes immunitaires innés, du métabolisme énergétique, de la détoxification et des enzymes antioxydantes qui sont activés pour développer la résistance chez les moustiques, mais ceux-ci offrent en même temps une défense contre l'invasion virale, ainsi nous supposons que les mécanismes de résistance chez IR05 pourraient empêcher la dissémination de virus dans son corps.

# **Chikungunya virus dissemination is associated with deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* laboratory lines**

Lanjiao Wang<sup>1</sup>, Albin Fontaine<sup>2,3</sup>, Pascal Gaborit<sup>1</sup>, Amandine Guidez<sup>1</sup>, Romain Girod<sup>1, #a</sup>,  
Mirdad Kazanji<sup>4</sup>, Dominique Rousset<sup>5</sup>, Marco Vignuzzi<sup>6</sup>, Yanouk Epelboin<sup>1</sup>, Isabelle Dusfour<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Vectopôle Amazonien Emile Abonnenc, Unité de contrôle et adaptation des vecteurs, Institut Pasteur de la Guyane, 23 avenue Pasteur, 97306 Cayenne cedex, French Guiana, France.

<sup>2</sup> Unité de Parasitologie et Entomologie, Département des Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France.

<sup>3</sup> Aix Marseille Université, IRD, AP-HM, SSA, UMR Vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéennes (VITROME), IHU – Méditerranée Infection, 19-21 bd Jean Moulin, 13385 Marseille, cedex 5, France.

<sup>4</sup> Institut Pasteur de la Guyane, 23 avenue Pasteur, 97306 Cayenne cedex, French Guiana, France.

<sup>5</sup> Laboratoire de Virologie, Institut Pasteur de la Guyane, 23 avenue Pasteur, 97306 Cayenne cedex, French Guiana, France.

<sup>6</sup> Unité des Populations Virales et Pathogénèse, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

<sup>#a</sup> Unité d'entomologie médicale, Institut Pasteur de Madagascar, BP1294, Ambatofotsikely, Antananarivo 101, Madagascar.

\*Corresponding author: E-mail: [isabelle.dusfour@pasteur.fr](mailto:isabelle.dusfour@pasteur.fr)

## Abstract

*Aedes aegypti* is an urban mosquito species that is the main vector of arboviruses worldwide. Mosquito control with insecticides remains the most prevalent and most effective strategy for preventing transmission in absence of effective vaccinations and available treatments; however, extensive use of insecticides has led to the development of resistance in mosquito populations throughout the world, and the number of epidemics caused by arboviruses has increased. We studied the interactions between transmission of chikungunya virus and resistance in *Ae. aegypti* mosquitoes. Three lines with different resistance profiles to deltamethrin were isolated in French Guiana. Only one of the lines had the knock-down resistance and I1016 resistant allele. Significant differences were observed in the cumulative proportion of mosquitoes with a chikungunya virus infection disseminated from the midgut over time. In addition, certain genes (*CYP6BB2*, *CYP6N12*, *GST2*, *trypsin*) were overexpressed variably in the midgut 7 days after an infectious blood meal in these three lines. Therefore, detoxification enzymes and *kd* mutations could affect virus dissemination.

Insecticides are used extensively to control arbovirus outbreaks. Our work shows that insecticide selection pressure can influence virus dissemination in the mosquito; however, effects on virus transmission and human outbreaks remain to be demonstrated.

## Introduction

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), a major vector of arboviruses worldwide, has been the target of insecticide control strategy for decades<sup>1</sup>. As a result, mosquito populations all around the world have developed resistance, especially to pyrethroids and organophosphates<sup>2</sup>. Resistance to deltamethrin has been the most widely monitored and its mechanisms studied,<sup>3</sup> which indicates that resistance may be conferred by target-site modification due to non-synonymous mutations on the voltage-gated sodium channel sequence, which cause knock-down resistance (*kdr*). Changes in the amino-acid sequence of the target prevent the molecule from correctly binding and reduce its deadly action<sup>4,5</sup>. Currently, at least 10 mutations on the voltage-gated channel sequence have been associated with pyrethroid resistance alone or in combination in *Ae. aegypti* populations worldwide<sup>4,6</sup>. The presence of 1016I and 1534C mutations in *Ae. aegypti* are reported to be strongly related to deltamethrin and permethrin resistance in the Americas<sup>3,7,8</sup>, and double mutants have an enhanced effect on resistance to deltamethrin<sup>9</sup>.

Metabolic resistance is another major mechanism. It is caused by an increase in detoxification enzymes or the production of more efficient isoforms, of which the cytochrome P450, glutathione-S-transferase and carboxy/cholinesterase gene family have mainly been studied. These changes improve degradation, sequestration or excretion of toxic molecules<sup>10</sup>. Resistance is related to the

geographical origin of the populations that have been studied and probably to past insecticide practices<sup>11</sup>. In French Guiana, deltamethrin resistance is associated with the presence of an isoleucine at position 1016 of the amino-acid sequence of the sodium channel gene change mutation and cytochrome P450 gene over-expression, especially of *CYP6BB2*, *CYP6M11*, *CYP6N12*, *CYP9J9* and *CYP9J10*<sup>3,11,12</sup>. The functional role of these genes in insecticide detoxification in *Ae. aegypti* has not been extensively studied<sup>13,14</sup>. The studies also indicate that other genes that code for heat-shock proteins, C-type lectins and serine proteases (including trypsin-like) are differentially expressed in deltamethrin-resistant populations<sup>15–18</sup>. Serine proteases are involved in detoxifying insecticide molecules by hydrolysing deltamethrin<sup>18,19</sup> and could play a role in dengue virus infectivity in *Ae. aegypti*<sup>20</sup>. The other genes are not directly linked to resistance but are involved in mosquito immunity and have been found to interact with virus infectivity in mosquitoes<sup>21–24</sup>. In addition, evidence of interactions between insecticide resistance and the incidence of parasite infections has been found in *An. gambiae*–*Plasmodium falciparum* and *Cx. quinquefasciatus*–*Wuchereria bancrofti*<sup>25,26</sup>.

Relevant evidence is lacking on the possible relation between arboviral infections and insecticide resistance in mosquitoes<sup>27</sup>. The aim of this work was to test the hypothesis of a relation between resistance to insecticides and vector competence for chikungunya virus (CHIKV) in *Ae. aegypti*.

The hypothesis was based on evidence that metabolic and immune pathway genes have been modulated in insecticide-resistant mosquito populations and on observations in other mosquito–pathogen interactions<sup>25,26</sup>. In the context of increasing insecticide resistance in *Ae. aegypti*<sup>2</sup> and the spread of arboviral outbreaks, answers to this question are essential for further predicting the risk of emergence and epidemic spread<sup>28</sup>. We studied the interactions among three *Ae. aegypti* lines isolated in French Guiana that are differentially resistant to deltamethrin in their vector competence for CHIKV.

## Results

### Contrasted resistance profiles to deltamethrin

In the IR03 and IR13 *Aedes aegypti* laboratory lines, 100% of females were knocked down 1 h after exposure to deltamethrin at the diagnostic dose of 0.06%, with a KDT<sub>50</sub> equivalent to that of the NO reference strain (Table 1). In IR05, 40% of mosquitoes were knocked down after 1 h, with a KDT<sub>50</sub> extending over 1 h (Table 1). After 24 h of observation, 96% of IR13 females died at the dose of 0.06%, IR03 at 30.4% and IR05 at 26.4%. The RR<sub>50</sub> was 6.42, 69.5 and 51.5 for IR13, IR05 and IR03, respectively (Table 1). The profile of IR13 was close to that of NO, with full susceptibility to the KD effect and low resistance. IR05 showed a high KD effect and resistance,

while IR03 showed full susceptibility to the KD effect and resistance to deltamethrin. The presence of a KD effect and loss of susceptibility suggested the presence of metabolic resistance only in IR03 and at a lower level in IR13.

### **High infection rates in all lines**

All lines and the reference strain were highly susceptible to the viral clone, with infection rates in midguts of > 90% as early as 3 days post-infection (DPI). All mosquitoes of the IR13 line were infected (S1 Fig. A). The midgut infection rates of the three lines were significantly different but were not significantly influenced by time post-exposure, obviating further analyses of infection dynamics in the midgut (logistic regression analysis of deviance:  $P=0.003$  for the mosquito line effect,  $P=0.97$  for the effect of time post-exposure and  $P=0.56$  for their interaction). Pairwise comparisons among the lines, except for time, showed significant differences between the low (IR13) and the high (IR05) resistance lines ( $P=0.031$ ).

Virus load in infected midguts was determined at each time post-exposure in all lines. The load also increased significantly (ANOVA,  $P=0.0001$ ) with time post-exposure for all lines.

### **Significant differences in dissemination saturation levels**

Mosquitoes in each line with an infected midgut were scored for disseminated infection over time, and the dynamics of disseminated infection was fitted to a logistic equation (sigmoid shape) to derive the three parameters that best described the virus dissemination kinetics in each mosquito line (Fig. 1). Our model was not optimal for the IR13 line, as an additional time after 10 days' post-virus exposure would have properly captured the dissemination plateau (saturation level). Therefore, the disseminated infection saturation level for this line is probably underestimated.

No significant difference was found between the lines in time-dependent parameters, i.e. the time at which the proportion of mosquitoes with a disseminated infection is 50% of the saturation level (which corresponds graphically to the point of symmetry of the sigmoid) and the time required to increase from 10% to 90% of the saturation level ( $\Delta t$ , the rising time of the sigmoid). All mosquito lines reached their dissemination saturation level (K) at about 7 days, and the time to reach 50% of the disseminated infection proportions (M) was about 3 days for all lines. Significant differences were observed between lines in saturation level (ANOVA, IR05 and IR03,  $P=0.04$ ; IR05 and IR13,  $P=0.04$ ), which corresponds to the maximum proportion of disseminated infection that can be attained in the line. IR05 showed 50% virus dissemination, IR03 63% and IR13 an underestimated 66%. The value for the reference NO strain was 91% of dissemination (Table 2).

### **Transmission rate**

The transmission rate is the percentage of mosquitoes with positive saliva among those with positive heads, and the transmission efficiency rate is the percentage of mosquitoes with positive saliva among all mosquitoes tested. Neither could be modelled, because, in certain cases, < 10 positive saliva samples were obtained (Table S4). As dissemination was stabilized from 7 DPI and sample sizes were highest at 7 and 10 DPI, the transmission rates ranged from 48% to 85% and transmission efficiency from 23% to 55%. Chi-square comparison did not show any difference between the lines at any time.

### **Resistant mutation at the 1534 position is inversely associated with the dissemination saturation level.**

The frequency of resistant allele 1016I accorded with *kd* phenotypes and our knowledge of *kd* resistance mechanisms in French Guiana populations. IR05 was the only line with a high frequency of the 1016I resistant allele (0.804) and the three genotypes with a predominance of homozygote resistance (64.1%) (Fig 2). The 1534 locus displayed various proportions of the 1534C resistant allele and all three genotypes, depending on the lines. IR05 had a frequency of 0.814 for the resistant allele, bringing the proportion of double homozygote resistant (I1016I/C1534C) to 63.5% and that of full heterozygotes up to 30.8% in this line (Fig. 2). The frequencies of other genotypes were null or negligible (< 3%). The frequency of 1534C in IR03 was 0.456. The proportion of heterozygotes was 62.1%, and those of susceptible and resistant homozygotes genotypes were 23.3% and 14.6%, respectively. IR13 had the lowest frequency of resistant 1534C (0.202) and the highest proportion of homozygote susceptible genotypes (60.3%) (Fig. 2). The proportion of heterozygotes reached 39%, while that of the resistant homozygote genotype was negligible (0.7%). As expected, the susceptible alleles 1016V and 1534F were fixed in the NO reference strain.

When the dissemination saturation level is taken into consideration with the proportion of 1534C by mosquito line, an interesting inverse relation appears (Fig. 3). No difference in the virus loads in midguts or heads was observed among the lines with different *kdr* genotypes (S1 Fig B).

### **Level of detoxification enzyme in the midgut**

A sub-sample of 87 midguts tested 7 DPI had a frequency of 1016I of 0.455 and a frequency of 1534C of 0.47. In the V1016I mutation, the proportion of heterozygotes was 12.6%, and those of susceptible and resistant homozygotes genotypes were 67.8% and 19.6%, respectively. In the F1534C mutation, the proportions were 46.0% heterozygote, 30.0% susceptible and 24.1% resistant homozygote genotypes. In comparison with *GST* and *trypsin* (expression ratio < 5),

*CYP6BB2* and *CYP6N12* were expressed differently (Kruskal-Wallis,  $P < 0.001$ ) in different lines. *CYP6BB2* was more overexpressed in IR03 (expression ratio, 58) and in IR05 (expression ratio, 35) than in IR13 (expression ratio, 7). The situation was similar for *CYP6N12*, which was more overexpressed in IR03 (expression ratio, 29) and in IR05 (expression ratio, 22) than in IR13 (expression ratio, 10).

When the 87 midguts were divided into one group with negative heads and the other with positive heads, the mean expression ratios were 32.4 for *CYP6BB2*, 19.0 for *CYP6N12*, 2.0 for *GST2* and -4.3 for *trypsin* (Fig. 4).

### **Detoxification enzymes and *kd* mutations have an effect on virus dissemination.**

Modelling of the binary data for infected/uninfected heads, indicating whether the virus had disseminated or not in the mosquito body, showed that the viral loads in the midguts significantly ( $P < 0.0001$ ) explained this distribution (Table 3). *GST2* expression also explained it, with a marginally significant estimate ( $P=0.045$ ).

The viral loads in individual heads were significantly influenced by the time post-exposure ( $P=4.93 \times 10^{-6}$ ) and by the mosquito line ( $P < 0.02$ ) (Fig. S2). Differences among the mosquito lines found only for the IR13 and IR05 pair ( $P=0.009$  adjusted for multiplicity of tests). Mosquitoes with positive heads had higher midgut viral loads than those with negative heads. In positive heads (N=52), the viral loads were significantly positively affected by the viral loads in the midguts ( $P=0.035$ ) and the fold change of the *CYPBB2* gene ( $P=0.02$ ) but negatively by *kd* homozygous susceptible genotypes (V1016V,  $P=0.01$ ; F1534F,  $P=0.001$ ) (Table 4).

## **Discussion**

Although the use of mosquito lines from one female limited genetic variability, there may be variations in vector competence, such as dissemination, among mosquito lines with different resistance profiles, which could also be due to epistasis<sup>29</sup>, the founder effect of line establishment or the result of insecticide pressure. The phenotypes and target site mutation profiles were distinct in the three lines selected for the experiments. IR05 was highly resistant, with a high frequency of *kdr* mutations at both loci and high levels of expression of detoxification genes such as *CYP6BB2* and *CYP6N12*. IR03 had a complete knock-down effect against deltamethrin but low mortality and resistance ratios, close to the values for IR05. Target site mutations in this line are composed of 62.5% heterozygotes at 1534 and homozygotes susceptible at the 1016 locus. Resistant alleles in heterozygote individuals were found to be mainly recessive at *kdr* loci<sup>7,30</sup>. This finding leads us to assume that IR03 has metabolic resistance only to deltamethrin. Significant overexpression of

*CYP6BB2* and *CYP6N12* in this line supports this observation. The IR13 resistance phenotype (96% 24-h mortality) is at the limit of the susceptibility threshold according to the World Health Organization (24-h mortality > 98%). The *kd* genotypes are consistent with the phenotypes, with 60.3% homozygote susceptible individuals at both loci. Slight overexpression of *CYP6BB2* and *CYP6N12* could explain survival at 24 h. The 1534 locus is known to confer resistance to permethrin<sup>8</sup> and to enhance resistance to deltamethrin in *Ae. aegypti*<sup>31</sup>. As expected, we found a limited effect of the *F1534C* mutation in deltamethrin-resistant phenotypes.

The high infection rates in all three lines corroborate other work with *Ae. aegypti* populations in South America, including French Guiana, and other CHIKV strains<sup>32,33</sup>. The dissemination rates in our experiments were, however, about 50% at 7 DPI, lower than in two other studies, which showed a dissemination rate > 95% at 7 DPI<sup>32,33</sup>. In addition, at 7 DPI, the transmission rates were 48–85% and transmission efficiency 23–55%, which were also lower than in the other studies,<sup>32,33</sup> with a transmission efficiency > 60% at 7 DPI. There are several possible explanations for these differences. First, the infectious clone used in our experiment may be less infectious than the virus produced without genetic modifications. Secondly, we used qRT-PCR to detect the presence of the virus, which requires a supplementary extraction step in the cold, and the viral RNA may degrade rapidly when there is very little virus, resulting in a lower threshold of detection than in a focus fluorescent assay on *Ae. albopictus* C6/36 cells<sup>32,33</sup>. Thirdly, the presence of symbiotic bacteria bearing antiviral genes<sup>34</sup> and insect-specific viruses<sup>35</sup> in the mosquito might also decrease the vector's competence and inhibit replication of an arbovirus. Finally, the geographical origin of the mosquito may also affect its vector competence for CHIKV. For example, the infection rate of mosquitos from East Africa (Kenya) was about 60%<sup>36</sup>, that of mosquitos from the South Pacific Ocean (French Polynesia) ranged from 7% to 90%<sup>37</sup>, and that of mosquitos from West Africa (Senegal) varied from 0 to 50%<sup>38</sup>. Other factors that could affect the vector competence of mosquitoes are water quality<sup>39</sup> and diurnal temperature range<sup>40</sup>. The volume of saliva delivered by females could not be estimated, which is a common limitation of studies of vector competence, and rapid, simple, specific indicators (markers or colour change reactions) would be very useful. For example, microRNA is present only in CHIKV-infected mosquito saliva<sup>41</sup>, and D7 protein can be detected directly in mosquito saliva by antibodies of human origin<sup>42</sup>.

We found less dissemination in the resistant line IR05 than in IR03 and IR13, and the midgut barrier may affect dissemination of CHIKV throughout the body. We established that the lines differ in *kdr* mutation patterns and the expression of certain CYP450 genes, and these mechanisms could hypothetically alter dissemination. The viral load in heads was significantly affected by two *kd* genotypes and the field change of *CYPBB2* genes.

McCarroll *et al.* showed that esterase-related resistant *Cx. quinquefasciatus* are less likely to transmit the filarial parasite *Wuchereria bancrofti* than their insecticide-susceptible counterparts because of reduced larval development<sup>26</sup>. We also found a negative association between the frequency of 1534C and dissemination saturation level, but no such correlation was found for the 1016I mutation mainly involved in resistance. The risk of infection of *An. gambiae* with *P. falciparum* was positively associated with the L1014F *kdr* genotype in laboratory strains from Senegal and Burkina Faso<sup>25,43</sup> but negatively associated in field populations from Equatorial Guinea<sup>44</sup>.

The presence of V1016I and F1534C impaired development, longevity and reproduction in *Ae. aegypti* populations in Brazil in the absence of insecticide<sup>9,45</sup>, because the development of resistance under insecticide-selected pressure is subsequently accompanied by a higher energetic cost or other disadvantages than in susceptible counterparts<sup>46</sup>. In addition, CYP P450-mediated resistance could compete for energy reserves, including lipids and glycogen, in mosquitoes<sup>47</sup>. While CHIKV depends on the host's energetic reserves for its metabolic activities, the energy trade-off caused by resistance could compete with CHIKV development.

The existence of a resistant system in an individual mosquito could also stimulate the immune system by over-expression of many detoxification genes, especially the CYP P450 family<sup>3,11</sup>. As the CYP 450 are located in oenocytes positioned around the midgut and under cuticles, they can influence the production of reactive oxygen species (ROS) in insects<sup>48</sup>. ROS were reported to modulate the immunity of *An. gambiae* to bacteria and plasmodia<sup>49</sup> and were linked to activation of the toll pathway for defence against dengue virus infection in *Ae. aegypti*<sup>50</sup>. Production of ROS in our lines might play a similar role in the different dissemination rates that we observed. Furthermore, many serine proteases are also differentially expressed in deltamethrin-resistant populations<sup>3</sup>. The serine protease family may be involved in immune responses to virus infection in mosquitoes; some midgut serine proteases may actually limit the dengue virus-2 infectivity of *Ae. aegypti*<sup>22</sup>. In our study, the role of the only trypsin gene chosen was not significant, and we could assume that the dissemination of CHIKV was limited in our IR05 line because of overexpression of trypsin-like serine proteases as well as other serine proteases genes or the C-type lectin.

The response of a mosquito to CHIKV infection comprises an elaborate gene network, with pathways such as the innate immune system, detoxification systems and energy metabolism, all of which play roles in the resistance mechanisms in *Ae. aegypti*, and these pathways could also participate in the response to a virus infection<sup>51,52</sup>. We hypothesize that metabolic pathways in addition to *kdr* play a role in altered vector competence by using up energy resources or by mobilizing factors in signalling pathways in the immune system. All the physiological pathways

combine to permit mosquitoes to survive and reproduce. Further investigations with genetic manipulation of mosquito will functionally validate our observations but will remain laboratory findings.

## **Conclusion**

We isolated three mosquito lines that differed in both resistance level and resistance mechanism and found some significant differences in vector competence for CHIKV, specifically in the virus dissemination rate: the line with the highest resistance had the lowest vector competence. This study is a basis for further research, after more accurate verification of a functional association between insecticide resistance and vector competence. The findings contribute to better understanding of insecticide resistance in mosquito populations and may provide insights for designing efficient control strategies for use in arbovirus epidemics in areas of insecticide resistance.

## **Methods**

### **Ethics statement**

The experiments were authorized by agreement number B973-02-01 delivered by the Préfecture of French Guiana, which was renewed on 6 June 2015. The protocol for use of mice and rabbits was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Institut Pasteur (No. 89), report number 2015–0010 issued on 18 May 2015. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

### **Mosquitoes**

Four laboratory strains of *Ae. aegypti* were used. Three of 60 lines produced by isolating F1 females from a natural population collected at Ile Royale, French Guiana (5.287° N, 52.590° W), were selected for their contrasting deltamethrin resistance profiles. Siblings were allowed to mate in subsequent generations. IR03 and IR05 were maintained under deltamethrin selective pressure by eliminating 75% of larvae every two generations up to the 12th generation, while IR13 was maintained in the same environmental conditions, but without any deltamethrin selective pressure up to 5th generation. The New Orleans (NO) strain, which is susceptible to all insecticides, was used as the reference in all experiments. Mosquitoes were reared under controlled environmental conditions of 12 h:12 h photoperiod, 80% ± 10% relative humidity and 28 ± 2 °C. Mosquitoes were fed on blood taken from anaesthetized mice.

### **Insecticide bioassays: time and dose–response tests**

Three lines, IR03, IR05 and IR13, were isolated from a single female in order to limit genetic variation and produce contrasting deltamethrin resistance phenotypes and mechanisms, in order to study the relations among vector competence phenotypes. Three to five days old females from the three lines (IR03, IR05 and IR13) and the NO strain were exposed to doses of 0.001–0.4% deltamethrin that cause 0–100% mortality. Technical-grade deltamethrin (Sigma Aldrich, Germany) dissolved in acetone and mixed with silicon oil was applied on Whatman paper according to the WHO recommended protocol<sup>54</sup>. For each line, we recorded: (i) the cumulative number of knocked-down (KD) mosquitoes exposed to 0.06% deltamethrin (i.e. the diagnostic dose for resistance monitoring<sup>55</sup>) every 3 min for the first hour, and (ii) the mortality rate after 24 h (% 24-h M) at each dose. The theoretical time or dose that knocked down or killed 50% of the population (KDT<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub>, respectively) was obtained by probit regression with BioRssay<sup>56</sup> in R statistical environment version 3.2.0<sup>57</sup>. The resistance ratio, which is the LD<sub>50</sub> of the tested population divided by the LD<sub>50</sub> of the reference strain (RR<sub>50</sub>), was used to evaluate the level of resistance.

### **Chikungunya virus (CHIKV)**

Mosquitoes were infected orally with a CHIKV infectious clone produced by the Viral Populations and Pathogenesis Unit, Institut Pasteur, Paris, at a titre of  $2.5 \times 10^7$  PFU/mL from four PCR amplicons of patient serum obtained during the outbreak of chikungunya in the Caribbean islands in 2013. This clone was found to replicate in VERO cells like an Asian lineage of CHIKV (NC-2011) in baby hamster kidney cells. It is used to study pathogenesis and viral evolution<sup>58</sup>.

### **Vector competence assay**

**Oral infection:** Five-day-old females from the three selected lines and the NO strain were exposed to an infected blood meal in an artificial membrane feeding system (Discovery Workshops, Lancashire, United Kingdom) 24 h after being deprived of sucrose solution. The infectious blood meal was composed of fresh rabbit blood (volume proportion: 96%) and a final viral suspension of  $10^6$  PFU/mL (volume proportion: 4%, with an initial titre of  $2.5 \times 10^7$  PFU/mL. And 30  $\mu$ L of ATP was added as a phago-stimulant at 5 mmol/L. After 30 min of exposure, the females were cold-anaesthetized, and fully engorged mosquitoes were maintained for up to 10 or 14 days with a constant supply of 10% sugar solution.

**Sample collection:** The vector competence of all strains was scored in 30 samples 3, 5, 7 and 10 days post-infection (DPI) for all strains according to three phenotypes: (i) midgut infection, as determined by the presence of virus in the midgut; (ii) virus dissemination from the infected midgut, as determined by the presence of virus in the head; and (iii) virus transmission, as determined by

the presence of virus in the saliva of a mosquito with a disseminated infection. An extra 14 DPI time was used only for the NO strain, which had the highest engorgement rate and sample size. First, mosquitoes were cold-anaesthetized, their legs and wings were removed, and the proboscis was inserted into a filter tip ART (Molecular BioProducts, USA) with 20  $\mu$ L of fetal bovine serum (FBS; Glico by Life Technologies). Saliva was collected for 30 min and stocked in tubes containing 130  $\mu$ L of cell culture medium (L-15 Medium, Sigma). One limitation of this technique, which is commonly used for vector competence, is that the volume of saliva delivered by females cannot be estimated. The heads were then cut off and placed into tubes containing 500  $\mu$ L of 20% FBS cell culture medium. Finally, the midguts were dissected and placed in a tube with 150  $\mu$ L of 10% FBS cell culture medium. All samples were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Viral detection by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR):** The head was homogenized by grinding in microbeads for 20 s at 40 Hz (Biospec, USA). Then, 150  $\mu$ L of supernatant were removed for RNA extraction with the QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen, Germany). Midguts and saliva were extracted directly with the same kit after complete digestion in lysis buffer for 30 min at room temperature (about  $25^{\circ}\text{C}$ ). Finally, qRT-PCR was performed on a Stepone software v2.3 system instrument with SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit w/ROX (Invitrogen, CA, USA). The detailed protocol is shown in Table S1.

### Vector competence analyses

To analyse virus dynamics further, a logistic model with three parameters was used to describe the cumulative change in the proportion of mosquitoes with a virus infection or dissemination over time post-exposure for each mosquito line by least-squares non-linear regression with the drm function in the drc R package<sup>59</sup>. Virus dissemination was scored only in mosquitoes with an infected midgut. The three-parameters logistic function (L.3 equation in the drm function with a self-starter) is given by the formula:

$$f(x, (K, B, M)) = K / (1 + e^{-B(\text{time}-M)}),$$

Where  $K$  represents the maximum prevalence of mosquitoes with a systemic infection (the saturation level),  $M$  the time at which the proportion of mosquitoes with a systemic infection equals 50% of the saturation level  $K$  (a proxy for EIP<sub>50</sub>) and  $B$  the growth rate around  $M$  (rate of change per time unit during the exponential phase). The growth rate ( $B$ ) was further transformed into  $\Delta t$ , which corresponds to the rise time of the exponential function (time taken for a virus to rise from 10% to 90% of its saturation level), from the formula:  $\log(81)/B$ . The logistic curve was forced to start at the origin for all tested lines. The sample size at each time was used as a weight argument.

The dynamics of lines were compared in an extra sum-of-square F test, which is based on the difference between the residual sum-of-squares of two models adjusted for the difference in the

number of degrees of freedom: (i) a restricted model fitted to the combined sets of data and (ii) an unrestricted model fitted to each data set separately. The restricted model corresponds to a single sigmoid curve with three parameters estimated from the entire data set, whereas the unrestricted model corresponds to two distinct curves with three parameters estimated from each data set. The null hypothesis of the extra sum-of-square F test is that the unrestricted model does not fit the data better than the restricted model. In essence, if two separate curves fit the data better than a single curve, the null hypothesis is rejected, and the two curves are considered distinct. The F test quantifies improvement in the unrestricted model over the restricted one and generates a *P* value based on the F distribution and the number of degrees of freedom.

The same test was used to compare single parameters between two curves. In this test, the restricted model is defined as having the same value for one parameter in both data sets and estimates the two other parameters separately. The null hypothesis is that both data sets have the same shared parameter. If two separate curves fit the data better than the same curves constrained to share one parameter, the null hypothesis is rejected, and the shared parameter is considered distinct. The *P* value is derived from the F test on the basis of the F distribution and the number of degrees of freedom.

Virus titre differences among lines were analysed in an ANOVA that included the effect of time post-virus exposure. All statistical analyses were performed in the R statistical environment<sup>57</sup>, and charts were generated with the ggplot2 package<sup>60</sup>.

### **Effect of insecticide resistance on vector competence phenotypes**

**Knock-down resistance (*kdr*) genotyping.** With DNA extracted from the midguts of all individuals, 103 IR03, 159 IR05, 136 IR13 and 234 NO adults were genotyped in discrimination allele assays to localize resistant alleles in positions 1016 and 1534 of the sodium channel voltage-dependent gene in a StepOnePlusReal-time PCR system (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). The detailed protocol is described in Table S2.

**Gene expression.** A subset of individuals was selected 7 days post-exposure, when 100% of the midguts and about half the heads were positive in each line, and the expression of genes associated with resistance to deltamethrin was compared in midguts with positive heads and those with negative heads. We chose 27, 30 and 30 positive midguts of IR03, IR 05 and IR13, respectively, of which 18, 16 and 18 had disseminated heads and 9, 14 and 12 had non-disseminated heads, respectively. RNA was extracted from midguts with an RNA kit from Qiagen, according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of total RNA were determined in a spectrophotometer (NanoDrop 2000c Thermo Scientific). The total RNA yield was standardized at 60 ng/ $\mu$ L for all samples and then treated with DNase (Carlsbad, CA, USA). Complementary

DNA (cDNA) strands were synthesized with SuperScript™ III Reverse Transcriptase kit Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol.

*RpL8* was used as the housekeeping gene for *CYP6BB2*, *CYP6N12*, *GST2* and *trypsin*. Quantitative RT-PCR was performed according to the protocol of Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The detailed protocol is described in Table S3.

**Multivariate analyses.** In order to identify the effect of insecticide resistance on vector competence, a Generalized Linear Model (GLM) using Binomial or Gaussian family was used to describe the relation between infection status (positive or negative) or normalized viral loads in heads (VLhead), respectively, with insecticide resistance gene expression, *kdr* genotypes, and eventually midgut viral loads.

## References

1. Carvalho, F. D. & Moreira, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species? *Neotrop Entomol* 1–13 (2017). doi:10.1007/s13744-017-0520-4
2. Moyes, C. L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, (2017).
3. Dusfour, I. *et al.* Deltamethrin resistance mechanisms in *Aedes aegypti* populations from three French overseas territories worldwide. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, (2015).
4. Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B. S. & Dong, K. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects* **7**, (2016).
5. Dong, K. *et al.* Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **50**, 1–17 (2014).
6. Granada, Y., Mejía-Jaramillo, A. M., Strode, C. & Triana-Chavez, O. A point mutation V419L in the sodium channel gene from natural populations of *Aedes aegypti* is involved in resistance to  $\lambda$ -cyhalothrin in Colombia. *Insects* **9**, 23 (2018).
7. Saavedra-Rodriguez, K. *et al.* A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **16**, 785–798 (2007).
8. Harris, A. F., Rajatileka, S. & Ranson, H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* **83**, 277–284 (2010).
9. Brito, L. P. *et al.* Assessing the effects of *Aedes aegypti* *kdr* mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One* **8**, e60878(2013).
10. Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L. & Ranson, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **34**, 653–665 (2004).

11. Faucon, F. *et al.* Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Res* **25**, 1347–1359 (2015).
12. Faucon, F. *et al.* In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005526 (2017).
13. Stevenson, B. J., Pignatelli, P., Nikou, D. & Paine, M. J. I. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1595 (2012).
14. Chandor-Proust, A. *et al.* The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem J* **455**, 75–85 (2013).
15. Bonizzoni, M. *et al.* Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. *PLoS One* **7**, e44607 (2012).
16. Lv, Y. *et al.* Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* by RNA-seq. *Mol Genet Genomics* **291**, 309–321 (2016).
17. Bariami, V., Jones, C. M., Poupardin, R., Vontas, J. & Ranson, H. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1692 (2012).
18. Gong, M. *et al.* Serine proteinase over-expression in relation to deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Arch Biochem Biophys* **438**, 53–62 (2005).
19. Yang, Q. *et al.* Expression and characterization of two pesticide resistance-associated serine protease genes (NYD-tr and NYD-ch) from *Culex pipiens pallens* for metabolism of deltamethrin. *Parasitol Res* **103**, 507–516 (2008).
20. Barón, O. L., Ursic-Bedoya, R. J., Lowenberger, C. A. & Ocampo, C. B. Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with dengue-2 virus. *J Insect Sci* **10**, 1–23 (2010).
21. Molina-Cruz, A. *et al.* Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 631–637 (2005).
22. Brackney, D. E., Foy, B. D. & Olson, K. E. The effects of midgut serine proteases on dengue virus type 2 infectivity of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* **79**, 267–274 (2008).
23. Sim, C. *et al.* *Anopheles gambiae* heat shock protein cognate 70B impedes o'nyong-nyong virus replication. *BMC Genomics* **8**, 231 (2007).

24. Cheng, G. *et al.* A C-type lectin collaborates with a CD45 phosphatase homologue to facilitate West Nile virus infection of mosquitoes. *Cell* **142**, 714–725 (2010).
25. Alout, H. *et al.* Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS One* **8**, e63849 (2013).
26. McCarroll, L. & Hemingway, J. Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1345–1351 (2002).
27. Phanpoowong, T. *et al.* Dengue-2 virus carrying capacity of Thai *Aedes aegypti* strains with different susceptibility to deltamethrin. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **43**, 634–640 (2012).
28. Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N. & Lecuit, M. Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. *Annu Rev Med* **69**, 395–408 (2017).
29. Mackay, T. F. C. Epistasis for quantitative traits in *Drosophila*. *Epistasis* 47–70 (Humana Press, New York, NY, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2155-3\_4
30. Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W. & Prapanthadara, L. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochem Physiol* **96**, 127–131 (2010).
31. Vera-Maloof, F. Z., Saavedra-Rodriguez, K., Elizondo-Quiroga, A. E., Lozano-Fuentes, S. & Black IV, W. C. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, (2015).
32. Vega-Rúa, A. *et al.* Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003780 (2015).
33. Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B. & Lourenço-de-Oliveira, R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. *J Virol* **88**, 6294–6306 (2014).
34. Beard, C. B., O'Neill, S. L., Tesh, R. B., Richards, F. F. & Aksoy, S. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitol Today* **9**, 179–183 (1993).
35. Bolling, B. G. *et al.* Insect-specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence. *Am J Trop Med Hyg* **92**, 422–428 (2015).
36. Agha, S. B. *et al.* Vector competence of populations of *Aedes aegypti* from three distinct cities in Kenya for chikungunya virus. *PLOS Negl Trop Dis* **11**, e0005860 (2017).
37. Richard, V., Paoaafaite, T. & Cao-Lormeau, V.-M. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* populations from French Polynesia for chikungunya virus. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004694 (2016).

38. Diagne, C. T. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes vittatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal and Cape Verde archipelago for West African lineages of chikungunya virus. *Am J Trop Med Hyg* **91**, 635–641 (2014).
39. Reisen, W. K., Hardy, J. L. & Presser, S. B. Effects of water quality on the vector competence of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) for western equine encephalomyelitis (Togaviridae) and St Louis encephalitis (Flaviviridae) viruses. *J Med Entomol* **34**, 631–643 (1997).
40. Alto, B. W. *et al.* Diurnal temperature range and chikungunya virus infection in invasive mosquito vectors. *J Med Entomol* **55**, 217–224 (2018).
41. Maharaj, P. D., Widen, S. G., Huang, J., Wood, T. G. & Thangamani, S. Discovery of mosquito saliva microRNAs during CHIKV infection. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003386 (2015).
42. Londono-Renteria, B. L. *et al.* Serosurvey of human antibodies recognizing *Aedes aegypti* D7 salivary proteins in Colombia. *Front Public Health* **6**, (2018).
43. Ndiath, M. O. *et al.* Effects of the *kdr* resistance mutation on the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* populations to *Plasmodium falciparum*: a hindrance for vector control. *Malar J* **13**, 340 (2014).
44. Hemingway, J. *et al.* Country-level operational implementation of the Global Plan for Insecticide Resistance Management. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9397–9402 (2013).
45. Martins, A. J. *et al.* Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One* **7**, e31889 (2012).
46. Kliot, A. & Ghanim, M. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest. Manag. Sci.* **68**, 1431–1437 (2012).
47. Hardstone, M. C., Huang, X., Harrington, L. C. & Scott, J. G. Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **47**, 188–198 (2010).
48. Murataliev, M. B., Guzov, V. M., Walker, F. A. & Feyereisen, R. P450 reductase and cytochrome b5 interactions with cytochrome P450: effects on house fly CYP6A1 catalysis. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 1008–1015 (2008).
49. Molina-Cruz, A. *et al.* Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J Biol Chem* **283**, 3217–3223 (2008).

50. Pan, X. *et al.* Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E23–E31 (2012).
51. Tchankouo-Nguetcheu, S. *et al.* Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PLoS One* **5**, e1000632 (2010).
52. Tchankouo-Nguetcheu, S. *et al.* Infection by chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Parasit Vectors* **5**, 264 (2012).
53. Miller, A. L. E., Tindall, K. & Leonard, B. R. Bioassays for monitoring insecticide resistance. *J Vis Exp* **46**, e2129 (2010).
54. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Geneva: World Health Organization (2006).
55. Jirakanjanakit, N. *et al.* Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. *J Econ Entomol* **100**, 545–550 (2007).
56. Milesi, P., Pocquet, N. & Labbé, P. BioRssay: a R script for bioassay analyses. (2013) (Milesi P, Pocquet N, Labbé P. BioRssay: a R script for bioassay analyses (<http://www.isem.univ-montp2.fr/recherche/equipes/genomique-de-ladaptation/personnel/labbe-pierrick/>).
57. R: The R project for statistical computing (<https://www.r-project.org/>, accessed 29 December 2017).
58. Stapleford, K. A. *et al.* Whole-genome sequencing analysis from the chikungunya virus Caribbean outbreak reveals novel evolutionary genomic elements. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004402 (2016).
59. Cedergreen, N., Ritz, C. & Streibig, J. C. Improved empirical models describing hormesis. *Environ Toxicol Chem.* **24**, 3166–3172 (2005).
60. Wickham, H. *ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis*. (Springer-Verlag, New York, 2009).

## Acknowledgements

We are grateful to Dr Antoine Enfissi for methodological discussions, to Mrs Sarah C. Chaney for English editing and proofreading the manuscript and to Dr Stanislas Talaga for fruitful discussions.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LW, ID, DR, RG, MK

Performed the experiments: LW, PG, AG

Analysed the data: AF, LW, ID, YE

Contributed reagents/materials/analysis tools: MV, AF, DR

Wrote the paper: LW, AF, YE, ID

## Competing Interests statement

The authors declare no competing interests.

## Figures

**Fig 1. Cumulative proportion of mosquitoes with viral dissemination from the infected midgut over time for each mosquito line and the reference NO strain.**

**Fig 2. Genotype proportions of mutations V1016I and F1534C involved in deltamethrin resistance in each mosquito tested line and the reference NO strain.** Proportions (%) of mosquitoes with each combination of alleles for these two mutations are represented in circles. Susceptible alleles are shown in blue letters and resistant ones in red. The colours of the circles refer to the number of resistant alleles in each genotype, becoming darker with the number of resistant alleles.

**Fig 3. Relation between dissemination saturation level and proportion of resistant alleles 1534C.**

**Fig 4. Expression ratio of *CYP6BB2*, *CYP6N12*, *GST2* and *trypsin* and that of the housekeeping gene *RpL8* in two groups (P and N).** N represents mosquitoes with positive midguts and negative heads, and P present mosquitoes with positive midguts and positive heads, 7 DPI.

## Tables

**Table 1. Results of bioassays.**

Strain	% KD 1 h	KDT <sub>50</sub> [95% CI] (min)	% 24 h M	RR <sub>50</sub> [95% CI]
IR03	100%	6.7 (6.1-7.3)	30.4% (± 5.9)	51.5 (37.3-71.2)
IR05	40% (± 4.8)	> 60	26.4% (± 4.0)	69.5 (50.8- 95.2)

<b>IR13</b>	100%	5.2 (4.6-5.8)	96% ( $\pm$ 2.3)	6.42 (4.6-9.0)
<b>NO</b>	100%	5.2 (4.7-5.6)	100%	1

---

% KD 1 h: percentage of mosquitoes knocked-down after 1 h of exposure to paper impregnated with 0.06% deltamethrin;  $KDT_{50}$ : theoretical time to knock down 50% of tested females exposed to 0.06% deltamethrin; % 24 h M: percentage mortality of females after 24 h of observation;  $RR_{50}$ : resistance ratio and its 95% confidence interval

**Table 2. Estimated parameters of the dynamics of disseminated infections.**

<b>Mosquito line</b>	<b>K</b>	<b>B</b>	<b><math>\Delta t</math></b>	<b>M</b>
<b>IR03</b>	0.63	1.23	3.6	3.0
<b>IR05</b>	0.50	0.86	5.1	3.1
<b>IR13</b>	0.67	1.10	4.0	2.8
<b>NO</b>	0.91	0.89	5.0	3.4

K: maximum prevalence of mosquitoes with a disseminated infection (saturation level); M: time to reach 50% of the saturation level K; B: the growth rate around M;  $\Delta t$ : the rise time of the exponential function (time for a virus to rise from 10% to 90% of its saturation level).

**Table 3. Estimates, standard errors and significance of factors in GLM regression for explaining dissemination status.**

	<b>Estimate</b>	<b>Standard error</b>	<b>z-value</b>	<b>Pr (&gt;  z )</b>
<b>(Intercept)</b>	<b>-3.129e+00</b>	<b>1.013e+00</b>	<b>-3.090</b>	<b>0.0020</b>
<b>Viral load in midgut</b>	<b>1.271e-05</b>	<b>3.058e-06</b>	<b>4.157</b>	<b>3.22e-05</b> ***
<i>VI016I</i>	1.549e+00	1.871e+00	0.828	0.4077
<i>VI016V</i>	2.806e+00	1.948e+00	1.441	0.1497
<i>F1534C</i>	-7.239e-01	1.724e+00	-0.420	0.6746
<i>F1534F</i>	-1.644e+00	1.846e+00	-0.891	0.3732
<i>CYP6BB2</i>	-2.279e-03	1.187e-02	-0.192	0.8478
<i>CYP6N12</i>	-2.294e-03	2.116e-02	-0.108	0.9137
<i>GST2</i>	<b>2.594e-01</b>	<b>1.294e-01</b>	<b>2.004</b>	<b>0.0451 *</b>
<i>Trypsin</i>	-1.085e-02	8.180e-03	-1.327	0.1847

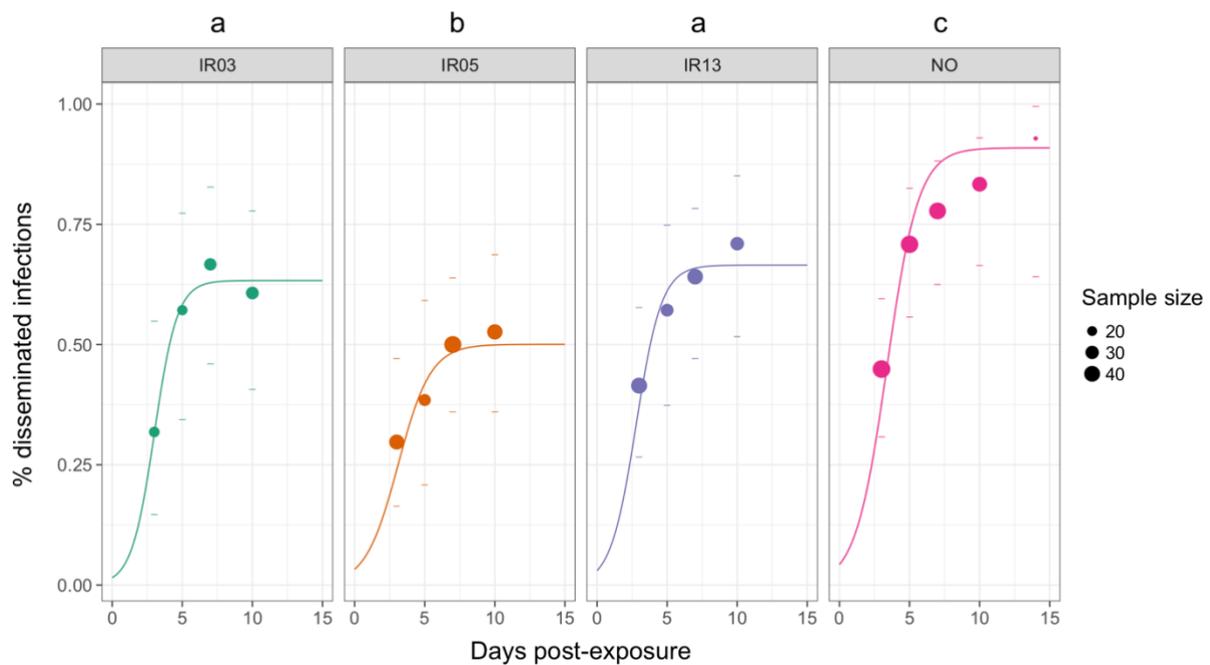
Significant codes: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05

**Table 4. Estimates, standard errors and significance of factors in GLM regression for explaining viral load in heads.**

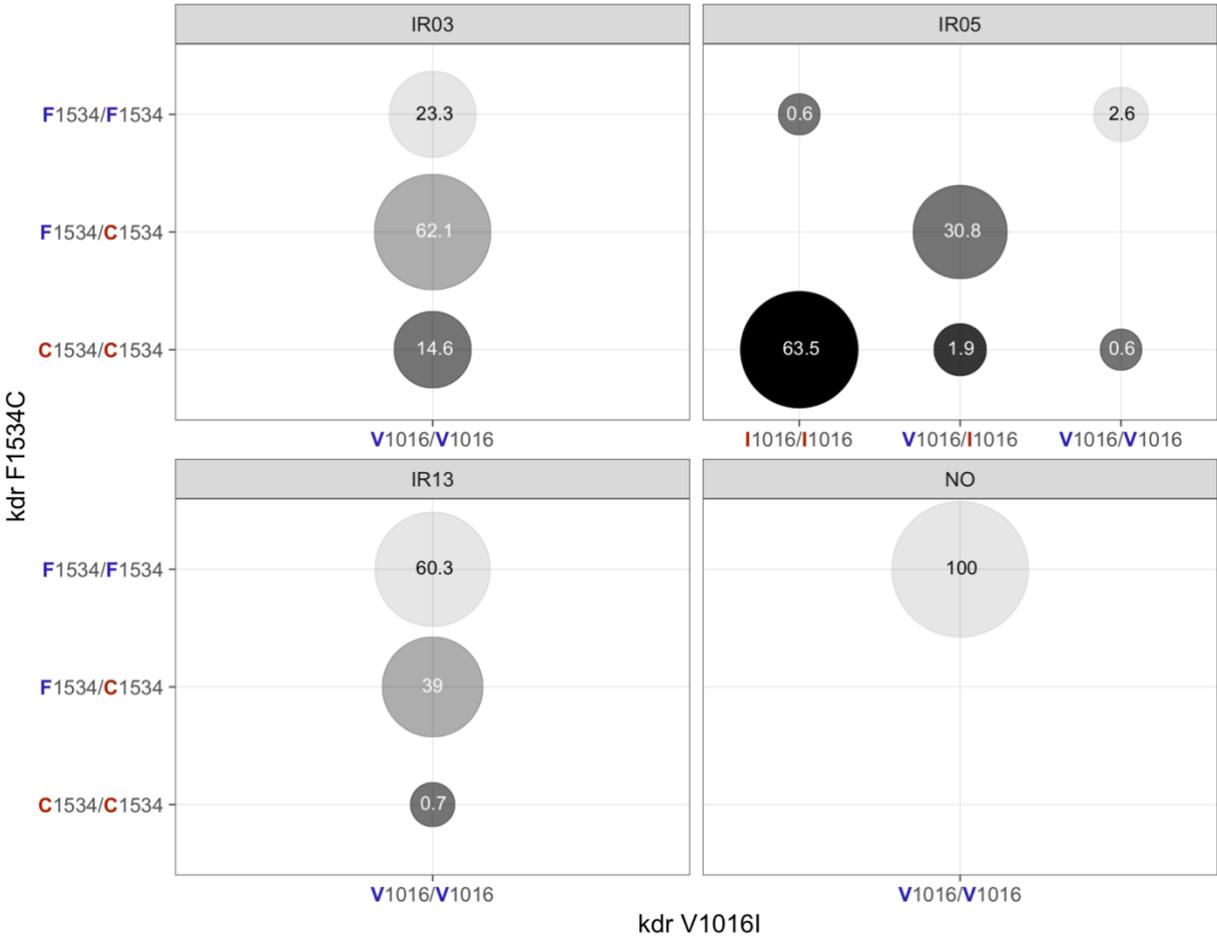
	<b>Estimate</b>	<b>Standard error</b>	<b>z-value</b>	<b>Pr (&gt;  z )</b>
<b>(Intercept)</b>	<b>1.122e+01</b>	<b>3.897e-01</b>	<b>28.801</b>	<b>2,00e-16</b>
<b>Viral load in midgut</b>	<b>1.275e-06</b>	<b>5.843e-07</b>	<b>2.182</b>	<b>0.03517 *</b>
<i>VI016I</i>	5.230e-01	5.845e-01	0.895	0.37642
<i>VI016V</i>	<b>1.105e+00</b>	<b>4.097e-01</b>	<b>2.698</b>	<b>0.01026 *</b>
<i>F1534C</i>	-1.895e-01	2.614e-01	-0.725	0.47290
<i>F1534F</i>	<b>-9.918e-01</b>	<b>2.817e-01</b>	<b>-3.521</b>	<b>0.00111 **</b>
<i>CYP6BB2</i>	<b>1.040e-02</b>	<b>4.327e-03</b>	<b>2.403</b>	<b>0.02113 *</b>
<i>CYP6N12</i>	-1.947e-02	1.188e-02	-1.638	0.10942
<i>GST2</i>	-2.044e-02	2.121e-02	-0.964	0.34105
<i>Trypsin</i>	1.911e-03	4.763e-03	0.401	0.69038

Significance: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05

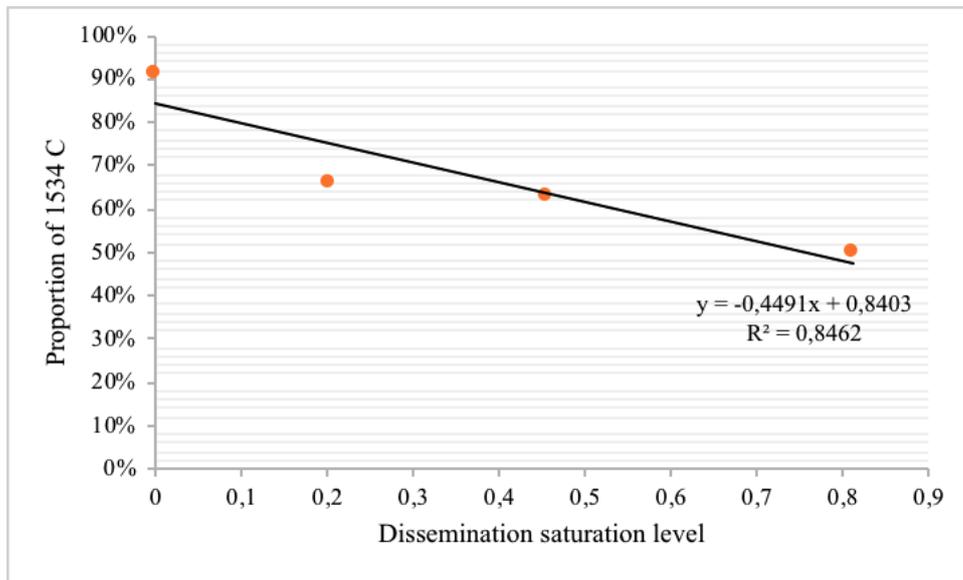
**Fig 1. Cumulative proportion of mosquitoes with a viral dissemination from the infected midgut over time for each isofemale line and the reference NO strain.** Points represent observed proportions of mosquitoes with a disseminated infection at each time point with their size being proportional to the sample size. The 95% confidence intervals are represented by dashes. Lines correspond to the fitted values obtained with a 3-parameter logistic model. Significant differences in the cumulative proportion of disseminated infection between each mosquito line are display by letters on the top of the graph, with different letters indicating significant differences.



**Fig 2. Genotype proportions for mutations V1016I and F1534C involved in deltamethrin resistance for each mosquito tested lines and the reference NO strain.** Proportion (%) of mosquitoes with each combination of alleles for these two mutations are represented in the circles. Susceptible alleles are displayed with a blue letter whereas resistant ones are in red. The circle colors refer to the number of resistant alleles in each genotype, with the darkness increasing according to the number of resistant alleles.

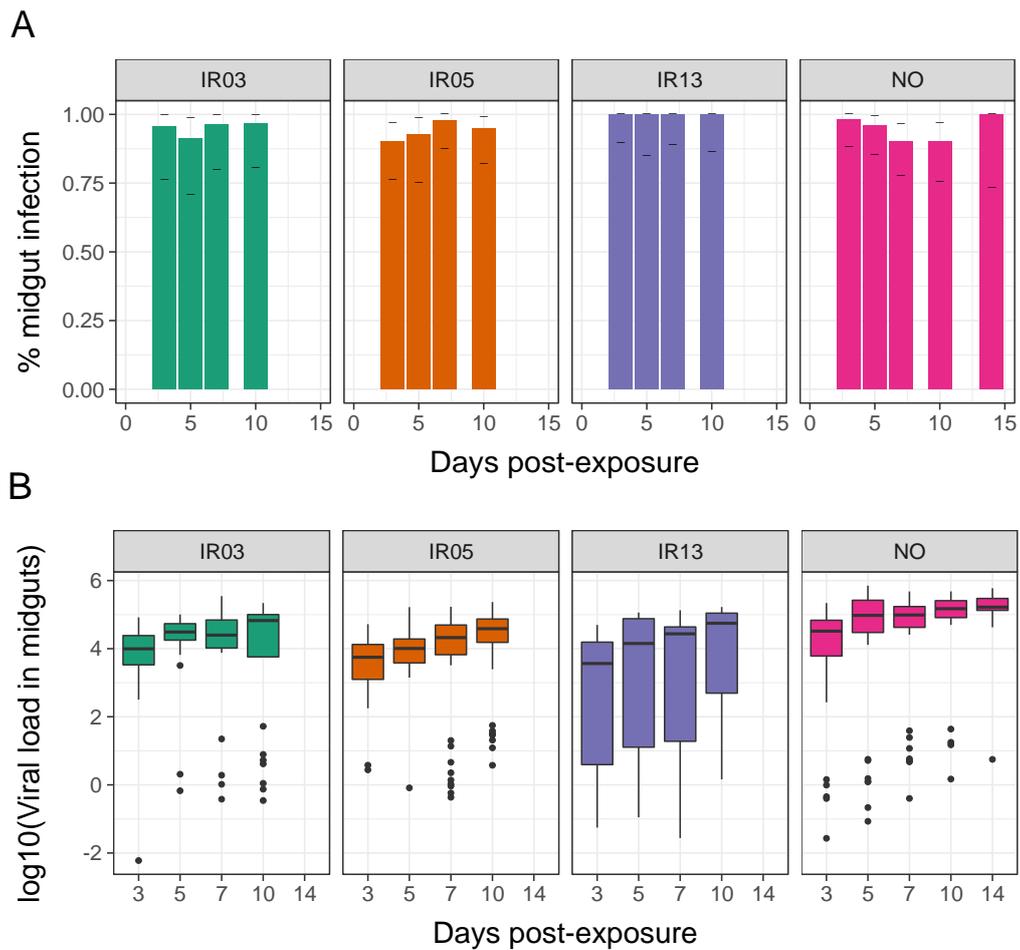


**Fig 3. Interactions between dissemination saturation level and the proportion of resistant alleles 1534C.**



## Supporting information

**S1 Fig. Prevalence of infected midguts for each isofemale lines and the reference NO strain and their respective viral load. A)** Bar charts representing the proportion of mosquitoes with an infected midgut over time. The 95% confidence intervals are represented by dashes. **B)** Virus load (RNA copies) in midguts over time as determined by qRT-PCR.



**S1 Table. Primers and probes used for *kdr* genotyping**

Mutation <i>kdr</i>	Primers and probes	Sequence
<b>V1016I</b>	1016-primer F	GCT-AAC-CGA-CAA-ATT-GTT-TCC-C
	1016-primer R	CAG-CGA-GGATGA-ACC-GAA-AT
	Val1016-probe	VIC <sup>2</sup> - CAC-AGG-TAC-TTA-ACCTTT-T
	Iso1016-probe	FAM <sup>3</sup> -CAC-AGA-TAC-TTA-ACC-TTT-TC
<b>F1534C</b>	Phe1534 primer F	GAT-GAT-GAC-ACC-GAT-GAACAG-ATC
	Cys1534 primer R	CGA-GAC-CAA-CAT-CTA-GTA-CCT
	Phe1534-probe	VIC-AAC-GAC-CCG-AAG-ATG-A
	Cys1534-probe	FAM- ACGACC-CGC-AGA-TGA

**S2 Table. Primers and probe used for qRT-PCR of CHIKV**

Name	Primers and probe (5' - 3')
<b>Amorce forward</b>	TGA-TCC-CGA-CTC-AAC-CAT-CCT
<b>Amorce reverse</b>	GGC-AAA-CGC-AGT-GGT-ACT-TCC-T
<b>Probe</b>	FAM <sup>1</sup> -TCC-GAC-ATC-ATC-CTC-CTT-GCT-GGC-TAMARA <sup>2</sup>

<sup>1</sup> FAM et <sup>2</sup> TAMARA are double fluorescence markers.

**S3 Table. Number of positive samples at each collected point.** The table includes the number of mosquitoes tested, the number of positive midguts, heads and saliva for IR03, IR05, IR13 and NO at 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days post-infection. Infection rate refers to the percentage of mosquitoes with positive midgut among total mosquitoes tested; dissemination rate refers to the percentage of mosquitoes with positive head among those with positive midguts; transmission rate refers to the percentage of mosquitoes with positive saliva among those with positive heads; transmission efficiency refers to the percentage of mosquitoes with positive saliva among total mosquitoes tested.

Mosquito		1 DPI	3 DPI	5 DPI	7 DPI	10 DPI	14 DPI
<b>IR03</b>	No. Tested	-	23	23	28	29	-
	No. of (+) Midgut	-	22	21	27	28	-
	Infection Rate (%)	-	95.7 (76.0-99.8)	91.3 (70.5-98.5)	96.4 (80.0-99.8)	96.6 (80.4-99.8)	-
	No. of (+) Head	-	7	12	18	17	-
	Dissemination Rate (%)	-	31.8 (14.7-54.9)	57.1 (34.4-77.4)	66.7 (46.0-82.8)	60.7 (40.7-77.9)	-
	No. of (+) Saliva	-	4	5	10	14	-
	Transmission Rate (%)	-	57.1 (17.4-96.9)	83.3 (50.5-100.0) <sup>a</sup>	55.6 (31.8-79.3)	82.4 (64.6-100.0)	-
	Transmission Efficiency (%)	-	17.4 (1.5-33.3)	50.0 (17.3-82.7) <sup>b</sup>	35.7 (17.6-53.8)	48.3 (29.7-66.8)	-
<b>IR05</b>	No. Tested	-	41	28	47	40	-
	No. of (+) Midgut	-	37	26	46	38	-
	Infection Rate (%)	-	90.2 (76.0-96.8)	92.8 (75.0-98.8)	97.9 (87.3-99.9)	95.0 (81.8-99.1)	-
	No. of (+) Head	-	11	10	23	20	-
	Dissemination Rate (%)	-	29.7 (16.4-47.2)	38.5 (20.9-59.3)	50.0 (36.1-63.9)	52.6 (36.1-68.7)	-
	No. of (+) Saliva	-	4	8	11	17	-
	Transmission Rate (%)	-	36.4 (6.4-66.3)	80.0 (53.8-1)	47.8 (26.9-68.8)	85.0 (68.9-100.0)	-
	Transmission Efficiency (%)	-	9.8 (0.5-19.0)	28.6 (11.5-45.6)	23.4 (11.1-35.7)	42.5 (27.0-58.0)	-
<b>IR13</b>	No. Tested	-	41	28	39	31	-
	No. of (+) Midgut	-	41	28	39	31	-
	Infection Rate (%)	-	100.0	100.0	100.0	100.0	-
	No. of (+) Head	-	17	16	25	22	-
	Dissemination Rate (%)	-	41.5 (26.7-57.8)	57.1 (37.4-75.0)	64.1 (47.2-78.3)	71.0 (51.8-85.1)	-
	No. of (+) Saliva	-	15	16	19	12	-
	Transmission Rate (%)	-	88.2 (72.4-100.0)	100.0	76.0 (58.8-93.2)	54.5 (33.2-75.9)	-
	Transmission Efficiency (%)	-	36.6 (21.6-51.5)	57.1 (38.4-75.8)	48.7 (32.8-64.6)	38.7 (21.2-56.2)	-
<b>NO<sup>c</sup></b>	No. Tested	30	50	50	50	40	14
	No. of (+) Midgut	30	49	48	45	36	14
	Infection Rate (%)	100.0	98.0 (88.0-99.9)	96.0 (85.1-99.3)	90.0 (77.4-96.3)	90.0 (75.4-96.8)	100.0
	No. of (+) Head	5	22	34	35	30	13
	Dissemination Rate (%)	16.7 (3.1-30.3)	44.9 (30.9-59.7)	70.8 (55.7-82.6)	77.8 (62.5-88.3)	83.3 (66.5-93.0)	92.9 (64.2-99.6)
	No. of (+) Saliva	0	6	18	21	22	7

Transmission Rate (%)	0	31.6 (10.2-53.1)	64.3 (46.1-82.4)	77.8 (61.7-93.8)	91.7 (80.3-100.0)	53.8 (22.5-82.2)
Transmission Efficiency (%)	0	13.3 (3.3-23.4)	45.0 (29.4-60.6)	52.5 (36.8-68.2)	73.3 (57.2-89.5)	50.0 (22.8-77.2)

<sup>a</sup> There are just 6 positive heads instead of 12, that have been taken into account for calculating transmission rate, because others 6 mosquitoes which have also the positive heads died during the anesthetization on ice with no saliva sample result.

<sup>b</sup> There are just 10 mosquitoes tested instead of 23, that have been taken into account for calculating transmission efficiency, because others 13 mosquitoes died during the anesthetization on ice without saliva sample collection.

<sup>c</sup> In the case of NO, there are 5, 10, 10 and 10 mosquitoes at 3, 5, 7 and 10 DPI respectively without results for saliva, there is no effect on calculation of infection and dissemination rate, but it computed just 45, 40, 40 and 30 mosquitoes tested for transmission efficiency, and computed 19, 28, 27 and 24 positive heads for transmission rate at 3, 5, 7 and 10 DPI.

## 4.2. Données complémentaires : influence des mécanismes de résistance sur la barrière de l'intestin moyen

### Résumé

*Aedes aegypti* est le vecteur principal du chikungunya à l'échelle mondiale, pour effectuer un cycle complet et réussir à transmettre le virus à différents hôtes, le virus doit traverser deux barrières tissulaires importantes chez le moustique, l'intestin moyen et la glande salivaire, l'un après l'autre.

Dans les manipulations précédentes, trois lignées isofemelles IR03, IR05 et IR13 présentant différents profils de résistance à la deltaméthrine ont été isolées puis infectées oralement par le CHIKV dans un laboratoire SLB 3. Néanmoins les taux de dissémination de l'intestin moyen à la tête restent relativement bas, avec 50% pour la lignée IR05, 63% pour IR03, et une sous-estimation de 66% pour IR13. Nous pouvons en déduire qu'il existe différents mécanismes de barrière entrant en jeu au niveau de l'intestin moyen.

Les intestins moyens de 7 jours après le repas sanguin infectieux ont été retenus que le moustique ait une tête positive ou négative, les niveaux d'expression de certains gènes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsine) associés à la résistance à la deltaméthrine ont été mesurés par qRT-PCR.

Les quatre gènes choisis sont surexprimés à différents niveaux qui correspondent à nos résultats de test en tubes précédents, la surexpression des gènes de détoxification y compris CYP6BB2 et GST2 peut influencer significativement la charge virale dans l'intestin moyen, qui est le seul facteur agissant directement sur l'effet de la barrière. Le seul représentant de la famille des sérine-protéases utilisé n'a pas montré d'effet significatif.

Par rapport à *kdr*, nous proposons que la résistance métabolique puisse provoquer des effets plus clairs, non seulement pour la barrière de l'intestin moyen, mais aussi sur la multiplication du virus, sa propagation dans le corps du moustique. Un échantillonnage plus grand pour des gènes candidats et plus des validations fonctionnelles devraient être réalisés dans la prochaine étape de la recherche.

## Abstract

*Aedes aegypti* is the main vector of chikungunya worldwide, to complete a cycle and successfully transmit the virus to different hosts, the virus must cross two important tissue barriers in the mosquito, the midgut and the salivary gland, one after the other.

In the previous manipulations, three isofemale lines IR03, IR05 and IR13 with different deltamethrin resistance profiles were isolated and then orally infected by CHIKV in an SLB 3 laboratory. Nevertheless, the rates of dissemination from the midgut to the head remain relatively low, with 50% for IR05, 63% for IR03, and an underestimation of 66% for IR13. We can deduce that there are different barrier mechanisms involved in the midgut.

7 days after the infectious blood meal midguts were collected whether the mosquito has a positive or negative head, the levels of expression of certain genes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsin) associated with resistance to deltamethrin were measured by qRT-PCR.

The four selected genes are overexpressed at different levels that correspond to our previous tube test results, overexpression of the detoxification genes including CYP6BB2 and GST2 can significantly influence viral load in the midgut, which is the only factor acting directly on the effect of the barrier. The only representative of the family of serine proteases used did not show any significant effect.

Compared to *kdr*, we propose that metabolic resistance may cause most notable effects, not only for the midgut barrier, but also during the entire cycle of the virus in the mosquito. A larger screening for candidate genes and more functional validations should be performed in the next research stage.

## Introduction

*Aedes aegypti* est une espèce de moustiques urbains considérée comme le vecteur principal du chikungunya à l'échelle mondiale. La propagation du virus dans le corps du moustique commence par l'intestin moyen et finit par la salive. L'intestin moyen et la glande salivaire sont les deux barrières tissulaires les plus importantes à traverser pour que le virus soit en mesure d'effectuer un cycle complet et réussi dans l'organisme hôte (Franz et al. 2015).

Dans les manipulations précédentes, trois lignées Isofemelles ont été isolées et infectées oralement par CHIKV. Les résultats ont montré qu'elles étaient toutes très sensibles à l'infection par CHIKV en exprimant un taux d'infection supérieur à 90% à 3 DPI. Néanmoins des différences significatives ont été observées entre ces lignées au niveau du taux de dissémination de l'intestin moyen à la tête avec 50% de dissémination virale pour la lignée IR05, 63% pour IR03, et une sous-estimation de 66% pour IR13. Ainsi, plus d'un tiers des moustiques testés sont infectés au niveau de l'intestin moyen, alors que leurs têtes sont saines. Nous pouvons en conclure qu'entre ces trois lignées, différents mécanismes de barrière entrent en jeu au niveau de l'intestin moyen.

Il a été démontré que les protéines digestives comme la trypsine et la chymotrypsine réalisant le processus de digestion du repas sanguin (Isoe et al. 2009), et la plupart des protéines de détoxification comme CYP P450, GST et CCE qui dégradent les molécules des toxines (Smaghe and Tirry 2001 ; Félix et al. 2010) oenocytes autour de l'intestin moyen et sous les cuticules, ce qui pourrait influencer le niveau de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez l'insecte (Murataliev et al. 2008). Les ROS ont été signalés pour moduler *Anopheles gambiae* immunisé contre les bactéries et le plasmodium (Molina-Cruz et al. 2008) et ont été liés à l'activation de la voie Toll pour la défense de l'infection par le DENV chez l'*Aedes aegypti* (Pan et al. 2012). En outre, beaucoup de sérine-protéases ont également été exprimées différemment dans les populations résistantes à la deltaméthrine (Dusfour et al. 2015). La famille des sérine-protéases pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire à l'infection virale chez les moustiques, certaines protéases de l'intestin moyen pourraient en fait limiter l'infectivité du DENV-2 chez *Aedes aegypti* (Brackney, Foy, and Olson 2008). Nous supposons que la dissémination de CHIKV était limitée dans IR05 en raison de la surexpression des sérine-protéases de type trypsine ainsi que d'autres protéines de détoxification.

Dans cette expérience, les niveaux d'expression de certains gènes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsine) associés directement ou indirectement à la résistance à la deltaméthrine dans les populations de Guyane et à l'échelle mondiale ont été mesurés par qRT-PCR dans des lots de moustiques ayant une infection de l'intestin moyen mais ayant ou pas une dissémination (Dusfour et al. 2015; Faucon et al. 2015, 2017).

L'objectif principal est d'investiguer sur une association entre les mécanismes de résistance et la dissémination du chikungunya dans le moustique, plus spécifiquement au niveau de la barrière de l'intestin moyen.

## Matériels et méthodes

### Echantillons

Selon la courbe dynamique de dissémination, 7 jours après le repas sanguin infectieux, toutes les lignées IR03, IR05 et IR13 ont atteint le plateau, le taux de dissémination de l'intestin moyen à la tête avec 50% de dissémination virale pour IR05, 63% pour IR03, et 66% pour IR13, leurs intestins moyens de ce point ayant tête positive ou pas ont été retenus (Table 1).

**Table 1. Nombre d'intestins moyens choisis pour réaliser la PCR métabolique.** Les intestins moyens ont été retenus, 7 jours après le repas sanguin infectieux, que les têtes soient infectieuses ou non.

Lignées	No. Total	No. (Tête +)	No. (Tête -)
<b>IR 03</b>	27	18	9
<b>IR 05</b>	30	16	14
<b>IR 13</b>	30	18	12
<b>NO</b>	30	20	10
<b>(Référence)</b>			

### Mesure de niveaux d'expression des gènes de détoxification par qPCR

L'ARN total a été extrait pour l'intestin moyen individuel avec le kit RNeasy de Qiagen, la concentration et la qualité de l'ARN complet ont été détectées et ajustées par NanoDrop 2000c, et alors l'ARN a été traitée avec de la DNase afin d'éviter toute contamination avec l'ADN génomique. Des brins de synthèse d'ADN complémentaire (cDNA) ont été réalisés avec le kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), en suivant le protocole du fabricant.

Les amorces pour ces gènes ont été conçues par Dusfour et al (Dusfour et al. 2015), les gènes candidats incluent : un gène de référence RpL8 ; deux gènes venant de la famille CYP450 (CYP6BB2, CYP6N12) ; un gène venant de la famille GST, (GST2) ; plus un gène de trypsine.

La qPCR a été réalisée selon le protocole de Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), les Ct ont été analysées directement par le logiciel StepOne Software version 2.3.

## **Analyse statistique**

La quantification relative du niveau d'expression des gènes cibles dans l'intestin moyen d'un moustique individuel testé est comparé à un de la souche NO en utilisant RpL8 comme gène de référence (Pfaffl 2001).

Les résultats de la qRT-PCR ont été normalisés en utilisant le gène RpL8, la quantification relative du niveau d'expression des gènes a été déterminée en utilisant la méthode comparative  $\Delta\Delta C_t$  (conçue par PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Forster City, CA) avec la formule  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Ainsi, en combinant ces informations avec les données des manipulations précédentes, nous sommes en mesure à partir de chaque individu de déterminer :

- Résistance ratio de la population.
- Mutation V1016I.
- Mutation F1534C.
- Résultat de PCR et charge virale de l'intestin moyen.
- Résultat de PCR et charge virale de tête.
- Résultat de PCR et charge virale de salive.
- Niveau d'expression de CYP 6BB2, CYP 6N12, GST-2 dans l'intestin moyen.

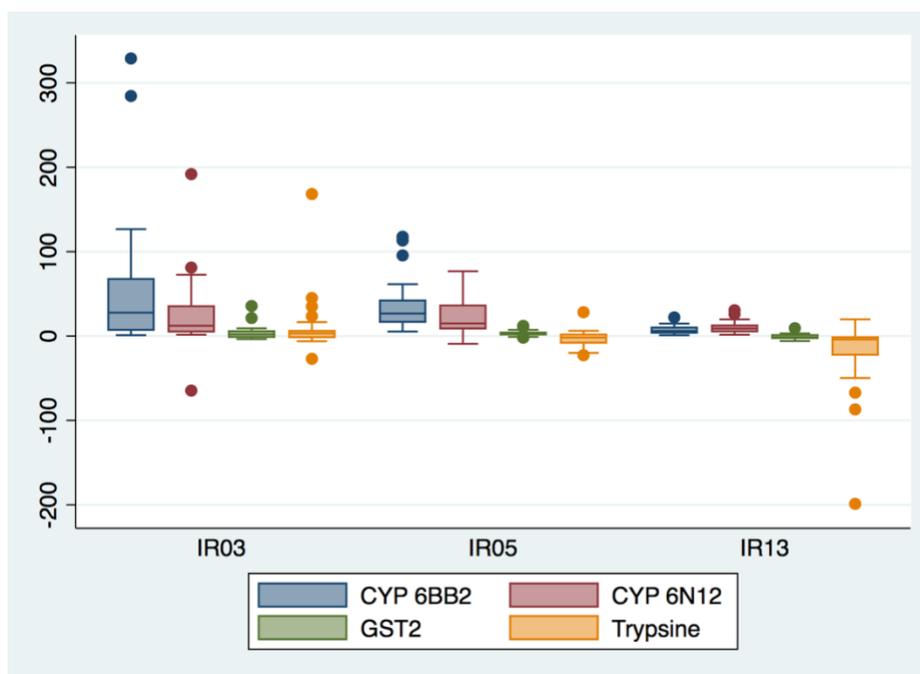
Le test Krushal-Wallis, le test de corrélation, et le test linéaire multiple (analyse multivariée) ont été utilisés pour déterminer la valeur de P, selon lequel  $P \leq 0.05$  était considéré comme significatif. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.

## **Résultats**

Au total, 87 intestins moyens ont été testés, ce sous échantillonnage présentait 67,82 % de V1016V homozygote sensible de type sauvage, 12,64 % de V1016I hétérozygote et 19,54 % de I1016I homozygote de types résistants. Pour la mutation F1534C, il présentait 29,89 % de F1534F homozygote sensible de type sauvage, puis avec 45,98 % de F1534C hétérozygote et 24,14 % de C1534C homozygote de types résistants.

Selon le test « speakman rank correlation rho », les niveaux d'expression de CYP6BB2 ( $r=0,57$ ), CYP6N12 ( $r=0,31$ ), GST ( $r=0,55$ ) et trypsine ( $r=0,21$ ) corroborent positivement ( $p<0,05$ ) les résultats des tests en tubes pour lesquels le ratio de résistance était respectivement de 51,5, 69,5

et 6,42 pour IR03, IR05 et IR13. Par rapport aux GST et Trypsine (expression ratio <5), les CYP6BB2 et CYP6N12 sont exprimés différemment (Kruskal-Wallis,  $P < 0,001$ ) dans les lignées différentes (Figure 1). Le CYP6BB2 est plus surexprimé chez IR03 (expression ratio = 58) et IR05 (expression ratio = 35) que chez IR13 (expression ratio = 7). Le CYP6N12 est également plus surexprimé chez IR03 (expression ratio = 29) et IR05 (expression ratio = 22) que chez IR13 (expression ratio = 10).



**Figure 1. Histogramme d'expression des quatre gènes dans l'intestin moyen des trois lignées isofemelles**

Après des tests linéaires multiples, l'expression de CYP6BB2 et GST2 peut influencer la charge virale dans l'intestin moyen ( $p < 0,01$ ). La modélisation des données binaires des têtes infectées / non infectées, représentant le virus disséminé / non disséminé, a démontré que seule la charge virale dans l'intestin moyen a eu des effets sur le statut de dissémination, les moustiques ayant une tête positive présentaient une charge virale supérieure dans l'intestin moyen par rapport aux moustiques ayant une tête négative ( $p < 0,001$ ). En outre, la charge virale dans les têtes était expliquée de manière significative par la charge virale dans l'intestin moyen ( $p = 0,01$ ), les génotypes à deux mutations (V1016I :  $p < 0,001$  et F1534C :  $p = 0,001$ ) et l'expression du gène CYPBB2 ( $p = 0,02$ ) (Table 1). Enfin, la charge virale dans la tête pouvait influencer la transmission de virus par sécrétion dans la salive ( $p = 0,04$ ), et l'expression de CYP6N12 présentait la possibilité d'influencer la charge virale dans la salive ( $P = 0,03$ ).

**Table 1. Résultats de l'analyse multivariée.**

Réponses	Facteurs	Coefficients	Pv
Charge virale dans l'intestin moyen	CYP6BB2	-1583,4	0,00553 **
	GST2	25602,9	1,17e-08 ***
Dissémination dans la tête	CV dans l'intestin moyen	1,052e-05	2,82e-05 ***
	CV l'intestin moyen	1,746e-01	0,012780 *
Charge virale dans la tête	V1016V	2,651e+05	0,000791 ***
	F1534F	-2,409e+05	0,001037 **
	CYP6BB2	8,533e+02	0,021269 *
Transmission dans la salive	CV dans la tête	5,725e-06	0,0417*
Charge virale dans la salive	CYP6N12	1,1198	0,0362*

CV : Charge virale

Codes significatifs : 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05

## Conclusion et discussion

La barrière de l'intestin moyen et de la glande salivaire sont des barrières importantes pour évaluer la compétence vectorielle des moustiques pour transmettre la maladie (Franz et al. 2015). Le but principal est d'étudier l'existence de l'association entre les mécanismes de résistance et la dissémination du chikungunya pour traverser la barrière de l'intestin moyen. Les mécanismes comprennent deux mutations *kdr* et l'expression de quatre gènes dans l'intestin moyen associés à la résistance à la deltaméthrine (Dusfour et al. 2015; Faucon et al. 2015, 2017).

Selon les résultats, les deux mutations V1016I et F1534C n'ont pas présenté des rôles directs et significatifs sur la dissémination de virus entre l'intestin moyen et la tête, en revanche elles peuvent participer à déterminer l'amplification de virus dans la tête de moustique. De plus, par rapport à l'effet sur la compétence vectorielle, l'existence de ces deux mutations *kdr* est capable d'influencer plutôt la capacité vectorielle en provoquant des désavantages sur le développement immature et la reproduction des populations (Brito et al. 2013a).

Les quatre gènes choisis ont surexprimé aux différents niveaux qui correspondent à nos résultats de test en tubes, parmi eux, les niveaux de surexpression de CYP6BB2 et CYP6N12 sont plus élevés que GST2 et le gène de trypsine, qui sont en accord avec les résultats des recherches de Dusfour et al (Dusfour et al. 2015). Ces quatre gènes n'ont pas montré un rôle direct sur le statut de la dissémination (Table 1), par contre, la surexpression de CYP6BB2 et GST2 est liée à la charge virale dans l'intestin moyen, qui est le seul facteur lié avec l'effet de dissémination, donc nous supposons que la surexpression de CYP6BB2 et GST2 peut influencer la dissémination de virus de façon indirecte. L'infection par le CHIKV a entraîné une augmentation des protéines impliquées dans la détoxification (Tchankouo-Nguetcheu et al. 2010a), donc la surexpression de

CYP6BB2 et CYP6N12 est liée à la charge virale dans la tête et la salive. Il y a certaines protéases à sérine de l'intestin moyen qui pourraient en fait limiter l'infectivité du DENV-2 chez *Aedes aegypti* (Brackney, Foy, and Olson 2008), un seul gène représentatif a été choisi pour cette manipulation, mais il n'a pas présenté un effet significatif.

La transcription différentielle de ces 4 gènes sélectionnés a été identifiée par la technique transcriptomique (J.-P. David et al. 2013). Cette technique est largement utilisée pour identifier des gènes candidats, mais il existe aussi certaines contraintes, par exemple elle ne peut pas suivre les modifications au niveau génomique, de plus, le travail avec l'ARN est très délicat et coûteux par rapport avec l'ADN.

D'après l'analyse de la séquence du génome complet, il y a 160, 49 et 26 séquences des gènes CYP450, CCE et GST respectivement chez *Aedes aegypti* (Strode et al. 2008), à cause de la limitation de la quantité de l'ARN extrait par un seul intestin moyen, seulement 4 gènes ont été testés ici. Un pool de 25 moustiques permettrait de détecter un plus large nombre de candidats pour une recherche ultérieure, parce que la hausse de l'activité CCE a été signalée chez des populations d'*Ae. aegypti* d'autres pays d'Amérique du sud et des Caraïbes (Saavedra-Rodriguez et al. 2014 ; Goindin et al. 2017). Ensuite selon les travaux de Dusfour et al, la surexpression de la sous-famille CYP6 et CYP9J, 7 gènes de trypsine et la CCE3 furent largement signalée chez les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes en Guayne.

Ainsi, dans cette expérience, l'existence de mutations V1016I et F1534C n'influence pas directement sur la dissémination de virus de l'intestin moyen à la tête, la charge virale dans l'intestin moyen est le seul facteur qui peut influencer directement l'effet de la barrière. La surexpression des gènes de détoxification y compris CYP6BB2, CYP6N12 et GST2 peut influencer la charge virale dans l'intestin moyen, la tête ou la salive, qui sont importants pour l'évaluation de la compétence vectorielle. On trouve aussi l'existence d'un impact de la résistance *kdr* et métabolique sur la multiplication du virus et sa propagation dans le corps du moustique.

## 5. COUT DE LA RESISTANCE CHEZ LES LIGNEES ISOFEMELLES

---

## Introduction

Trois lignées isofemelles IR03, IR05 et IR13 présentant différents profils de résistance à la deltaméthrine ont été isolées puis infectées oralement par le CHIKV dans un laboratoire SLB 3. Les résultats ont montré les effets significatifs de la résistance à la deltaméthrine sur la compétence vectorielle des moustiques isofemelles pour la transmission du CHIKV.

Selon les recherches de Ross et al, la capacité vectorielle des moustiques est estimée par sa compétence vectorielle, mais il a aussi été démontré que l'écologie environnementale (la température, la nourriture et la communauté du microbiome du site larvaire) et les traits d'histoire de vie (la survie et la densité d'adultes) de la population jouent un rôle important (Smith et al. 2012).

La résistance aux insecticides est généralement considérée comme entraînant un coût d'aptitude. Pour comprendre plus complètement les interactions entre la résistance aux insecticides et la transmission du virus, les traits d'histoire de vie doivent être pris en compte. Le coût de la résistance chez les moustiques a été montré initialement chez l'espèce *Culex* résistante aux insecticides organophosphorés (Raymond et al. 2001), puis successivement chez les *Aedes* résistants aux pyréthrinoïdes (Brito et al. 2013b) et les *Anopheles* résistants aux moustiquaires imprégnées avec pyréthrinoïde (Diop et al. 2015). Des effets pléiotropes négatifs de la résistance ont été observés sur les traits d'histoire de vie, nous pouvons observer que la réduction pour la réussite de l'accouplement et l'alimentation sanguine, la fécondité, le taux d'éclosion, la viabilité des œufs et la survie des larves et adultes, alors qu'un temps de développement plus long a été observé pour les stades immatures (Jaramillo-O., Fonseca-González, and Chaverra-Rodríguez 2014; Plernsub et al. 2013; Diniz et al. 2015; Otali et al. 2014; Alam et al. 2017; Brito et al. 2013a; Martins et al. 2012).

Concernant la méthode isofemelle, la recherche a été réalisée chez les lignées isofemelles de *Drosophila melanogaster*, qui a montré des corrélations négatives entre la résistance à trois insecticides organophosphorés et sa productivité (Takahiro Miyo and Oguma 2002).

L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer, s'il existe, le coût de la résistance à la deltaméthrine sur nos lignées isolées. Nous proposons ici d'analyser trois paramètres qui ont déjà été largement étudiés, tels que la durée de développement larvaire, la mortalité des stades juvéniles (larve et nymphe) et le sexe ratio dans la forme adulte.

## Méthodes

Les moustiques choisis comprennent : *i*) Quatre lignées isofemelles (IR03, IR05, IR13 et IR36), qui présentent des niveaux et mécanismes différents de résistance à la deltaméthrine. *ii*) Cayenne 0115, qui est une population venant de Cayenne ayant naturellement colonisé du terrain depuis seulement une génération. *iii*) Nouvelle-Orléans, la souche de référence sensible maintenue en laboratoire.

Après l'éclosion dans l'eau osmosée, pour chaque lignée un total de 30 à 35 larves en stade L1 a été sélectionné et élevé dans un pot individuel (100 mL de H<sub>2</sub>O). Celles atteignant le stade nymphal sont enregistrées et séparées de celles qui sont toujours au stade larvaire.

Ainsi, un suivi par lignée et par jour de nymphose et d'émergence sera effectué pour chaque adulte. Les moustiques adultes sont comptés en prenant soin de distinguer femelles et mâles. Les nymphes qui ne sont pas encore devenues adultes resteront en observation.

Pour toutes les lignées testées, 5-plicats sont réalisés en parallèle, et pour les 4 lignées isofemelles, les tests ont duré sur deux générations afin d'étudier l'évolution.

Analyse des données :

1. Durée du développement larvaire :

Le temps de l'éclosion jusqu'à l'apparition de nymphes.

2. Mortalité des stades juvéniles :

Le nombre de larves qui n'ont pas réussi à traverser le stade larvaire et le stade nymphal.

3. Sexe ratio des adultes émergés :

Le ratio entre le nombre de mâles adultes et le nombre de femelles adultes.

## Résultats

(1) Aucune différence significative sur la durée moyenne de développement des stades immatures entre les lignées isofemelles.

La durée moyenne de développement des stades aquatiques (nymphe et larve) a varié de 7,95 jours (NO) à 8,71 jours (IR36 F5) (Figure 1). Une ANOVA réalisée dans le logiciel PAST 3 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) a mis en évidence une différence entre ces durées moyennes.

Ainsi, suite à une comparaison de moyenne par paire, les résultats marquants sont qu'il n'existe aucune différence significative des durées de développement entre deux générations successives d'une même lignée, à l'exception de la lignée IR36. La durée de développement de la lignée Cayenne est similaire aux lignées peu résistantes mais différente des lignées IR03, IR05 et NO. Même si, par rapport à ces lignées, la lignée Cayenne était 1000 fois plus résistante.

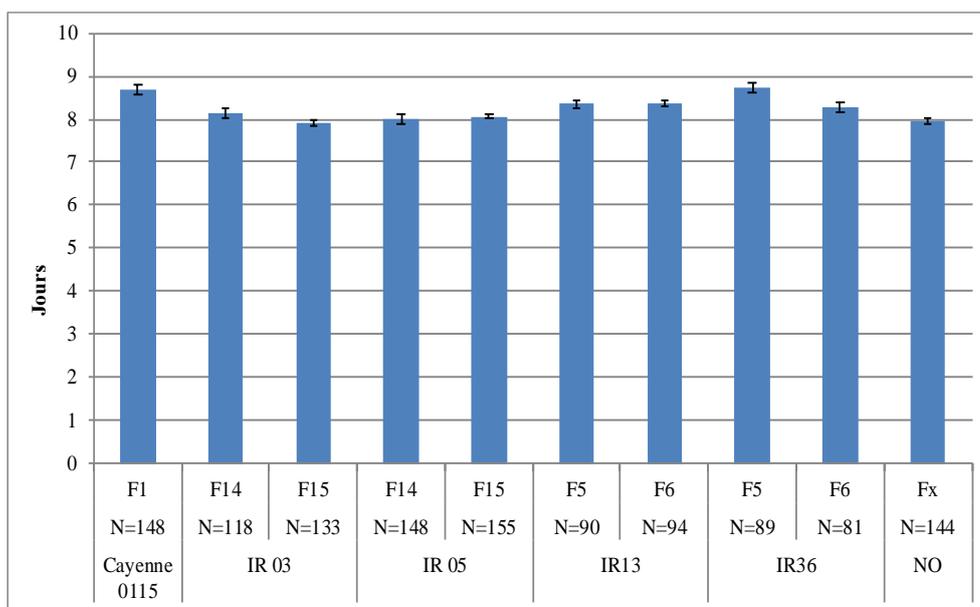
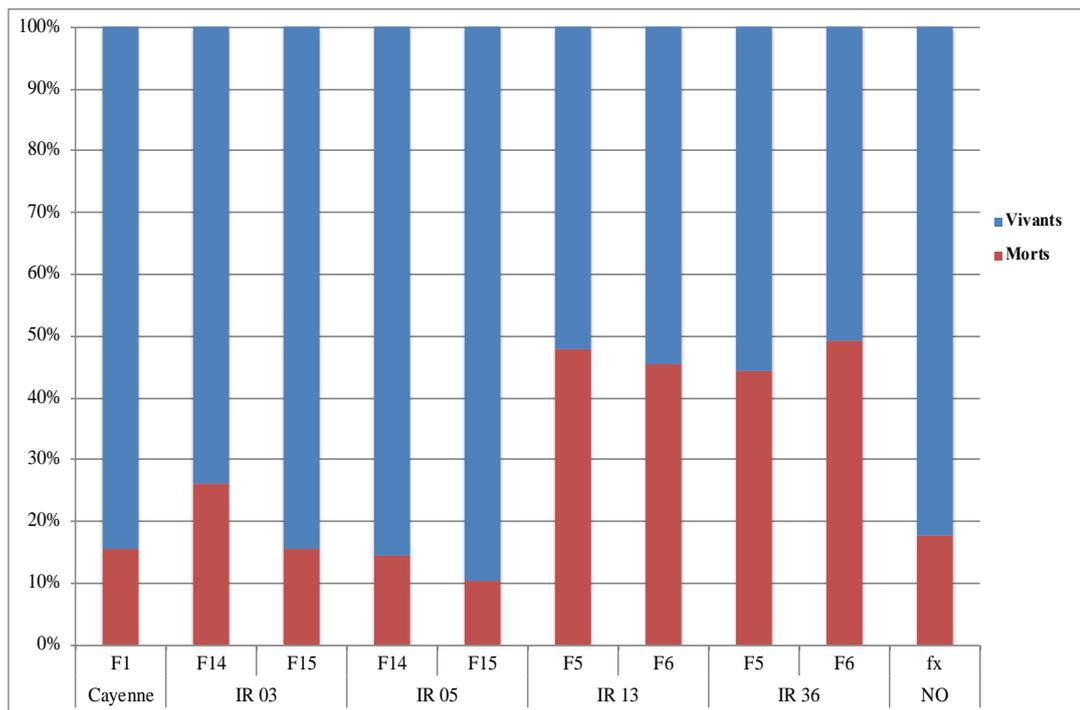


Figure 1. Graphique représentant la durée moyenne du développement des stades immatures par lignée et génération.

(2) La mortalité totale des stades immatures est plus élevée chez les lignées isofemelles moins résistantes.

Le graphique de la Figure 2 représente le pourcentage de stades immatures (nymphe et larves) morts et vivants obtenus pour chaque lignée et génération d'isofemelles IR13 (F5 /F6) ; IR36 (F5 /F6) ; IR 03 (F14 /F15) ; IR 05 (F14 /F15) ; Nouvelle-Orléans et Cayenne (F1).

Nous observons que pour l'ensemble des lignées, le pourcentage de vivants est compris entre 51% et 90%. Les proportions des lignées isofemelles les moins résistantes (IR13 et 36) sont significativement plus faibles que les autres (test du Chi2,  $p < 0,001$ ).

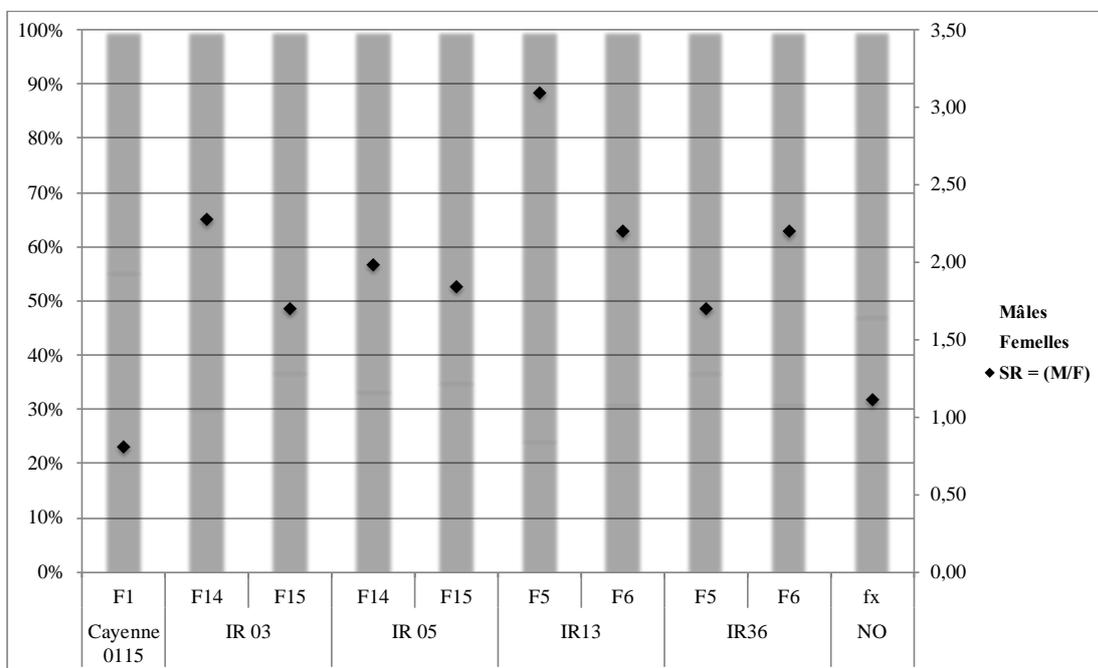


**Figure 2. Graphique représentant la proportion de morts et de vivants dans les stades immatures par lignée et génération.**

(3) Aucune différence significative sur la proportion d'adultes émergés et le sex-ratio entre les lignées isofemelles.

Nous observons que pour la plupart des lignées, le pourcentage d'adultes mâles (en rouge) est nettement supérieur à celui des adultes femelles (en bleu). En effet, le sex-ratio, défini comme le nombre de mâles divisé par le nombre de femelles, est compris entre 1,70 et 3,09 pour les lignées isofemelles, de 1,12 pour NO et de 0,8 pour la souche de Cayenne. On remarque ainsi que le pourcentage d'adultes femelles est supérieur pour la lignée Cayenne, avec 55% de femelles et 45% de mâles (Figure 3).

Aucune différence significative ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ) n'est ainsi observée entre les lignées isofemelles, quelle que soit la génération, ni entre les lignées Cayenne et NO. En revanche, une différence significative est observée entre ces deux groupes de lignées.



**Figure 3 : Graphique représentant le sexe ratio et la proportion de mâles et de femelles par lignées et génération.**

## Conclusion et discussion

Il n'existe que peu de différences entre deux générations successives ce qui laisse penser que la stabilité des lignées doit être confirmée. En revanche, les lignées moins résistantes (IR13 et 36) présentent un temps de développement sensiblement plus long que les lignées plus résistantes (IR03, 05), et proche de la population naturelle de Cayenne. Elles présentent également une surmortalité dans les développements des stades aquatiques. Le sexe ratio des lignées isofemelles

démontre un excès de mâles alors que ceux de la population de Cayenne et de NO sont proches de 1 :1. Diniz et al. n'ont observé aucune différence dans le sexe ratio (Diniz et al. 2015).

Plus d'informations sont nécessaires pour mieux définir le coût de la résistance parmi ces lignées isofemelles, grâce au travail de Théa Garandeau après moi, plus de traits d'histoire de vie ont été observés. L'analyse statistique montre néanmoins qu'il n'y a aucune différence entre les lignées en termes de gorgement et de longévité de l'adulte. En revanche pour la reproduction de la population, les femelles des lignées IR03 et IR05 prennent beaucoup plus de temps pour pondre après la première proposition de gorgement, et le nombre d'œufs pondus est significativement plus faible. De plus, la souche résistante IR05 a une fertilité significativement plus faible par rapport à IR03, IR13 et IR36.

Ainsi le coût de résistance de ces lignées isofemelles se manifeste plus clairement en termes de reproduction de la population que de développement immature. Cependant, les publications étudiant les mêmes traits de vie dans des populations résistantes aux pyréthriinoïdes (Brito et al. 2013b) et au téméphos (Diniz et al. 2015) rapportent que les mutations de la cible et la résistance métabolique augmentent le temps de développement larvaire.

En effet, ce type d'étude nécessite un grand nombre de moustiques qui ne peuvent généralement pas être atteints par les moustiques prélevés directement sur le terrain. Pour cette raison, les moustiques sont ramenés au laboratoire (généralement au stade larvaire) pour être élevés dans des conditions contrôlées (la température, l'humidité, la photopériode) permettant ainsi de maîtriser plusieurs paramètres importants tels que l'âge des moustiques, leur alimentation, la densité des larves et des adultes. Néanmoins, le coût de résistance observé dans les souches de laboratoire, les souches sélectionnées en laboratoire ou les souches expérimentales pourrait être produit artificiellement par colonisation ou sélection de résistance.

Le développement larvaire et l'émergence ne se sont pas désavantagés en absence d'insecticides chez nos lignées de isofemelles. Bien que ces quatre lignées aient été collectées dans la même zone géographique, certains facteurs génétiques peuvent impacter ces traits de vie. Une analyse de séquençage génétique des populations précisant les mécanismes exacts de résistance de ces lignées pourrait également aider à interpréter ce coût de résistance.

Les stratégies de gestion contre le moustique *Aedes aegypti* peuvent être envisagées ou renforcées par le coût de résistance en termes de la reproduction de la population. Par exemple, la dilution de l'allèle résistant (Paris 2010) grâce à la technique « haute dose refuge », qui consiste à mettre un gîte traité à la deltaméthrine à proximité d'un gîte non traité. Cette technique rend possible l'accouplement entre des résistants et des sensibles, donc permettant de diminuer la densité de population résistante.

## 6. CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

La Guyane française est une zone à fort risque épidémique pour les maladies causées par les pathogènes transmis par les moustiques. La lutte anti-vectorielle a commencé en 1949 dans ce territoire d'outre-mer, la pulvérisation spatiale et l'imprégnation des vêtements et des tissus (moustiquaires) par des insecticides chimiques sont deux moyens généralement recommandés (Y. Epelboin et al. 2018). Une des conséquences de l'utilisation massive est le développement de résistances en Guyane comme dans les autres régions du monde (Moyes et al. 2017). La complexité des mécanismes qui provoquent la résistance aux insecticides est suspectée d'induire des changements physiologiques et des effets pléiotropes sur le système immunitaire, et enfin de causer des variations sur la capacité du moustique à transmettre un parasite (Rivero et al. 2010). L'objectif principal de cette thèse est de définir si la résistance et ses mécanismes peuvent influencer la capacité des moustiques *Aedes aegypti* à transmettre CHIKV, en mesurant les variations de compétence vectorielle et le coût de résistance entre les lignées avec différents profils de résistance.

### 1. La compétence vectorielle des lignées de moustiques isofemelles

IR03, IR05 et IR13 sont les trois lignées isofemelles que j'ai choisi pour les expériences de compétence vectorielle. Parmi ces trois lignées, les profils de résistance à la deltaméthrine étaient distincts. Malheureusement, en Guyane, les moustiques sont devenus résistants, surtout dans l'agglomération de Cayenne, leur résistance ratio est mille fois plus élevé que celui de la lignée sensible Nouvelle-Orléans, IR13 avec un résistance ratio inférieur à dix, a été isolée en profitant la méthode de isofemelles. Par rapport à la lignée sensible Nouvelle-Orléans qui est importée, IR13 n'est pas une lignée vraiment sensible, mais l'utilisation de celle-ci pourrait limiter au maximum le bruit de fond génétique avec IR03 et IR05.

Les femelles de IR03, IR05, IR13 et Nouvelle-Orléans, infectées oralement par le CHIKV, ont présenté un taux d'infection très élevé (> 90%, seulement 3 jours après l'infection) pour tous les moustiques. Les valeurs des indices de compétence vectorielle dans cette étude étaient en accord avec les précédents travaux de Vega-Rúa et al qui ont prouvé que parmi 22 populations de moustiques *Aedes aegypti* collectées dans 10 pays d'Amérique du nord, d'Amérique centrale et d'Amérique du sud, toutes étaient très sensibles au CHIKV (> 95% infection dans les 7 jours suivant le repas infectieux) (Vega-Rúa et al. 2014).

Par contre, globalement les résultats du taux de dissémination de notre expérience étaient d'environ 50% à 7 jours après l'infection, ils étaient plus faibles comparés aux études de Vega-Rua et al qui ont montré un taux de dissémination supérieur à 95% à 7 jours après l'infection.

Compte tenu de l'état de transmission à 7 jours après l'infection, nos résultats de transmission ont varié de 48% à 85% et l'efficacité de transmission de 23% à 55%, qui étaient également moins importants par rapport aux résultats de Vega-Rua et al présentant une efficacité de transmission supérieure à 60 % de diffusion à 7 jours après l'infection.

Une des limites plus importantes de ce type de techniques est que la quantité de salive administrée par les femelles ne peut être estimée, une amélioration serait donc nécessaire pour assurer un contrôle de la réussite de la collecte de salive. Des indicateurs spécifiques (les marqueurs ou le changement de couleur) qui réagissent rapidement et sont simples à manipuler seraient d'un grand intérêt. Par exemple, les microARNs sont présents uniquement dans la salive de moustique infecté par le CHIKV (Maharaj et al. 2015), et la présence de la protéine D7 dans la salive de moustique peut être détectée directement par des anticorps d'origine humaine (Londono-Renteria et al. 2018).

Cette thèse montre de faibles taux de dissémination et de transmission par rapport aux recherches de Vega-Rua et al, qui ont aussi utilisé une population de moustiques venant de Guyane française. En comparant ces deux recherches, premièrement, les populations de moustiques utilisées partagent la même origine, mais le virus utilisé dans cette thèse est un clone issu de sérum de patient obtenu lors de l'épidémie de chikungunya dans les îles des Caraïbes en 2013. Les virus utilisés dans d'autres recherches proviennent de la Réunion et de Nouvelle-Calédonie. Deuxièmement, le statut d'infection, de dissémination et de transmission dans notre recherche a été détecté par la qRT-PCR qui détecte directement l'extrait d'ARN viral qui permet de mesurer le nombre de copies du virus, dans d'autres recherches le test d'unité formant des foyers (FFU) sur les cellules a été utilisé pour détecter la dose infectieuse. Le choix de deux méthodes différentes pour détecter la présence de virus limite la possibilité de comparaison des résultats des recherches, surtout quand le titre viral est faible. Par exemple, dans l'intestin moyen, où la charge virale est la plus importante, PCR et FFU ont présenté des résultats similaires, mais quand le titre est devenu faible dans les autres parties de corps, une différence significative a commencé à apparaître. Pour ce type d'expérience sur la compétence vectorielle il est donc recommandé, dans la mesure du possible, d'utiliser simultanément les deux méthodes par PCR et la culture cellulaire.

D'autres pistes à explorer, sont les faibles taux de dissémination et de transmission trouvés dans cette thèse, les causes possibles étant la présence de bactéries symbiotiques portant des gènes antiviraux (Beard et al. 1993), la présence de virus spécifiques aux insectes (Bolling et al. 2015) ou la co-infection avec *Wolbachia* (Pan et al. 2012 ; Caragata, Dutra, and Moreira 2016), ces trois

cas sont considérés comme pouvant diminuer la compétence vectorielle et inhiber la réplication d'un arbovirus.

Enfin, la variété des facteurs du laboratoire peut être aussi responsable des taux de dissémination et de transmission plus faibles, tel que la qualité de l'eau dont la concentration minérale peut être liée à la compétence vectorielle des moustiques (Reisen, Hardy, and Presser 1997), l'eau utilisée pour réaliser l'élevage des larves et préparer le coton sucré à 10% pour les adultes dans notre laboratoire, était stérile et sans minéraux. La plage des températures diurnes est également importante pour l'infection de CHIKV dans le corps des moustiques (Alto et al. 2018), dans notre cas, la température est réglée à 28°C constants pendant l'élevage et l'infection orale.

## **2. Le rôle des mécanismes de résistance sur la barrière de l'intestin moyen**

Les résultats principaux montrent que la lignée IR05 présentait un taux de dissémination plus bas par rapport à IR03 et IR13. Nous émettons l'hypothèse que l'existence d'une résistance pourrait possiblement ralentir la dissémination de virus à traverser la barrière de l'intestin moyen. Les intestins moyens datant de 7 jours après le repas sanguin infectieux chez les moustiques dont la tête était positive ou négative au CHIKV, ont été utilisés afin d'étudier les niveaux d'expression de quatre gènes CYP6BB2, CYP6N12, GST2 et trypsine, qui sont exprimés différemment dans les populations résistantes à la deltaméthrine (Dusfour et al. 2015 ; Faucon et al. 2015, 2017). Les CYP6BB2 et GST2 pourraient influencer le niveau de production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) chez l'insecte (Murataliev et al. 2008), et ont été liés à l'activation de la voie Toll pour la défense de l'infection par les arbovirus (Pan et al. 2012). La famille des sérine-protéases pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire de l'intestin moyen limitant l'infectivité (Brackney, Foy, and Olson 2008). La qPCR a été réalisée ici pour mesurer les niveaux de ces quatre gènes candidats au niveau de l'ARNm (David et al. 2013). Les CYP6BB2 et GST2 ont montré un lien significatif avec la charge virale dans l'intestin moyen. Le seul représentant de la trypsine utilisé n'a pas montré d'effet significatif.

La méthode protéomique est recommandée ici pour construire une liaison entre la résistance métabolique et l'infection dans l'intestin moyen du moustique. Elle pourrait mesurer directement l'activité enzymatique de détoxification (Wang et al. 2015) dans les intestins moyens de moustiques abritant différents profils de résistance, puis approfondir la comparaison des différences au sein de l'activité enzymatique entre les intestins moyens infectés et les non infectés, ou comparer la modification de l'activité enzymatique avant et après l'infection.

L'injection du CHIKV directement dans le thorax de nos lignées isofemelles (Vogels et al. 2016) est à envisager pour contourner la barrière de l'intestin moyen, afin d'étudier plus facilement la barrière de la glande salivaire des isofemelles.

### **3. Les coûts de résistance des isofemelles**

Le développement de la résistance aux insecticides est accompagné de désavantages qui diminuent l'aptitude d'un insecte à se développer ou à se reproduire par rapport à un insecte sensible (Kliot and Ghanim 2012). Des publications étudiant les coûts des résistances rapportent que les mutations de la cible (V1016I et F1534C) et la résistance métabolique provoquent une réduction de la réussite de l'accouplement, du repas sanguin, de la fécondité, de l'éclosion, de la viabilité des larves et de la survie des adultes, et à contrario un temps de développement plus long pour les stades immatures (résumé par Wang et al 2018, au cours de la soumission). En revanche, selon nos résultats, pendant le développement immature et l'émergence, le coût de résistance de nos lignées isofemelles ne peut pas être mis clairement en évidence, mais les travaux suivants de Théa Garandau ont présenté un coût de résistance significatif sur la reproduction (temps de ponte, fécondité et fertilité). Une analyse de séquençage du génome complet pourrait aider à comparer leur fond génétique, même si ces lignées ont été collectées dans la même zone géographique.

Nos lignées ont été sélectionnées artificiellement pour la résistance en conditions de laboratoire afin de contrôler la force de sélection, les conditions environnementales, la taille de la population et l'absence de migration, les effets de la résistance sont donc estimés dans les conditions optimales du laboratoire, permettant un stockage d'énergie suffisant pour compenser les désavantages provoqués par le développement de la résistance. Par exemple une forte compétition larvaire et le manque de nutrition peuvent prolonger le temps de développement larvaire et diminuer la compétence vectorielle des moustiques (Bara et al. 2015), il faudrait diminuer l'apport en nourriture des larves afin d'observer des différences importantes entre lignées sur le développement immature.

### **4. Gestion de la résistance et contrôle vectoriel**

La résistance croisée a été vérifiée chez nos lignées, les résultats ont montré que même si les lignées IR03 et IR05 ont été sélectionnées sous la pression de la deltaméthrine, elles sont résistantes également aux molécules  $\alpha$ -cyperméthrine et perméthrine venant de la famille pyréthroïde, au chlorpyrifos-méthyl venant de la famille organophosphate, au phenylpyrazole fipronil et aux carbamates (bendiocarbe et propoxur) (Y. Epelboin et al. 2018 b, soumission). Selon

les travaux de cette thèse, dans les conditions du laboratoire, l'existence de ces résistances a eu un effet sur la dissémination de virus et a provoqué des désavantages au niveau de la reproduction chez les moustiques résistants, afin de diminuer leur capacité vectorielle. En poursuivant sur cette voie, les moustiques pourraient être continuellement exposés à un large éventail de stress abiotiques ou biotiques sur le terrain, si la capacité des moustiques diminue aussi dans les conditions du terrain, une plus faible dose ou fréquence d'utilisation de la pulvérisation spatiale pourrait atteindre l'effet espéré, ces informations peuvent être prises en compte pendant la lutte intégrée de contrôle des moustiques résistants.

En Guyane française, des épidémies de fièvre jaune ont été observées à partir du 16<sup>ème</sup> siècle jusqu'en 1902, mais aucune n'a été observée depuis la découverte du vaccin dont l'inoculation a été rendue obligatoire sur le territoire en 1967. Le virus de la dengue circule dans le pays depuis 1940 et des épidémies sont souvent observées ce qui lui a valu d'être considéré comme une maladie hyperendémique (Adde et al. 2016). Le chikungunya a été introduit en décembre 2013 en Guyane française et le virus s'est propagé à tout le territoire en créant une épidémie en 2015 (Girod et al. 2016). De même, le Zika est apparu l'année suivante et a été suivi d'une épidémie de 36 semaines (Epelboin et al. 2016). En plus de CHIKV, la capacité des moustiques résistants à transmettre le DENV, le ZIKV ou une co-infection peut aussi être évaluée en utilisant les techniques mises en place durant cette thèse.

Ensuite, les mêmes tests pourront être réalisés sur les moustiques capturés directement sur le terrain avec les autres lignées de CHIKV qui n'ont jamais circulé en Guyane française telles que la lignée Ouest-Africaine, la lignée Est / Centre / Sud-Africaine (ECSA), et la lignée de l'Océan Indien (tels que les mutations A226V et I211T), les résultats montreront quelle lignée est propice à une transmission par les moustiques guyanais, permettant ainsi de mieux organiser le système de surveillance pour cette lignée de virus.

Enfin, les virus ont été récoltés dans différents organes (l'intestin moyen, la tête et la glande salivaire) en fonction du temps (3 jours, 5 jours, 7 jours et 10 jours post-infection) entre trois lignées isofemelles et une lignée de terrain provenant de Cayenne. Les échantillons subissent actuellement la technique quasispecies (Vignuzzi et al. 2006) à l'Institut Pasteur Paris au sein de l'équipe du Dr Vignuzzi pour évaluer la fidélité et la vitesse des mutations entre les lignées résistants et les lignées sensibles. Cette information d'évolution virale sera utile pour décrire la dynamique épidémique dans les Amériques, où la résistance est aujourd'hui bien développée et où les arboviroses ont une haute probabilité d'émerger.

Sur la base de ce travail, plusieurs perspectives de recherche peuvent être proposées :

### 1) Compléter la caractérisation de la résistance

Les tests phénotypique, génotypique et transcriptomique ont été réalisés pour caractériser les mécanismes chez des moustiques qui ont été sélectionnés sous la pression de la deltaméthrine, pour avoir une base de données plus complète, tout d'abord il serait pertinent d'ajouter des tests comme le test de répulsion spatiale et le test d'irritation de contact, afin de vérifier l'existence de modifications comportementales chez nos moustiques isofemelles (Achee et al. 2009). Ensuite, les femelles tolérantes ou résistantes aux pyréthriinoïdes ont vraisemblablement des cuticules plus épaisses que les femelles moins tolérantes ou sensibles (Wood et al. 2010), ce test pourrait évaluer la résistance cuticulaire de nos isofemelles, la famille CYP P450 comme CYP4G16 et CYP4G17 est aussi parfois associée à la fois à la résistance métabolique et à la résistance cuticulaire (Balabanidou et al. 2016). Il pourrait aider à déterminer les luttes correspondantes, par exemple, la lutte mécanique ou biologique seront plus efficaces que la lutte chimique contre les moustiques possédant une résistance cuticulaire. Puis, au niveau des protéines, le test permettrait de connaître précisément celles impliquées dans la résistance et qui seraient différemment exprimées chez les moustiques résistants (Wang et al. 2015), aidant à créer des molécules alternatives sans utiliser les mêmes modes d'action ou cibles. Enfin, le séquençage haut débit permettrait d'expliquer plus en détail les mécanismes de résistance et de suivre les modifications génétiques (Faucon et al. 2015, 2017). Le suivi de l'évolution permettrait d'ajuster la fréquence et la force du traitement, pour contrôler le développement de la résistance.

### 2) Optimiser la mesure de la capacité vectorielle

Pendant une vraie épidémie, la situation est plus compliquée qu'en laboratoire. Dans le cas de co-infection par la dengue, le chikunguya et le Zika, ils pourraient se propager dans le même corps de moustique de manière additive, synergique ou antagoniste (Chaves et al. 2018), la préférence d'un moustique résistant permettant de mieux expliquer la dynamique des épidémies. La transmission verticale est également importante au cours de propagation de virus (Dzul-Manzanilla et al. 2016). La pulvérisation spatiale est largement recommandée dans les situations d'urgence, c'est possible que les femelles soient exposées sous un traitement d'insecticide avant de prendre le repas infectieux, les interactions entre la résistance inductive provoquée par l'exposition d'insecticide et la transmission du CHIKV chez les moustiques *Aedes aegypti* sont intéressantes à étudier (Alout et al. 2014). Récemment, le modèle « moustique - souris - moustiques » a été établi (Kuo et al. 2018) : le virus peut être transmis par des moustiques infectés à des souris naïves, lorsque les autres femelles piquent cette souris, le virus peut retourner au corps des autres moustiques, grâce à ce modèle, il est possible d'étudier le cycle complet de transmission

des arbovirus par les moustiques, pour trouver les cibles des médicaments anti-viraux ou des vaccins chez les mammifères.

### 3) Construire des populations par la modification génétique

Grâce à la technique de modification génétique, par exemple le système CRISPR-Cas9 a été utilisé pour générer des mutations spécifiques chez *Aedes aegypti* (Kistler, Vosshall, and Matthews 2015), et le système binaire Gal4 / UAS a été utilisé pour étudier la régulation de l'expression d'une enzyme spécifique chez *Aedes aegypti* (Zhao et al. 2014). Ainsi avec le développement des techniques génétiques, il est possible de construire les populations abritant un mécanisme ciblé ou un gène spécifique, ou construire une lignée vraiment sensible à la base de la souche guyanaise pour remplacer la Nouvelle-Orléans comme la référence sensible.

En plus de la résistance aux insecticides, il est également possible de créer des moustiques résistants aux autres stress environnementaux, tels que la sécheresse, l'eau salée, la température extrême etc.

En conclusion, pendant cette thèse, il a été démontré que la capacité vectorielle des moustiques pour la transmission de CHIKV peut être influencée par l'existence d'une résistance à la deltaméthrine.

Elle revêt 3 aspects principaux, premièrement des différences significatives ont été observées entre les lignées isofemelles en ce qui concerne la proportion cumulative de moustiques infectés par le virus du chikungunya disséminés de l'intestin moyen à la tête au fil du temps. Ensuite, les niveaux d'expression de certains gènes (CYP 6BB2, CYP 6N12, GST2, Trypsine) associés directement ou indirectement à la résistance à la deltaméthrine ont été mesurés par qRT-PCR, avec la résistance *kdr*, nous proposons que différents mécanismes de résistance puissent influencer non seulement la barrière de l'intestin moyen, mais aussi la multiplication du virus, et sa propagation dans le corps du moustique. Enfin, le coût de résistance de ces lignées isofemelles se manifeste plus clairement en termes de reproduction de la population que de développement immature.

Dans l'ensemble, bien que ce travail de recherche nécessite d'autres expériences, notamment de validation fonctionnelle, les données obtenues fournissent une meilleure compréhension des interactions entre la résistance aux insecticides et la capacité vectorielle chez les moustiques dans les conditions de laboratoire, et permettent d'avoir plus d'indices pour améliorer la réponse de la lutte anti-vectorielle et tenter de réduire l'utilisation souvent abusive d'insecticides.

## 7. LISTE DE PUBLICATIONS

---

- 1) **Revue (soumission pour le journal: Pathogens and Global Health) : Cost of insecticide resistance for mosquito life-history traits and vector capacity? Lanjiao WANG, Yanouk Epelboin, Isabelle Dusfour**
  
- 2) **Publication 1 (soumission pour le journal Science Reports) : Chikungunya virus dissemination is associated with deltamethrin resistance in Aedes aegypti laboratory lines. Lanjiao Wang, Albin Fontaine, Pascal Gaborit, Amandine Guidez, Romain Girod, Mirdad Kazanji, Dominique Rousset, Marco Vignuzzi, Yanouk Epelboin, Isabelle Dusfour**
  
- 3) **Publication 2 (en cours de soumission) : Multiple-resistance and cross-resistance in deltamethrin-selected Aedes aegypti Isofemale lines. Epelboin Y, Wang L, Gaborit P, Issaly J, Guidez A, Dusfour I**
  
- 4) **Publication 3 (publiée) : “Successes and Failures of Sixty Years of Vector Control in French Guiana: What Is the next Step?” Epelboin, Yanouk, Sarah C Chaney, Amandine Guidez, Nausicaa Habchi-Hanriot, Stanislas Talaga, Lanjiao Wang, and Isabelle Dusfour.**

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

### A

**Abdelnabi Rana, Johan Neyts, and Leen Delang.** 2016. “Antiviral Strategies Against Chikungunya Virus.” In *Chikungunya Virus*, 243–53. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2_22).

**Achee, Nicole L., Fred Gould, T. Alex Perkins, Robert C. Reiner, Amy C. Morrison, Scott A. Ritchie, Duane J. Gubler, Remy Teysou, and Thomas W. Scott.** 2015. “A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>.

**Achee, Nicole L., Michael R. Sardelis, Isabelle Dufour, Kamlesh R. Chauhan, and John P. Grieco.** 2009. “Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 25 (2): 156–67. <https://doi.org/10.2987/08-5831.1>.

**Alto, Barry W., Keenan Wiggins, Bradley Eastmond, Sara Ortiz, Kylie Zirbel, and L. Philip Lounibos.** 2018. “Diurnal Temperature Range and Chikungunya Virus Infection in Invasive Mosquito Vectors.” *Journal of Medical Entomology* 55 (1): 217–24. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx182>.

**Alout, Haoues, Innocent Djègbè, Fabrice Chandre, Luc Salako Djogbénou, Roch Kounbobr Dabiré, Vincent Corbel, and Anna Cohuet.** 2014. “Insecticide Exposure Impacts Vector–Parasite Interactions in Insecticide-Resistant Malaria Vectors.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281 (1786). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0389>.

**Alout, Haoues, Roch K. Dabiré, Luc S. Djogbénou, Luc Abate, Vincent Corbel, Fabrice Chandre, and Anna Cohuet.** 2016. “Interactive Cost of Plasmodium Infection and Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles Gambiae*.” *Scientific Reports* 6 (July). <https://doi.org/10.1038/srep29755>.

**Alout, Haoues, Bienvenue Yameogo, Luc Salako Djogbénu, Fabrice Chandre, Roch Kounbobr Dabiré, Vincent Corbel, and Anna Cohuet.** 2014. “Interplay Between Plasmodium Infection and Resistance to Insecticides in Vector Mosquitoes.” *The Journal of Infectious Diseases* 210 (9): 1464–70. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu276>.

**Alout, Haoues, Arnaud Berthomieu, Andreas Hadjivassilis, and Mylène Weill.** 2007. “A New Amino-Acid Substitution in Acetylcholinesterase 1 Confers Insecticide Resistance to Culex Pipiens Mosquitoes from Cyprus.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.001>.

**An, Wenxi, Ningning Ge, Yilin Cao, Jin Sun, and Xia Jin.** 2017. “Recent Progress on Chikungunya Virus Research.” *Virologica Sinica* 32 (6): 441–53. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4072-x>.

**Ariani, Cristina V., Punita Juneja, Sophia Smith, Matthew C. Tinsley, and Francis M. Jiggins.** 2015. “Vector Competence of Aedes Aegypti Mosquitoes for Filarial Nematodes Is Affected by Age and Nutrient Limitation.” *Experimental Gerontology* 61 (January): 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.11.001>.

## **B**

**Balabanidou, Vasileia, Anastasia Kampouraki, Marina MacLean, Gary J. Blomquist, Claus Tittiger, M. Patricia Juárez, Sergio J. Mijailovsky, et al.** 2016. “Cytochrome P450 Associated with Insecticide Resistance Catalyzes Cuticular Hydrocarbon Production in Anopheles Gambiae.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (33): 9268–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>.

**Bara, Jeffrey, Zoi Rapti, Carla E. Cáceres, and Ephantus J. Muturi.** 2015. “Effect of Larval Competition on Extrinsic Incubation Period and Vectorial Capacity of Aedes Albopictus for Dengue Virus.” *PLoS ONE* 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126703>.

**Bariami, Vassiliki, Christopher M. Jones, Rodolphe Poupardin, John Vontas, and Hilary Ranson.** 2012. “Gene Amplification, ABC Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, Aedes Aegypti.” *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6 (6): e1692. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001692>.

**Barrera, Roberto, Veronica Acevedo, Gilberto E. Felix, Ryan R. Hemme, Jesus Vazquez, Jorge L. Munoz, and Manuel Amador.** 2017. “Impact of Autocidal Gravid Ovitrap on Chikungunya Virus Incidence in *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) in Areas With and Without Traps.” *Journal of Medical Entomology* 54 (2): 387–95. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw187>.

**Berntsen, Brenda T., Anthony A. James, and Bruce M. Christensen.** 2000. “Genetics of Mosquito Vector Competence.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (1): 115–37.

**Bernáth, Balázs, Gábor Horváth, József Gál, Gábor Fekete, and Victor Benno Meyer-Rochow.** 2008. “Polarized Light and Oviposition Site Selection in the Yellow Fever Mosquito: No Evidence for Positive Polarotaxis in *Aedes Aegypti*.” *Vision Research* 48 (13): 1449–55. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.04.007>.

**Black, William C., Kristine E. Bennett, Norma Gorrochótegui-Escalante, Carolina V. Barillas-Mury, Ildelfonso Fernández-Salas, María de Lourdes Muñoz, José A. Farfán-Alé, Ken E. Olson, and Barry J. Beaty.** 2002. “Flavivirus Susceptibility in *Aedes Aegypti*.” *Archives of Medical Research* 33 (4): 379–88. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00373-9](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00373-9).

**Bonizzoni, Mariangela, Yaw Afrane, William Augustine Dunn, Francis K. Atieli, Goufa Zhou, Daibin Zhong, Jun Li, Andrew Githeko, and Guiyun Yan.** 2012. “Comparative Transcriptome Analyses of Deltamethrin-Resistant and -Susceptible *Anopheles Gambiae* Mosquitoes from Kenya by RNA-Seq.” *PloS One* 7 (9): e44607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044607>.

**Boonyuan, Wasana, Sunaiyana Sathantriphop, Krajana Tainchum, Vithee Muenworn, Atchariya Prabaripai, Michael J. Bangs, and Theeraphap Chareonviriyaphap.** 2017. “Insecticidal and Behavioral Avoidance Responses of *Anopheles Minimus* and *Culex Quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to Three Synthetic Repellents.” *Journal of Medical Entomology* 54 (5): 1312–22. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx081>.

**Borgherini, Gianandrea, Patrice Poubeau, Frederik Staikowsky, Manuella Lory, Nathalie Le Moullec, Jean Philippe Becquart, Catherine Wengling, Alain Michault, and Fabrice Paganin.** 2007. “Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients.” *Clinical Infectious Diseases* 44 (11): 1401–7. <https://doi.org/10.1086/517537>.

**Boyce, R., A. Lenhart, A. Kroeger, R. Velayudhan, B. Roberts, and O. Horstick.** 2013. “Bacillus Thuringiensis Israelensis (Bti) for the Control of Dengue Vectors: Systematic Literature Review.” *Tropical Medicine & International Health* 18 (5): 564–77. <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>.

**Boyer, Sébastien, Elodie Calvez, Thais Chouin-Carneiro, Diawo Diallo, and Anna-Bella Failloux.** 2018. “An Overview of Mosquito Vectors of Zika Virus.” *Microbes and Infection*, March. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>.

**Brackney, Doug E., Brian D. Foy, and Ken E. Olson.** 2008. “The Effects of Midgut Serine Proteases on Dengue Virus Type 2 Infectivity of *Aedes Aegypti*.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (2): 267–74.

**Brito, Luiz Paulo, Jutta G. B. Linss, Tamara N. Lima-Camara, Thiago A. Belinato, Alexandre A. Peixoto, José Bento P. Lima, Denise Valle, and Ademir J. Martins.** 2013. “Assessing the Effects of *Aedes Aegypti* Kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost.” *PLoS ONE* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060878>.

**Brown, Julia E., Benjamin R. Evans, Wei Zheng, Vanessa Obas, Laura Barrera-Martinez, Andrea Egizi, Hongyu Zhao, Adalgisa Caccone, and Jeffrey R. Powell.** 2014. “Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes Aegypti*, the Dengue and Yellow Fever Mosquito.” *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 68 (2): 514–25. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>.

**Buckingham, Steven D., Makoto Ihara, and David B. Sattelle and Kazuhiko Matsuda\*.** 2017. “Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors.” *Current Medicinal Chemistry*. July 31, 2017. <http://www.eurekaselect.com/153125/article>.

## C

**Cao-Lormeau, VM, A Blake, S Mons, S Lastere, C Roche, J Vanhomwegen, T Dub, et al.** 2016. “Guillain-Barré Syndrome Outbreak Caused by ZIKA Virus Infection in French Polynesia.” *Lancet (London, England)* 387 (10027): 1531–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6).

**Carey, D. E.** 1971. “Chikungunya and Dengue: A Case of Mistaken Identity?” *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 26 (3): 243–62.

**Carvalho, F. D., and L. A. Moreira.** 2017. “Why Is *Aedes Aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?” *Neotropical Entomology*, April, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0520-4>.

**Casida, John E., and Kathleen A. Durkin.** 2013. “Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects.” *Annual Review of Entomology* 58: 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>.

**Cauchemez, S., M. Ledrans, C. Poletto, P. Quenel, H. de Valk, V. Colizza, and P. Y. Boëlle.** 2014. “Local and Regional Spread of Chikungunya Fever in the Americas.” *Eurosurveillance* 19 (28): 20854. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.28.20854>.

**Cauchemez, Simon, Marianne Besnard, Priscillia Bompard, Timothée Dub, Prisca Guillemette-Artur, Dominique Eyrolle-Guignot, Henrik Salje, et al.** 2016. “Association between Zika Virus and Microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: A Retrospective Study.” *Lancet (London, England)* 387 (10033): 2125–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6).

**Chandor-Proust, Alexia, Jaclyn Bibby, Myriam Régent-Kloeckner, Jessica Roux, Emilie Guittard-Crilat, Rodolphe Poupardin, Muhammad Asam Riaz, et al.** 2013. “The Central Role of Mosquito Cytochrome P450 CYP6Zs in Insecticide Detoxification Revealed by Functional Expression and Structural Modelling.” *Biochemical Journal* 455 (Pt 1): 75–85. <https://doi.org/10.1042/BJ20130577>.

**Chandra, G., I. Bhattacharjee, S. N. Chatterjee, and A. Ghosh.** 2008. “Mosquito Control by Larvivorous Fish.” *The Indian Journal of Medical Research* 127 (1): 13–27.

**Chareonviriyaphap, T., D. R. Roberts, R. G. Andre, H. J. Harlan, S. Manguin, and M. J. Bangs.** 1997. “Pesticide Avoidance Behavior in *Anopheles Albimanus*, a Malaria Vector in the Americas.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 13 (2): 171–83.

**Chaves, Barbara Aparecida, Alessandra Silva Orfano, Paula Monalisa Nogueira, Nilton Barnabe Rodrigues, Thais Bonifácio Campolina, Rafael Nacif-Pimenta, Ana Clara Araújo**

**Machado Pires, et al.** 2018. “Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host.” *The Journal of Infectious Diseases* 218 (4): 563–71. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy196>.

**Cheng, Gong, Jonathan Cox, Penghua Wang, Manoj N. Krishnan, Jianfeng Dai, Feng Qian, John F. Anderson, and Erol Fikrig.** 2010. “A C-Type Lectin Collaborates with a CD45 Phosphatase Homologue to Facilitate West Nile Virus Infection of Mosquitoes.” *Cell* 142 (5): 714–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.038>.

**Chernin, E.** 1983. “Sir Patrick Manson’s Studies on the Transmission and Biology of Filariasis.” *Reviews of Infectious Diseases* 5 (1): 148–66.

**Christofferson, Rebecca C., and Christopher N. Mores.** 2016. “Potential for Extrinsic Incubation Temperature to Alter Interplay Between Transmission Potential and Mortality of Dengue-Infected *Aedes Aegypti*.” *Environmental Health Insights* 10 (July): 119–23. <https://doi.org/10.4137/EHI.S38345>.

**Collet, M. L., C. Frizzo, E. Orlandin, L. D. P. Rona, J. C. Nascimento, M. a. E. Montano, G. A. Müller, and G. Wagner.** 2016. “Frequency of the Val1016Ile Mutation on the Kdr Gene in *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) in South Brazil.” *Genetics and Molecular Research: GMR* 15 (4). <https://doi.org/10.4238/gmr15048940>.

**Corbel, Vincent, Nicole L. Achee, Fabrice Chandre, Mamadou B. Coulibaly, Isabelle Dusfour, Dina M. Fonseca, John Grieco, et al.** 2016. “Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide Resistance Network (WIN).” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005054>.

**Corbel, Vincent, Dina M. Fonseca, David Weetman, João Pinto, Nicole L. Achee, Fabrice Chandre, Mamadou B. Coulibaly, et al.** 2017. “International Workshop on Insecticide Resistance in Vectors of Arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil.” *Parasites & Vectors* 10 (June). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2224-3>.

## D

**David, J. R., P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy, and B. Moreteau.** 2004. “Isofemale Lines in *Drosophila*: An Empirical Approach to Quantitative Trait Analysis in Natural

Populations.” *Heredity* 94 (1): 3–12. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800562>.

**David, Jean-Philippe, Hanafy Mahmoud Ismail, Alexia Chandor-Proust, and Mark John Ingraham Paine.** 2013. “Role of Cytochrome P450s in Insecticide Resistance: Impact on the Control of Mosquito-Borne Diseases and Use of Insecticides on Earth.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1612). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>.

**DeGennaro, Matthew.** 2015. “The Mysterious Multi-Modal Repellency of DEET.” *Fly* 9 (1): 45–51. <https://doi.org/10.1080/19336934.2015.1079360>.

**Diallo, M., J. Thonnon, M. Traore-Lamizana, and D. Fontenille.** 1999. “Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60 (2): 281–86.

**Dias, Clarice Noleto, and Denise Fernandes Coutinho Moraes.** 2014. “Essential Oils and Their Compounds as *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Larvicides: Review.” *Parasitology Research* 113 (2): 565–92. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>.

**Diniz, Diego Felipe Araujo, Maria Alice Varjal de Melo-Santos, Eloína Maria de Mendonça Santos, Eduardo Barbosa Beserra, Elisama Helvecio, Danilo de Carvalho-Leandro, Bianka Santana dos Santos, Vera Lúcia de Menezes Lima, and Constância Flávia Junqueira Ayres.** 2015. “Fitness Cost in Field and Laboratory *Aedes Aegypti* Populations Associated with Resistance to the Insecticide Temephos.” *Parasites & Vectors* 8 (December). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1276-5>.

**Diop, Malal M., Nicolas Moiroux, Fabrice Chandre, Hadrien Martin-Herrou, Pascal Milesi, Olayidé Boussari, Angélique Porciani, Stéphane Duchon, Pierrick Labbé, and Cédric Pennetier.** 2015. “Behavioral Cost & Overdominance in *Anopheles Gambiae*.” *PLoS One* 10 (4): e0121755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121755>.

**Djegbe, Innocent, Sylvie Cornelie, Marie Rossignol, Edith Demette, Martial Seveno, Franck Remoue, and Vincent Corbel.** 2011. “Differential Expression of Salivary Proteins between Susceptible and Insecticide-Resistant Mosquitoes of *Culex Quinquifasciatus*.” *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017496>.

**Djouaka, Rousseau J., Seun M. Atoyebi, Genevieve M. Tchigossou, Jacob M. Riveron, Helen Irving, Romaric Akoton, Michael O. Kusimo, Adekunle A. Bakare, and Charles S. Wondji.** 2016. “Evidence of a Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles Funestus* in South West Nigeria.” *Malaria Journal* 15 (November). <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1615-9>.

**Dong, Ke, Yuzhe Du, Frank Rinkevich, Yoshiko Nomura, Peng Xu, Lingxin Wang, Kristopher Silver, and Boris S. Zhorov.** 2014. “Molecular Biology of Insect Sodium Channels and Pyrethroid Resistance.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50 (July): 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>.

**Du, Yuzhe, Yoshiko Nomura, Boris S. Zhorov, and Ke Dong.** 2016. “Sodium Channel Mutations and Pyrethroid Resistance in *Aedes Aegypti*.” *Insects* 7 (4). <https://doi.org/10.3390/insects7040060>.

**Dusfour, Isabelle, Pilar Zorrilla, Amandine Guidez, Jean Issaly, Romain Girod, Laurent Guillaumot, Carlos Robello, and Clare Strode.** 2015. “Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes Aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004226>.

**Dzul-Manzanilla, Felipe, Norma E. Martínez, Maximina Cruz-Nolasco, Cipriano Gutiérrez-Castro, Leonardo López-Damián, Jesús Ibarra-López, Andres Martini-Jaimes, et al.** 2016. “Evidence of Vertical Transmission and Co-Circulation of Chikungunya and Dengue Viruses in Field Populations of *Aedes Aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico.” *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (2): 141–44. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv106>.  
“Estimation of Allele-Specific Ace-1 Duplication in Insecticide-Resistant *Anopheles* Mosquitoes from West Africa.” n.d. Accessed November 16, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4683970/>.

## **E**

**Epelboin, L., M. Douine, G. Carles, N. Villemant, M. Nacher, D. Rousset, F. Djossou, and E. Mosnier.** 2016. “Épidémie de virus Zika en Amérique latine : quels enjeux pour la Guyane française en avril 2016 ?” *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 109 (2): 114–25. <https://doi.org/10.1007/s13149-016-0490-5>.

**Epelboin, Yanouk, Sarah C Chaney, Amandine Guidez, Nausicaa Habchi-Hanriot, Stanislas Talaga, Lanjiao Wang, and Isabelle Dusfour.** 2018. “Successes and Failures of Sixty Years of Vector Control in French Guiana: What Is the next Step?” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (5). <https://doi.org/10.1590/0074-02760170398>.

**Epelboin Y, Wang L, Gaborit P, Issaly J, Guidez A, Dusfour I,** Multiple-resistance and cross-resistance in deltamethrin-selected *Aedes aegypti* Isofemale lines. (soumission)

## **F**

**Fang, Fujin, Weijie Wang, Donghui Zhang, Yuan Lv, Dan Zhou, Lei Ma, Bo Shen, Yan Sun, and Changliang Zhu.** 2015. “The Cuticle Proteins: A Putative Role for Deltamethrin Resistance in *Culex pipiens pallens*.” *Parasitology Research* 114 (12): 4421–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4683-9>.

**Faucon, Frederic, Thierry Gaude, Isabelle Dusfour, Vincent Navratil, Vincent Corbel, Waraporn Juntarajumnong, Romain Girod, et al.** 2017. “In the Hunt for Genomic Markers of Metabolic Resistance to Pyrethroids in the Mosquito *Aedes Aegypti*: An Integrated next-Generation Sequencing Approach.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (4): e0005526. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005526>.

**Félix, Rute C, Pie Müller, Vera Ribeiro, Hilary Ranson, and Henrique Silveira.** 2010. “Plasmodium Infection Alters *Anopheles Gambiae* Detoxification Gene Expression.” *BMC Genomics* 11 (May): 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-312>.

**Ferreira-de-Brito, Anielly, Ieda P Ribeiro, Rafaella Moraes de Miranda, Rosilainy Surubi Fernandes, Stéphanie Silva Campos, Keli Antunes Barbosa da Silva, Marcia Gonçalves de Castro, Myrna C Bonaldo, Patrícia Brasil, and Ricardo Lourenço-de-Oliveira.** 2016. “First Detection of Natural Infection of *Aedes Aegypti* with Zika Virus in Brazil and throughout South America.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (10): 655–58. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160332>.

**Fischer, Carlo, Maria C. Torres, Pranav Patel, Andres Moreira-Soto, Ernest A. Gould, Rémi N. Charrel, Xavier de Lamballerie, et al.** 2017. “Lineage-Specific Real-Time RT-PCR for

Yellow Fever Virus Outbreak Surveillance, Brazil.” *Emerging Infectious Diseases* 23 (11). <https://doi.org/10.3201/eid2311.171131>.

**Franz, Alexander W.E., Asher M. Kantor, A. Lorena Passarelli, and Rollie J. Clem.** 2015. “Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes.” *Viruses* 7 (7): 3741–67. <https://doi.org/10.3390/v7072795>.

## G

**Gatton, Michelle L, Nakul Chitnis, Thomas Churcher, Martin J Donnelly, Azra C Ghani, H Charles J Godfray, Fred Gould, et al.** 2013. “THE IMPORTANCE OF MOSQUITO BEHAVIOURAL ADAPTATIONS TO MALARIA CONTROL IN AFRICA.” *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 67 (4): 1218–30. <https://doi.org/10.1111/evo.12063>.

**Ghosh, Anupam, Nandita Chowdhury, and Goutam Chandra.** 2012. “Plant Extracts as Potential Mosquito Larvicides.” *The Indian Journal of Medical Research* 135 (5): 581–98.

**Gjullin, C. M., and R. F. Peters.** 1952. “Recent Studies of Mosquito Resistance to Insecticides in California.” *Mosquito News* 12 (1): 1–7.

**Goindin, Daniella, Christelle Delannay, Andric Gelasse, Cédric Ramdini, Thierry Gaude, Frédéric Faucon, Jean-Philippe David, Joël Gustave, Anubis Vega-Rua, and Florence Fouque.** 2017. “Levels of Insecticide Resistance to Deltamethrin, Malathion, and Temephos, and Associated Mechanisms in *Aedes Aegypti* Mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin Islands (French West Indies).” *Infectious Diseases of Poverty* 6 (February). <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0254-x>.

**Grieco, John P., Nicole L. Achee, Theeraphap Chareonviriyaphap, Wannapa Suwonkerd, Kamal Chauhan, Michael R. Sardelis, and Donald R. Roberts.** 2007. “A New Classification System for the Actions of IRS Chemicals Traditionally Used For Malaria Control.” *PLoS ONE* 2 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000716>.

**Guéguen, Y., K. Mouzat, L. Ferrari, E. Tissandie, J. M. A. Lobaccaro, A.-M. Batt, F. Paquet, et al.** 2006. “Les Cytochromes P450 : Métabolisme Des Xénobiotiques, Régulation et Rôle En Clinique.” *Annales de Biologie Clinique* 64 (6): 535–48. <https://doi.org/10.1684/abc.2006.0015>.

## H

**Hammon, W. McD, A. Rundnick, and G. E. Sather.** 1960. “Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand.” *Science* 131 (3407): 1102–3. <https://doi.org/10.1126/science.131.3407.1102>.

**Harrington, Laura C., Andrew Fleisher, Diego Ruiz-Moreno, Françoise Vermeulen, Chrystal V. Wa, Rebecca L. Poulson, John D. Edman, et al.** 2014. “Heterogeneous Feeding Patterns of the Dengue Vector, *Aedes Aegypti*, on Individual Human Hosts in Rural Thailand.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003048>.

**Harris, Angela F., Andrew R. McKemey, Derric Nimmo, Zoe Curtis, Isaac Black, Siân A. Morgan, Marco Neira Oviedo, et al.** 2012. “Successful Suppression of a Field Mosquito Population by Sustained Release of Engineered Male Mosquitoes.” *Nature Biotechnology* 30 (9): 828–30. <https://doi.org/10.1038/nbt.2350>.

**Hemingway, Janet, Nicola J Hawkes, Lynn McCarroll, and Hilary Ranson.** 2004. “The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Molecular and population biology of mosquitoes, 34 (7): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>.

**Hemingway, and Karunaratne.** 1998. “Mosquito Carboxylesterases: A Review of the Molecular Biology and Biochemistry of a Major Insecticide Resistance Mechanism.” *Medical and Veterinary Entomology* 12 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00082.x>.

**Hoffmann, Ary A., Inaki Iturbe-Ormaetxe, Ashley G. Callahan, Ben L. Phillips, Katrina Billington, Jason K. Axford, Brian Montgomery, Andrew P. Turley, and Scott L. O’Neill.** 2014. “Stability of the wMel *Wolbachia* Infection Following Invasion into *Aedes Aegypti* Populations.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003115>.

**Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, and S. VandePol.** 1982. “Rapid Evolution of RNA Genomes.” *Science (New York, N.Y.)* 215 (4540): 1577–85.

**Hosgood, Sally M. W., and P. A. Parsons.** 1971. “Genetic Heterogeneity among the Founders of Laboratory Populations of *Drosophila* IV. Scutellar Chaetae in Different Environments.” *Genetica*

42 (1): 42–52. <https://doi.org/10.1007/BF00154838>.

## I

**Isoe, Jun, Alberto A. Rascón, Susan Kunz, and Roger L. Miesfeld.** 2009. “Molecular Genetic Analysis of Midgut Serine Proteases in *Aedes Aegypti* Mosquitoes.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (12): 903. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.008>.

## J

**Jain, Jaspreet, Raja Babu S. Kushwah, Shashi S. Singh, Anil Sharma, Tridibes Adak, Om P. Singh, Raj Kamal Bhatnagar, Sarala K. Subbarao, and Sujatha Sunil.** 2016. “Evidence for Natural Vertical Transmission of Chikungunya Viruses in Field Populations of *Aedes Aegypti* in Delhi and Haryana States in India—a Preliminary Report.” *Acta Tropica* 162 (October): 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.004>.

**Jirakanjanakit, Nuananong, Somjai Leemingsawat, and Jean Pierre Dujardin.** 2008. “The Geometry of the Wing of *Aedes (Stegomyia) Aegypti* in Isofemale Lines through Successive Generations.” *Infection, Genetics and Evolution*, MEEGID VIII 2006, 8 (4): 414–21. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.05.004>.

**Jirakanjanakit, Nuananong, Pornpimol Rongnoparut, Seeviga Saengtharatip, Theeraphap Chareonviriyaphap, Stephane Duchon, Christian Bellec, and Sutee Yoksan.** 2007. “Insecticide Susceptible/Resistance Status in *Aedes (Stegomyia) Aegypti* and *Aedes (Stegomyia) Albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005.” *Journal of Economic Entomology* 100 (2): 545–50.

**Johansson, Michael A., Ann M. Powers, Nicki Pesik, Nicole J. Cohen, and J. Erin Staples.** 2014. “Nowcasting the Spread of Chikungunya Virus in the Americas.” *PLOS ONE* 9 (8): e104915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104915>.

**Jones, Christopher M., Khamis A. Haji, Bakari O. Khatib, Judit Bagi, Juma Mcha, Gregor J. Devine, Matthew Daley, et al.** 2013. “The Dynamics of Pyrethroid Resistance in *Anopheles Arabiensis* from Zanzibar and an Assessment of the Underlying Genetic Basis.” *Parasites & Vectors* 6 (December): 343. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-343>.

**Jose, Joyce, Jonathan E Snyder, and Richard J Kuhn.** 2009. “A Structural and Functional Perspective of Alphavirus Replication and Assembly.” *Future Microbiology* 4 (September): 837–56. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.59>.

## **K**

**Kant, Rajni, S. Haq, H. C. Srivastava, and V. P. Sharma.** 2013. “Review of the Bioenvironmental Methods for Malaria Control with Special Reference to the Use of Larvivorous Fishes and Composite Fish Culture in Central Gujarat, India.” *Journal of Vector Borne Diseases* 50 (1): 1–12.

**Kean, Joy, Stephanie M. Rainey, Melanie McFarlane, Claire L. Donald, Esther Schnettler, Alain Kohl, and Emilie Pondeville.** 2015. “Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in Aedes Mosquitoes.” *Insects* 6 (1): 236–78. <https://doi.org/10.3390/insects6010236>.

**Kielian, M., P. K. Chatterjee, D. L. Gibbons, and Y. E. Lu.** 2000. “Specific Roles for Lipids in Virus Fusion and Exit. Examples from the Alphaviruses.” *Sub-Cellular Biochemistry* 34: 409–55.

Kioulos, Ilias, Anastasia Kampouraki, Evangelia Morou, George Skavdis, and John Vontas. 2014. “Insecticide Resistance Status in the Major West Nile Virus Vector Culex Pipiens from Greece.” *Pest Management Science* 70 (4): 623–27. <https://doi.org/10.1002/ps.3595>.

**Kliot, Adi, and Murad Ghanim.** 2012. “Fitness Costs Associated with Insecticide Resistance.” *Pest Management Science* 68 (11): 1431–37. <https://doi.org/10.1002/ps.3395>.

**Kraemer, Moritz UG, Marianne E. Sinka, Kirsten A. Duda, Adrian QN Mylne, Freya M. Shearer, Christopher M. Barker, Chester G. Moore, et al.** 2015. “The Global Distribution of the Arbovirus Vectors Aedes Aegypti and Ae. Albopictus.” *eLife* 4 (June): e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.

**Kistler, Kathryn E, Leslie B Vosshall, and Benjamin J Matthews.** 2015. “Genome-Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito Aedes Aegypti.” *Cell Reports* 11 (1): 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.009>.

**Kuo, Yi-Ping, Kuen-Nan Tsai, Yin-Chiu Luo, Pei-Jung Chung, Yu-Wen Su, Yu Teng, Ming-Sian Wu, et al.** 2018. “Establishment of a Mouse Model for the Complete Mosquito-Mediated

Transmission Cycle of Zika Virus.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006417>.

## L

**Labbé, Pierrick, Claire Berticat, Arnaud Berthomieu, Sandra Unal, Clothilde Bernard, Mylène Weill, and Thomas Lenormand.** 2007. “Forty Years of Erratic Insecticide Resistance Evolution in the Mosquito *Culex Pipiens*.” *PLoS Genetics* 3 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030205>.

**Lanciotti, Robert S., and Anne Marie Valadere.** 2014. “Transcontinental Movement of Asian Genotype Chikungunya Virus.” *Emerging Infectious Diseases* 20 (8): 1400–1402. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140268>.

**Leparc-Goffart, Isabelle, Antoine Nougairede, Sylvie Cassadou, Christine Prat, and Xavier de Lamballerie.** 2014. “Chikungunya in the Americas.” *The Lancet* 383 (9916): 514. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60185-9).

**Li, Chun-Xiao, Phillip E. Kaufman, Rui-De Xue, Ming-Hui Zhao, Gang Wang, Ting Yan, Xiao-Xia Guo, et al.** 2015. “Relationship between Insecticide Resistance and Kdr Mutations in the Dengue Vector *Aedes Aegypti* in Southern China.” *Parasites & Vectors* 8 (June): 325. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0933-z>.

**Liebman, Kelly A, Jesus Pinto, Jorge Valle, Miriam Palomino, Lucrecia Vizcaino, William Brogdon, and Audrey Lenhart.** 2015. “Novel Mutations on the Ace-1 Gene of the Malaria Vector *Anopheles Albimanus* Provide Evidence for Balancing Selection in an Area of High Insecticide Resistance in Peru.” *Malaria Journal* 14 (February). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0599-1>.

**Liu, Yang, Jianying Liu, Senyan Du, Chao Shan, Kaixiao Nie, Rudian Zhang, Xiao-Feng Li, et al.** 2017. “Evolutionary Enhancement of Zika Virus Infectivity in *Aedes Aegypti* Mosquitoes.” *Nature* 545 (7655): 482–86. <https://doi.org/10.1038/nature22365>.

**Lockwood, Jeffrey A., Thomas C. Sparks, and Richard N. Story.** 1984. “Evolution of Insect Resistance to Insecticides: A Reevaluation of the Roles of Physiology and Behavior.” *Bulletin of the Entomological Society of America* 30 (4): 41–51. <https://doi.org/10.1093/besa/30.4.41>.

**Londono-Renteria, Berlin L., Heman Shakeri, Paula Rozo-Lopez, Michael J. Conway, Natasha Duggan, Majid Jaber-Douraki, and Tonya M. Colpitts.** 2018. “Serosurvey of Human Antibodies Recognizing Aedes Aegypti D7 Salivary Proteins in Colombia.” *Frontiers in Public Health* 6 (May). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00111>.

**Low, V. L., W. Y. Vinnie-Siow, A. L. Lim Y, T. K. Tan, C. S. Leong, C. D. Chen, A. A. Azidah, and M. Sofian-Azirun.** 2015. “First Molecular Genotyping of A302S Mutation in the Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Receptor in Aedes Albopictus from Malaysia.” *Tropical Biomedicine* 32 (3): 554–56.

## M

**Maharaj, Payal D., Steven G. Widen, Jing Huang, Thomas G. Wood, and Saravanan Thangamani.** 2015. “Discovery of Mosquito Saliva MicroRNAs during CHIKV Infection.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003386>.

**Marinotti, Osvaldo, Gustavo C. Cerqueira, Luiz Gonzaga Paula de Almeida, Maria Inês Tiraboschi Ferro, Elgion Lucio da Silva Loreto, Arnaldo Zaha, Santuza M. R. Teixeira, et al.** 2013. “The Genome of Anopheles Darlingi, the Main Neotropical Malaria Vector.” *Nucleic Acids Research* 41 (15): 7387–7400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt484>.

**Mattingly, P. F.** 1967. “Taxonomy of Aedes Aegypti and Related Species.” *Bulletin of the World Health Organization* 36 (4): 552–54.

**Mbaika, Sophiah, Joel Lutomia, Edith Chepkorir, Francis Mulwa, Christopher Khayeka-Wandabwa, Caroline Tigoi, Elijah Oyoo-Okoth, James Mutisya, Zipporah Ng’ang’a, and Rosemary Sang.** 2016. “Vector Competence of Aedes Aegypti in Transmitting Chikungunya Virus: Effects and Implications of Extrinsic Incubation Temperature on Dissemination and Infection Rates.” *Virology Journal* 13: 114. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0566-7>.

**McFarlane, Melanie, Camilo Arias-Goeta, Estelle Martin, Zoe O’Hara, Aleksei Lulla, Laurence Mousson, Stephanie M. Rainey, et al.** 2014. “Characterization of Aedes Aegypti Innate-Immune Pathways That Limit Chikungunya Virus Replication.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002994>.

**Miller, Barry R., and Carl J. Mitchell.** 1991. “Genetic Selection of a Flavivirus-Refractory Strain of the Yellow Fever Mosquito *Aedes Aegypti*.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45 (4): 399–407. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.399>.

**Miyazaki, M., K. Ohyama, D. Y. Dunlap, and F. Matsumura.** 1996. “Cloning and Sequencing of the Para-Type Sodium Channel Gene from Susceptible and Kdr-Resistant German Cockroaches (*Blattella Germanica*) and House Fly (*Musca Domestica*).” *Molecular & General Genetics: MGG* 252 (1–2): 61–68.

**Miyo, T., H. Takamori, Y. Kono, and Y. Oguma.** 2001. “Genetic Variation and Correlations among Responses to Five Insecticides within Natural Populations of *Drosophila Melanogaster* (Diptera: Drosophilidae).” *Journal of Economic Entomology* 94 (1): 223–32.

**Miyo, Takahiro, Sumio Akai, and Yuzuru Oguma.** 2000. “Seasonal Fluctuation in Susceptibility to Insecticides within Natural Populations of *Drosophila Melanogaster*: Empirical Observations of Fitness Costs of Insecticide Resistance.” *Genes & Genetic Systems* 75 (2): 97–104. <https://doi.org/10.1266/ggs.75.97>.

**Miyo, Takahiro, and Yuzuru Oguma.** 2002. “Negative Correlations between Resistance to Three Organophosphate Insecticides and Productivity within a Natural Population of *Drosophila Melanogaster* (Diptera: Drosophilidae).” *Journal of Economic Entomology* 95 (6): 1229–38.

**Mocellin, Márcio Goulart, Taynãna César Simões, Teresa Fernandes Silva do Nascimento, Maria Lucia França Teixeira, Leon Philip Lounibos, and Ricardo Lourenço de Oliveira.** 2009. “Bromeliad-Inhabiting Mosquitoes in an Urban Botanical Garden of Dengue Endemic Rio de Janeiro. Are Bromeliads Productive Habitats for the Invasive Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*?” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (8): 1171–76.

**Moiroux, Nicolas, Marinely B Gomez, Cédric Pennetier, Emmanuel Elanga, Armel Djènontin, Fabrice Chandre, Innocent Djègbé, Hélène Guis, and Vincent Corbel.** 2012. “Changes in *Anopheles Funestus* Biting Behavior Following Universal Coverage of Long-Lasting Insecticidal Nets in Benin.” *Journal of Infectious Diseases*, September, epub ahead of print. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis565>.

**Molina-Cruz, Alvaro, Lalita Gupta, Jason Richardson, Kristine Bennett, William Black, and Carolina Barillas-Mury.** 2005. “Effect of Mosquito Midgut Trypsin Activity on Dengue-2 Virus Infection and Dissemination in *Aedes Aegypti*.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (5): 631–37.

“Mosquito Life-Cycle | Dengue | CDC.” n.d. Accessed December 16, 2017. [https://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m\\_lifecycle.html](https://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html).

## N

**Ngufor, Corine, Jessica Critchley, Josias Fagbohoun, Raphael N’Guessan, Damien Todjinou, and Mark Rowland.** 2016. “Chlorfenapyr (A Pyrrole Insecticide) Applied Alone or as a Mixture with Alpha-Cypermethrin for Indoor Residual Spraying against Pyrethroid Resistant *Anopheles Gambiae* Sl: An Experimental Hut Study in Cote d’Ivoire, Benin.” *PLoS ONE* 11 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162210>.

**Nouhaud, Pierre, Ray Tobler, Viola Nolte, and Christian Schlötterer.** 2016. “Ancestral Population Reconstitution from Isofemale Lines as a Tool for Experimental Evolution.” *Ecology and Evolution* 6 (20): 7169–75. <https://doi.org/10.1002/ece3.2402>.

## O

“OMS | Dengue et Dengue Sévère.” n.d. WHO. Accessed March 28, 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/>.

## P

**Paiva, Marcelo H. S., Diane D. Lovin, Akio Mori, Maria A. V. Melo-Santos, David W. Severson, and Constância F. J. Ayres.** 2016. “Identification of a Major Quantitative Trait Locus Determining Resistance to the Organophosphate Temephos in the Dengue Vector Mosquito *Aedes Aegypti*.” *Genomics* 107 (1): 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.004>.

**Parsons, P. A., S. M. W. Hosgood, and B. T. O. Lee.** 1967. “Polygenes and Polymorphism.” *Molecular and General Genetics MGG* 99 (2): 165–70. <https://doi.org/10.1007/BF00426160>.

**Paterson, H. E., and B. M. McIntosh.** 1964. “Further studies on the chikungunya outbreak in southern Rhodesia in 1962. Transmission experiments with the *Aedes furcifer-taylori* group of

mosquitoes and with a member of the anopheles gambiae complex.” *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 58 (March): 52–55.

**Paris, Margot.** 2010. “Evolution de la résistance au bactério-insecticide Bti chez les moustiques.” Phdthesis, Université de Grenoble. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00629116/document>.

**Paty, M. C., C. Six, F. Charlet, G. Heuzé, A. Cochet, A. Wiegandt, J. L. Chappert, et al.** 2014. “Large Number of Imported Chikungunya Cases in Mainland France, 2014: A Challenge for Surveillance and Response.” *Eurosurveillance* 19 (28): 20856. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.28.20856>.

**Porciani, Angélique, Malal Diop, Nicolas Moiroux, Tatiana Kadoke-Lambi, Anna Cohuet, Fabrice Chandre, Laurent Dormont, and Cédric Pennetier.** 2017. “Influence of Pyrethroid-Treated Bed Net on Host Seeking Behavior of Anopheles Gambiae S.s. Carrying the Kdr Allele.” *PLoS ONE* 12 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164518>.

**Poupardin, Rodolphe, Wannaporn Srisukontarat, Cristina Yunta, and Hilary Ranson.** 2014. “Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes Aegypti*.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002743>.

**Powell, Jeffrey R, and Walter J Tabachnick.** 2013. “History of Domestication and Spread of *Aedes Aegypti* - A Review.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (Suppl 1): 11–17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>.

**Powers, Ann M., Aaron C. Brault, Robert B. Tesh, and Scott C. Weaver.** 2000. “Re-Emergence of Chikungunya and O’nyong-Nyong Viruses: Evidence for Distinct Geographical Lineages and Distant Evolutionary Relationships.” *Journal of General Virology* 81 (2): 471–79. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>.

**Prapanthadara, L., S. Koottathep, N. Promtet, W. Suwonkerd, A. J. Ketterman, and P. Somboon.** 2000. “Correlation of Glutathione S-Transferase and DDT Dehydrochlorinase Activities with DDT Susceptibility in Anopheles and Culex Mosquitos from Northern Thailand.” *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 31 Suppl 1: 111–18.

## R

**Ramniwas, Seema, and Babita Kajla.** 2012. “Divergent Strategy for Adaptation to Drought Stress in Two Sibling Species of Montium Species Subgroup: *Drosophila Kikkawai* and *Drosophila Leontia*.” *Journal of Insect Physiology* 58 (12): 1525–33. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.08.009>.

**Ranson, Hilary, Charles Claudianos, Federica Ortelli, Christelle Abgrall, Janet Hemingway, Maria V. Sharakhova, Maria F. Unger, Frank H. Collins, and René Feyereisen.** 2002. “Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance.” *Science* 298 (5591): 179–81. <https://doi.org/10.1126/science.1076781>.

**Raymond, M., C. Berticat, M. Weill, N. Pasteur, and C. Chevillon.** 2001. “Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex Pipiens*: What Have We Learned about Adaptation?” *Genetica* 112–113: 287–96.

**Reisen, W. K., J. L. Hardy, and S. B. Presser.** 1997. “Effects of Water Quality on the Vector Competence of *Culex Tarsalis* (Diptera: Culicidae) for Western Equine Encephalomyelitis (Togaviridae) and St. Louis Encephalitis (Flaviviridae) Viruses.” *Journal of Medical Entomology* 34 (6): 631–43.

**Reiter, Paul.** 2007. “Oviposition, Dispersal, and Survival in *Aedes Aegypti*: Implications for the Efficacy of Control Strategies.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7 (2): 261–73. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0630>.

**Rezza, G, L Nicoletti, R Angelini, R Romi, AC Finarelli, M Panning, P Cordioli, et al.** 2007. “Infection with Chikungunya Virus in Italy: An Outbreak in a Temperate Region.” *The Lancet* 370 (9602): 1840–46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6).

**Richard, Vaea, Tuterarii Paoaafaite, and Van-Mai Cao-Lormeau.** 2016. “Vector Competence of French Polynesian *Aedes Aegypti* and *Aedes Polynesiensis* for Zika Virus.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005024>.

**Riveron, Jacob M, Cristina Yunta, Sulaiman S Ibrahim, Rousseau Djouaka, Helen Irving, Benjamin D Menze, Hanafy M Ismail, et al.** 2014. “A Single Mutation in the GSTe2 Gene

Allows Tracking of Metabolically Based Insecticide Resistance in a Major Malaria Vector.” *Genome Biology* 15 (2): R27. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r27>.

**Ross, R. W.** 1956. “The Newala Epidemic.” *The Journal of Hygiene* 54 (2): 177–91.

## S

**Saavedra-Rodriguez, Karla, Clare Strode, Adriana E. Flores, Selene Garcia-Luna, Guadalupe Reyes-Solis, Hilary Ranson, Janet Hemingway, and William C. Black.** 2014. “Differential Transcription Profiles in *Aedes Aegypti* Detoxification Genes Following Temephos Selection.” *Insect Molecular Biology* 23 (2): 199–215. <https://doi.org/10.1111/imb.12073>.

**Sadasivaiah, Shobha, Yesim Tozan, and Joel G. Breman.** 2007. “Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for Indoor Residual Spraying in Africa: How Can It Be Used for Malaria Control?” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (6 Suppl): 249–63.

**Sadia-Kacou, Cécile M. A., Ludovic P. Ahoua Alou, Ako V. C. Edi, Celine M. Yobo, Maurice A. Adja, Allassane F. Ouattara, David Malone, Alphonsine A. Koffi, Yao Tano, and Benjamin G. Koudou.** 2017. “Presence of Susceptible Wild Strains of *Anopheles Gambiae* in a Large Industrial Palm Farm Located in Aboisso, South-Eastern of Côte d’Ivoire.” *Malaria Journal* 16 (April). <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1804-1>.

**Schwameis, Michael, Nina Buchtele, Patricia Pia Wadowski, Christian Schoergenhofer, and Bernd Jilma.** 2015. “Chikungunya Vaccines in Development.” *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 12 (3): 716–31. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1101197>.

**Scott, T. W., P. H. Amerasinghe, A. C. Morrison, L. H. Lorenz, G. G. Clark, D. Strickman, P. Kittayapong, and J. D. Edman.** 2000. “Longitudinal Studies of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood Feeding Frequency.” *Journal of Medical Entomology* 37 (1): 89–101.

**Severson, David W., and Susanta K. Behura.** 2016. “Genome Investigations of Vector Competence in *Aedes Aegypti* to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches.” *Insects* 7 (4): 58. <https://doi.org/10.3390/insects7040058>.

**Simon-Delso, N., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, et al.** 2015. “Systemic Insecticides (Neonicotinoids and Fipronil): Trends, Uses, Mode of Action and Metabolites.” *Environmental Science and Pollution Research International* 22: 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>.

**Smaghe, Guy, and Luc Tirry.** 2001. “Insect Midgut as a Site for Insecticide Detoxification and Resistance.” In *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, 293–321. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59549-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59549-3_14).

**Smith, C. E. G.** 1956. “The History of Dengue in Tropical Asia and Its Probable Relationship to the Mosquito *Aedes Aegypti*.” *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59 (10): 243–51.

**Smith, David L., Katherine E. Battle, Simon I. Hay, Christopher M. Barker, Thomas W. Scott, and F. Ellis McKenzie.** 2012. “Ross, Macdonald, and a Theory for the Dynamics and Control of Mosquito-Transmitted Pathogens.” *PLoS Pathogens* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002588>.

**Stapleford, Kenneth A., Gonzalo Moratorio, Rasmus Henningsson, Rubing Chen, Séverine Matheus, Antoine Enfissi, Daphna Weissglas-Volkov, et al.** 2016. “Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004402>.

**Stevenson, Bradley J., Patricia Pignatelli, Dimitra Nikou, and Mark J. I. Paine.** 2012. “Pinpointing P450s Associated with Pyrethroid Metabolism in the Dengue Vector, *Aedes Aegypti*: Developing New Tools to Combat Insecticide Resistance.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001595>.

**Strode, Clare, Charles S. Wondji, Jean-Philippe David, Nicola J. Hawkes, Nongkran Lumjuan, David R. Nelson, David R. Drane, et al.** 2008. “Genomic Analysis of Detoxification Genes in the Mosquito *Aedes Aegypti*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (1): 113–23. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.007>.

## T

**Tabachnick, Walter J.** 2013. “Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in

Mosquito Arbovirus Transmission Competence.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (1): 249–77. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010249>.

**Tardieux, I., O. Poupel, L. Lapchin, and F. Rodhain.** 1991. “Analysis of Inheritance of Oral Susceptibility of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue-2 Virus Using Isofemale Lines.” *Journal of Medical Entomology* 28 (4): 518–21.

**Taylor-Wells, Jennina, Basil D. Brooke, Isabel Bermudez, and Andrew K. Jones.** 2015. “The Neonicotinoid Imidacloprid, and the Pyrethroid Deltamethrin, Are Antagonists of the Insect Rdl GABA Receptor.” *Journal of Neurochemistry* 135 (4): 705–13. <https://doi.org/10.1111/jnc.13290>.

**Thomas, Matthew B., and Andrew F. Read.** 2016. “The Threat (or Not) of Insecticide Resistance for Malaria Control.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (32): 8900–8902. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609889113>.

**Toé, Kobié H., Sagnon N’Falé, Roch K. Dabiré, Hilary Ranson, and Christopher M. Jones.** 2015. “The Recent Escalation in Strength of Pyrethroid Resistance in *Anopheles Coluzzi* in West Africa Is Linked to Increased Expression of Multiple Gene Families.” *BMC Genomics* 16 (March): 146. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1342-6>.

**Trapido, H.** 1954. “Recent Experiments on Possible Resistance to DDT by *Anopheles Albimanus* in Panama.” *Bulletin of the World Health Organization* 11 (4–5): 885–89.

**Tsetsarkin, Konstantin A., Rubing Chen, Michael B. Sherman, and Scott C. Weaver.** 2011. “Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence.” *Current Opinion in Virology* 1 (4): 310–17. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004>.

## U

**Urdaneta-Marquez, Ludmel, and Anna-Bella Failloux.** 2011. “Population Genetic Structure of *Aedes Aegypti*, the Principal Vector of Dengue Viruses.” *Infection, Genetics and Evolution* 11 (2): 253–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.020>.

## V

**Vega-Rúa, Anubis, Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Laurence Mousson, Marie Vazeille,**

**Sappho Fuchs, André Yébakima, Joel Gustave, et al.** 2015. “Chikungunya Virus Transmission Potential by Local Aedes Mosquitoes in the Americas and Europe.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003780>.

**Vega-Rúa, Anubis, Karima Zouache, Romain Girod, Anna-Bella Failloux, and Ricardo Lourenço-de-Oliveira.** 2014. “High Level of Vector Competence of Aedes Aegypti and Aedes Albopictus from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus.” *Journal of Virology* 88 (11): 6294–6306. <https://doi.org/10.1128/JVI.00370-14>.

**Vogels, Chantal B. F., Jelke J. Fros, Giel P. Göertz, Gorben P. Pijlman, and Constantianus J. M. Koenraadt.** 2016. “Vector Competence of Northern European Culex Pipiens Biotypes and Hybrids for West Nile Virus Is Differentially Affected by Temperature.” *Parasites & Vectors* 9 (July). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1677-0>.

**Volk, Sara M., Rubing Chen, Konstantin A. Tsetsarkin, A. Paige Adams, Tzintzuni I. Garcia, Amadou A. Sall, Farooq Nasar, et al.** 2010. “Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates.” *Journal of Virology* 84 (13): 6497–6504. <https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09>.

## W

**Wang, Weijie, Yuan Lv, Fujin Fang, Shanchao Hong, Qin Guo, Shengli Hu, Feifei Zou, et al.** 2015. “Identification of Proteins Associated with Pyrethroid Resistance by ITRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis in Culex Pipiens Pallens.” *Parasites & Vectors* 8 (February). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0709-5>.

**Weaver, Scott C.** 2013. “Urbanization and Geographic Expansion of Zoonotic Arboviral Diseases: Mechanisms and Potential Strategies for Prevention.” *Trends in Microbiology* 21 (8): 360–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>.

**Weaver, Scott C., Caroline Charlier, Nikos Vasilakis, and Marc Lecuit.** 2017. “Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases.” *Annual Review of Medicine*, August. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>.

**Weaver, Scott C., and Naomi L. Forrester.** 2015. “Chikungunya: Evolutionary History and Recent Epidemic Spread.” *Antiviral Research* 120: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>.

**Weill, Mylène, Georges Lutfalla, Knud Mogensen, Fabrice Chandre, Arnaud Berthomieu, Claire Berticat, Nicole Pasteur, Alexandre Philips, Philippe Fort, and Michel Raymond.** 2003. “Comparative Genomics: Insecticide Resistance in Mosquito Vectors.” *Nature* 423 (6936): 136–37. <https://doi.org/10.1038/423136b>.

**Weinbren, M. P., A. J. Haddow, and M. C. Williams.** 1958. “The Occurrence of Chikungunya Virus in Uganda I. Isolation from Mosquitoes.” *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 52 (3): 253–62. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(58\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(58)90084-1).

“WHO | Guidelines for Testing.” n.d. WHO. Accessed April 20, 2017. <http://www.who.int/whopes/guidelines/en/>.

**Wilce, Matthew C. J., and Michael W. Parker.** 1994. “Structure and Function of Glutathione S-Transferases.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1205 (1): 1–18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8).

**Wilder-Smith, Annelies.** 2017. “Yellow Fever Vaccination: Estimating Coverage.” *The Lancet Infectious Diseases*, August. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30494-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30494-2).

**Winskill, Peter, Angela F Harris, Siân A Morgan, Jessica Stevenson, Norzahira Raduan, Luke Alphey, Andrew R McKemey, and Christl A Donnelly.** 2014. “Genetic Control of *Aedes Aegypti*: Data-Driven Modelling to Assess the Effect of Releasing Different Life Stages and the Potential for Long-Term Suppression.” *Parasites & Vectors* 7 (February): 68. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-68>.

**Wood, Or, S. Hanrahan, M. Coetzee, Li Koekemoer, and Bd Brooke.** 2010. “Cuticle Thickening Associated with Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Funestus*.” *Parasites & Vectors* 3 (August): 67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-67>.

**Wu, Xue-Mei, Bo-Ying Xu, Feng-Ling Si, Jianyong Li, Zhen-Tian Yan, Zheng-Wen Yan, Xiu He, and Bin Chen.** 2017. “Identification of Carboxylesterase Genes Associated with Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae).” *Pest*

*Management Science*, July. <https://doi.org/10.1002/ps.4672>.

**Wu, Zhi-Ming, Hong-Liang Chu, Gang Wang, Xiao-Juan Zhu, Xiao-Xia Guo, Ying-Mei Zhang, Dan Xing, et al.** 2016. “Multiple-Insecticide Resistance and Classic Gene Mutations to Japanese Encephalitis Vector *Culex Tritaeniorhynchus* from China.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 32 (2): 144–51. <https://doi.org/10.2987/moco-32-02-144-151.1>.

## Y

**Yahouédo, Gildas A., Fabrice Chandre, Marie Rossignol, Carole Ginibre, Vasileia Balabanidou, Natacha Garcia Albeniz Mendez, Olivier Pigeon, John Vontas, and Sylvie Cornelie.** 2017. “Contributions of Cuticle Permeability and Enzyme Detoxification to Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Gambiae*.” *Scientific Reports* 7 (September). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11357-z>.

**Yan, Liangzhen, Pengcheng Yang, Feng Jiang, Na Cui, Enbo Ma, Chuanling Qiao, and Feng Cui.** 2012. “Transcriptomic and Phylogenetic Analysis of *Culex Pipiens Quinquefasciatus* for Three Detoxification Gene Families.” *BMC Genomics* 13 (November): 609. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-609>.

**Yanola, Jintana, Saowanee Chamnanya, Nongkran Lumjuan, and Pradya Somboon.** 2015. “Insecticides Resistance in the *Culex Quinquefasciatus* Populations from Northern Thailand and Possible Resistance Mechanisms.” *Acta Tropica* 149 (Supplement C): 232–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.011>.

**Yohannes, M., and E. Boelee.** 2012. “Early Biting Rhythm in the Afro-Tropical Vector of Malaria, *Anopheles Arabiensis*, and Challenges for Its Control in Ethiopia.” *Medical and Veterinary Entomology* 26 (1): 103–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00955.x>.

## Z

**Zhao, Bo, Vladimir A. Kokoza, Tusar T. Saha, Stephanie Wang, Sourav Roy, and Alexander S. Raikhel.** 2014. “Regulation of the Gut-Specific Carboxypeptidase: A Study Using the Binary Gal4/UAS System in the Mosquito *Aedes Aegypti*.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 54 (November): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.08.001>.