

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE
PARASITOLOGY AND ECOLOGY LABORATORY

Etude de l'influence de la résistance aux insecticides sur le développement de *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 chez *Anopheles funestus* s.s. Giles, 1900 et *Anopheles coluzzii* Coetzee, 2013, vecteurs majeurs du paludisme au Cameroun

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Doctorat/Ph.D. en Biologie des Organismes Animaux

Option : Parasitologie et Ecologie

Par

KOPYA Edmond

Matricule : 07Q414

Master ès-Sciences

Devant le jury composé ainsi qu'il suit :

Président :	BILONG BILONG Charles Felix, Pr.,	<i>Université de Yaoundé I ;</i>
Rapporteurs :	NJIOKOU Flobert, Pr., ANTONIO-NKONDJIO Christophe, DR.,	<i>Université de Yaoundé I ;</i> <i>OCEAC, Yaoundé</i>
Membres :	FOMENA Abraham, Pr.	<i>Université de Yaoundé I ;</i>
	BIGOGA DAIGA Jude, Pr.	<i>Université de Yaoundé I ;</i>
	NJAN NLÔGA Alexandre Michel, MC.,	<i>Université de Ngaoundéré.</i>



Année 2021

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

ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean-Claude, *Maitre de Conférences*
VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maitre de Conférences*
VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*
VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*
Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*
Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste

25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste

29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

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

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste

23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancelor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>

11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

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

32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

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

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

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

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

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

4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

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

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	---------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste

13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
---	-------------------------	------------	----------------------------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

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

13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste

4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOUA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste

4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

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

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILÉN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

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

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	39 (18)
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	34 (5)
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	35(7)
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	25 (2)
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	40 (5)
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	43(7)
Total	69 (4)	99 (28)	130 (33)	45 (10)	343 (75)

Soit un total de **344 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

() = Nombre de Femmes

75

Dédicaces

A toute ma famille...

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le Laboratoire de Recherche sur le Paludisme (LRP) de l'Organisation de Coopération pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) à Yaoundé au Cameroun. Ils ont bénéficié du soutien financier des projets de recherche Wellcome Trust (102543/Z/13/Z) et (WTO86423MA) accordé aux **Dr. Cyrille NDO** et **Dr. Christophe ANTONIO NKONDJIO** respectivement.

Avant de restituer les principaux résultats de ces travaux, je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à leur réalisation. Je pense particulièrement à :

Dr Christophe ANTONIO-NKONDJIO, que je remercie du fond du cœur pour son soutien sans faille dans les nombreuses difficultés que j'ai pu rencontrer, soutien sans lequel bien peu de choses auraient été rendues possibles. Comment ne pas également évoquer ici les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues autour de mon sujet de thèse et l'attention particulière qu'il a toujours portée pour moi, ainsi que les nombreux conseils qu'il m'a prodigués.

Dr Cyrille NDO, voici enfin l'occasion pour moi de le remercier pour la liberté puis la confiance qu'il m'a accordé dans l'organisation du travail. Merci pour toutes les fois où il a donné de son temps pour apporter des réponses à mes innombrables questions. Sa rigueur scientifique et sa grandeur d'esprit ont rendu facile la réalisation de ce travail. Je retiens de lui un encadreur dont les qualités professionnelles et morales suscitent le respect et l'admiration.

Pr Flobert NJIOKOU, pour le suivi des travaux du début à la fin.

Tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales en particulier les professeurs **BILONG BILONG Charles Félix**, **FOMENA Abraham**, **MIMPFOUNDI Rémy**, **NGASSAM Pierre**, **TCHUEM TCHUENTE Louis Albert**, **NOLA Moïse**, **MONY Ruth** et **KEKEUNOU Sévilor...** pour la qualité des enseignements reçus, qui ont fait de moi le biologiste parasitologue que je suis aujourd'hui.

Messieurs les secrétaires exécutifs de l'OCEAC, **Dr. Constant Roger AYENENGOYE** et **Dr. Manuel NSO ADA** (en poste) pour m'avoir autorisé à effectuer plusieurs stages académiques à l'OCEAC.

Monsieur **Fulgence LIKASSI** en poste, pour nous avoir facilité les différentes procédures administratives tout au long des 3 années de stage académique. En témoignage de ma profonde gratitude, qu'il trouve ici mes remerciements les plus sincères.

Dr. Nicolas DOLOGUELE et Dr. Brahim en poste qui à travers de nombreux conseils et suggestions, a beaucoup contribué à ma formation.

Dr. Parfait AWONO-AMBENE et Pr. Josiane ETANG, qui à travers de nombreux conseils et suggestions, ont beaucoup contribué à ma formation. Je retiens surtout leur simplicité qui fait d'eux des chercheurs chevronnés et respectés.

Pr. Charles WONDJI, dont les précieux conseils m'ont été d'un très grand apport dans le démarrage de cette thèse. Je lui dis grandement merci.

Monsieur le Chef de Département de Biologie et Physiologie Animales de la faculté des sciences de l'Université de Yaoundé I, **Pr BILONG BILONG Charles Félix**, pour son implication totale dans la formation et l'encadrement scientifique des étudiants malgré ses multiples occupations.

Drs Emmanuel ELANGA, Dr. Billy TENE FOSSOG et Dr. Basile KAMGA MBOHAM, pour leurs multiples conseils. Je leurs dis grandement merci.

Je remercie les techniciens du Laboratoire de Recherche sur Paludisme de l'OCEAC qui ont eu à participer à cette étude en particulier **Rose NYAMBAM, Jean Pierre AGBOR, Jean Claude TOTO et Etienne ONANA**.

Je remercie mes camarades stagiaires de l'OCEAC, pour la bonne ambiance qu'ils ont maintenue au laboratoire et qui a sans doute contribué à la bonne réalisation de ce travail.

Mlle **Téclaire NGUENG** qui a toujours été là, et qui a su me soutenir dans les moments difficiles. Elle a su faire tous les sacrifices nécessaires à la réussite de cette thèse. Je lui témoigne toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Je pense enfin à mes filles **Manuella et Maïllys** qui sont venues au monde en apportant la "lumière" qui a éclairé ce travail du début à la fin.

Sommaire

Dédicaces.....	xi
Remerciements	xii
Sommaire.....	xiv
Liste des abréviations	xvii
Définitions usuelles.....	xviii
Liste des Figures.....	xx
Liste des Tableaux.....	xxii
Résumé.....	xxiii
Abstract.....	xxv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PALUDISME	5
I.1 Situation actuelle du paludisme dans le monde	6
I.2 Agents du paludisme	6
I.2.1 Position systématique et répartition géographique des plasmodiums.....	6
I.2.2 Cycle de développement du <i>Plasmodium</i>	8
I.3 Vecteurs de <i>Plasmodium</i> : les anophèles	10
I.3.1 Systématique et morphologie des anophèles	10
I.3.2 Bio-écologie et cycle de développement des anophèles	11
I.3.3 Vecteurs de plasmodiums en Afrique	15
I.3.4 Groupe <i>Anopheles funestus</i>	16
I.3.5 Complexe <i>Anopheles gambiae</i>	22
I.4 Quelques paramètres de mesure de la transmission du <i>Plasmodium</i> moustique- homme.....	27
I.5 Déterminants de la transmission du <i>Plasmodium</i> chez le vecteur et facteurs contrôlant le déroulement du cycle sporogonique	27
I.5.1 Facteurs liés au parasite	27
I.5.2 Facteurs liés au moustique	29
I.5.3 Facteurs liés à l'environnement	30
I.6 Méthodes de lutte contre le paludisme.....	31
I.6.1 Lutte antiparasitaire.....	31

I.6.2	Lutte anti-vectorielle	32
I.7	Quelques techniques utilisées pour l'identification moléculaire.....	37
I.7.1	PCR classique	37
I.7.2	Séquençage de l'ADN.....	40
CHAPITRE II	: MATERIEL ET METHODES.....	42
II.1	Cadre géographique de l'étude.....	43
II.2	Matériel et méthodes	47
II.2.1	Protocoles de terrain.....	47
II.2.2	Protocoles de laboratoire.....	47
II.3	Analyse des données	61
II.3.1	Données de la transmission.....	61
II.3.2	Données de la résistance	61
II.3.3	Données de l'infection expérimentale.....	61
II.3.4	Données du séquençage du gène <i>GSTe2</i>	62
CHAPITRE III	: RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
III.1	Résultats	65
III.1.1	Abondance relative des moustiques adultes dans les localités d'étude	65
III.1.2	Biologie de <i>Anopheles funestus</i> s.s. au laboratoire	66
III.1.3	Préférences trophiques et taux d'anthropophilie de <i>Anopheles funestus</i> s.s. et de <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	67
III.1.4	Prévalence de l'infection par les sporozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i> chez les spécimens sauvages d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. et d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	67
III.1.5	Sensibilité d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. aux insecticides en 2014 et en 2016.....	68
III.1.6	Susceptibilité d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. de Mebelong et d' <i>Anopheles coluzzii</i> de Yaoundé à l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i> dans les conditions de laboratoire	74
III.1.7	Influence de la résistance d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. aux insecticides sur sa susceptibilité à l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	79
III.1.8	Influence de la résistance d' <i>Anopheles coluzzii</i> aux insecticides sur sa susceptibilité à l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	85
III.2	Discussion	90
III.2.1	Bioécologie d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. en laboratoire.....	90
III.2.2	Rôle vectoriel d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. et d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. dans la transmission du paludisme	91

III.2.3 Sensibilité d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. et d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l. aux insecticides	93
III.2.4 Susceptibilité des femelles d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. et d' <i>Anopheles coluzzii</i> à l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	96
III.2.5 Influence de la résistance aux insecticides sur le développement de <i>Plasmodium falciparum</i> chez <i>Anopheles funestus</i> s.s.	99
III.2.6 Influence de la résistance aux insecticides sur le développement de <i>Plasmodium falciparum</i> chez <i>Anopheles coluzzii</i>	102
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
ANNEXES	135
Liste des publications issues de la thèse	140

Liste des abréviations

ACm : Anticorps monoclonaux de Capture	PCR : Polymerase Chain reaction
ACT : Combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine	PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
ADN : Acide Désoxyribonucléique	s.l. : <i>sensu lato</i> (sens large)
An. : <i>Anopheles</i>	s.s. : <i>sensu stricto</i> (sens stricte)
B.B : Blocking Buffer	TA : Taux d'anthropophilie
BET : Bromure d'Ethidium	Taq : <i>Thermophilus aquaticus</i>
CSP : CircumSporozoite Protein	TBE : Tris-Borate-EDTA
CTAB : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	Tkd : Temps de <i>knockdown</i>
DDT : Dichlorodiphényltrichloéthane	Kdr : <i>knockdown resistance</i>
dNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate	IC : Intervalle de confiance
DO : Densité Optique	nm : nanomètre
EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid	WHO : World Health Organization
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	PCD : Plan Communal de Développement
GABA : gamma-aminobutyrique	
GST : Glutathion S-transférase	
HCH : Hexachloro cyclohexane	
ICSP : Indice Circumsporozoïtique	
IgG : Immuno-globuline G	
IGS : InterGenic Spacer	
PID : Pulverisation intradomiciliaire	
IS : Indice Sporozoïtique	
ITS : Internal Transcribed Spacer	
MgCl₂ : Chlorure de Magnesium	
MII : Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide	
NP40 : Nonidet P40	
OMS : Organisation Mondiale de la Santé	
Pb : paire de bases	
PBS : Phosphate Buffered- Saline	

Définitions usuelles

Anthropophilie : une espèce est dite anthropophile lorsqu'elle se nourrit du sang de l'homme (Mouchet et *al.*, 2008).

Zoophilie : une espèce est dite zoophile lorsqu'elle se nourrit du sang de l'animal (Apiwathnasorn et *al.*, 1983).

Endophagie : une espèce est qualifiée d'endophage si elle pique à l'intérieur des habitations (Dronamraju et *al.*, 2005).

Exophagie : une espèce est dite exophage si elle pique à l'extérieur (Manuila, 1971).

Endophilie : les espèces endophiles sont celles qui se reposent dans les maisons après la prise de leur repas de sang (Dronamraju et *al.*, 2005).

Exophilie : les espèces exophiles sont celles qui se reposent dans les abris externes après la prise de leur repas de sang (Manuila, 1971).

Complexe d'espèces : est un ensemble d'espèces jumelles morphologiquement semblables, voire indifférentiables, mais génétiquement distinctes, et dont l'identification demande l'utilisation des critères génétiques (Mouchet et *al.*, 2004).

Groupe d'espèces : est un ensemble d'espèces morphologiquement semblables mais qui présentent de petites différences à un stade au moins de leur cycle de développement (Harbach, 1994).

Taux d'anthropophilie : est le nombre de repas de sang pris par un moustique sur un homme en 24h. Ce taux peut aussi représenter le pourcentage d'anophèles ayant pris un repas de sang sur l'homme (Mouchet et *al.*, 2008).

Indice sporozoïtique (Is) ou **Indice circumsporozoïtique (ICSP)** : est le pourcentage de moustiques infectés par le *Plasmodium* dans un échantillon de moustiques disséqués ou le pourcentage de moustiques positifs après un test ELISA (ICSP).

Indice plasmodique : est la proportion de personnes porteuses de trophozoïtes dans une population donnée.

Indice gamétocytaire : correspond à la proportion de sujets porteurs de gamétocytes dans une population humaine.

Densité parasitaire : est le nombre de parasites par microlitre de sang.

Compétence vectorielle : est l'aptitude intrinsèque d'un vecteur à ingérer un agent pathogène, à en assurer la multiplication et/ou le développement à et le transmettre à un autre hôte vertébré (Beaver *et al.*, 1985 ; Hardy *et al.*, 1983).

Capacité vectorielle : est l'efficacité de transmission d'un vecteur dans les conditions naturelles, modulée par des facteurs extrinsèques tels que la température, l'humidité et le contact avec l'homme. Elle tient compte de la compétence vectorielle (Beaver *et al.*, 1985 ; Hardy *et al.*, 1983).

Liste des Figures

Figure 1 : Situation du paludisme dans le monde.....	6
Figure 2 : Différents stades de <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'homme.....	7
Figure 3 : Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'homme et chez l'anophèle.....	10
Figure 4 : Œuf d' <i>Anopheles</i>	11
Figure 5 : Caractérisation morphologique des larves d'anophèle.....	12
Figure 6 : Cycle biologique des anophèles.....	15
Figure 7 : Répartition géographique des 13 espèces du groupe <i>Anopheles funestus</i> en Afrique.....	18
Figure 8 : Gîtes typiques d' <i>Anopheles funestus</i> s.l., A, B : Lac et C : Etang de pisciculture.....	20
Figure 9 : Carte de répartition des espèces du complexe <i>An. gambiae</i> s.l. sur le continent africain ;.....	23
Figure 10: Types de gîtes d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s., <i>Anopheles coluzzii</i> et <i>Anopheles arabiensis</i>	24
Figure 11: Évolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR.....	38
Figure 12: Chromatogramme généré par un séquenceur.....	41
Figure 13: Carte du Cameroun situant les localités d'étude.....	44
Figure 14: Différentes étapes du test de sensibilité des anophèles aux insecticides.....	49
Figure 15: Représentation d'une plaque ELISA et plan de distribution des éluât de sang à tester.....	51
Figure 16: Représentation d'une plaque ELISA et plan de distribution des broyats.....	52
Figure 17: Gamétocytes mâle (GM) et femelle (GF) de <i>Plasmodium falciparum</i>	56
Figure 18: Schéma des infections expérimentales.....	58
Figure 19: Electrophorégramme des bandes d'amplification des séquences d'ADN spécifiques des espèces du groupe <i>Anopheles funestus</i> s.s.....	65
Figure 20: Electrophorégramme des bandes d'amplification des séquences d'ADN spécifiques d'espèce du complexe <i>Anopheles gambiae</i>	66
Figure 21: Taux de ponte et d'éclosion des œufs des femelles d' <i>Anopheles funestus</i> s.s.....	66
Figure 22: Durée de vie des imagos d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. au laboratoire.....	67
Figure 23: Taux de mortalité après 1h d'exposition aux insecticides et 24h d'observation chez les anophèles provenant d'Obout.....	70

Figure 24: Taux de mortalité après 1h d'exposition aux insecticides et 24h d'observation chez les anophèles provenant de Mebelong.....	72
Figure 25: Régression linéaire entre les paramètres de l'infection chez <i>Anopheles funestus</i> s.s. de Mebelong.	76
Figure 26: Variation du nombre d'oocystes dans les estomacs d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. et d' <i>Anopheles coluzzii</i>	77
Figure 27: Régression linéaire entre les paramètres de l'infection chez <i>Anopheles coluzzii</i> de Yaoundé.	78
Figure 28: Variation du nombre d'oocystes dans les estomacs de différents groupes de moustiques.	80
Figure 29: Photo de bandes sur gel d'agarose représentant les génotypes au locus L119F-GSTe2 chez <i>Anopheles funestus</i> s.s.....	80
Figure 30: Fréquences alléliques (A) et génotypiques (B) au locus GSTe2 à Obout et à Mebelong.	81
Figure 31: Taux d'infection par <i>Plasmodium falciparum</i> en fonction des génotypes <i>GSTe2</i>	82
Figure 32: Nombre d'oocystes par estomac en fonction des génotypes au locus <i>GSTe2</i>	82
Figure 33: Fréquence génotypique au locus <i>GSTe2</i> en fonction du nombre d'oocystes par estomac.....	83
Figure 34: Réseau d'haplotypes du gène <i>GSTe2</i> (à gauche) et arbre phylogénétique des haplotypes à (droite) d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. construit à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance.....	85
Figure 35: Variation du nombre d'oocystes dans les estomacs de différents groupes de moustiques.	86
Figure 36: Régression linéaire entre le taux d'infection et le nombre de gamétocytes/ μ l de sang chez <i>Anopheles coluzzii</i> résistants (A) et témoins (B).....	87
Figure 37: Régression linéaire entre le nombre moyen d'oocystes/estomac et le nombre de gamétocytes/ μ l de sang chez <i>Anopheles coluzzii</i> résistants (A) et témoins (B). ..	87
Figure 38: Nuage de points représentant les génotypes au locus L1014F- <i>kdr</i> chez <i>An. coluzzii</i>	88
Figure 39: Fréquences génotypiques (A) et alléliques (B) au locus L1014F- <i>kdr</i> dans la ville de Yaoundé.	88
Figure 40: Taux d'infection par <i>Plasmodium falciparum</i> en fonction des génotypes L1014F- <i>kdr</i> chez <i>Anopheles coluzzii</i>	89
Figure 41: Nombre d'oocystes par estomac en fonction des génotypes au locus L1014F- <i>kdr</i> chez <i>Anopheles coluzzii</i>	90

Liste des Tableaux

Tableau I : Caractéristiques écologiques des espèces du groupe <i>Anopheles funestus</i> en Afrique	17
Tableau II : Principaux mécanismes déterminant une résistance des moustiques aux insecticides	36
Tableau III : Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'identification moléculaire des espèces du groupe <i>Anopheles funestus</i> s.s.	54
Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage de la mutation L119- <i>GSTe2</i> chez <i>Anopheles funestus</i> s.s.	59
Tableau V : Abondance des moustiques adultes échantillonnés par aspiration électrique au cours notre étude	65
Tableau VI : Nombre d'anophèles infectés par <i>Plasmodium falciparum</i> de 2014 à 2016.....	68
Tableau VII : Temps de <i>knockdown</i> en minutes chez les spécimens sauvages d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. d'Obout et de Mebelong en 2014 et en 2016.....	73
Tableau VIII : Résumé des données sur l'enquête parasitologique chez les enfants examinés à Okola	74
Tableau IX : Résumé des paramètres de l'infection expérimentale chez <i>Anopheles funestus</i> s.s.	75
Tableau X : Résumé des paramètres de l'infection expérimentale chez <i>Anopheles coluzzii</i> ..	78
Tableau XI : Taux d'infection d' <i>Anopheles funestus</i> s.s. en fonction du phénotype	79
Tableau XII : Comparaison des taux d'infection à <i>Plasmodium falciparum</i> entre moustiques de différents génotypes au locus <i>GSTe2</i>	82
Tableau XIII : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène <i>GSTe2</i> en fonction du statut d'infection	84
Tableau XIV : Comparaison du taux de susceptibilité à <i>Plasmodium falciparum</i> entre les moustiques de différents génotypes au locus L1014- <i>kdr</i> chez <i>Anopheles coluzzii</i>	89

Résumé

Anopheles funestus s.s. et *Anopheles coluzzii* sont des vecteurs majeurs de plasmodiums, agents du paludisme en Afrique subsaharienne. Ils appartiennent respectivement au groupe *Anopheles funestus* et au complexe *Anopheles gambiae*. Malgré son important rôle épidémiologique, *An. funestus* s.s. reste peu étudié comparé à *An. gambiae* s.l.. Par conséquent, de nombreux aspects de la bioécologie de cette espèce ainsi que les marqueurs moléculaires de la résistance aux insecticides sont jusqu'alors mal connus. Ce manque d'information représente une limite aux mesures de lutte antivectorielle dans les régions où cette espèce est le vecteur majeur du paludisme. Après des décennies d'utilisation répétée d'insecticides pour la lutte antivectorielle, les vecteurs majeurs du paludisme, notamment *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* s.s. ont développé une résistance à ces substances. Ce phénomène de résistance aux insecticides constitue une véritable menace pour les outils de lutte contre le paludisme. Dans la perspective de renforcer les stratégies de lutte contre les vecteurs de *Plasmodiums*, la présente étude a exploré le rôle d'*An. funestus* s.s. dans la transmission du paludisme et sa sensibilité aux insecticides communément utilisés en agriculture et en santé publique. Elle a par la suite évalué expérimentalement la susceptibilité des spécimens d'*An. funestus* s.s. à l'infection par des isolats naturels de *P. falciparum* ; enfin a exploré l'influence de la résistance aux insecticides sur le développement de *P. falciparum* chez *An. funestus* s.s. et *An. coluzzii*, en utilisant deux marqueurs de la résistance, un appartenant au glutathion s-transférase (mutation L119F-*GSTe2*) et l'autre au « knock down resistance » (mutation L1014F-*kdr*) respectivement.

Anopheles funestus s.s. et *An. gambiae* s.l. sont apparus très anthropophiles (100%) dans nos localités d'étude, où ils représentaient les vecteurs par excellence avec des prévalences de l'infection à *P. falciparum* de 6,86% et 12,66% respectivement. En outre, des spécimens d'*An. funestus* s.s. d'Obout et de Mebelong ont été résistants aux pyréthrinoïdes et au DDT. Cette résistance a été accompagnée d'une faible augmentation du temps nécessaire pour que 50% des moustiques testés soient assommés par l'insecticide (tkd_{50}). Ce temps a été dans la plupart des cas moins de 2 fois supérieure à celui enregistré pour la souche sensible Kisumu (*An. gambiae* s.s.) utilisée comme témoin. Ce qui suggère une faible influence de la résistance de type *kdr* chez cette espèce. *Anopheles gambiae* s.l. a également montré une forte résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes dans les localités d'étude.

En ce qui concerne la susceptibilité des moustiques à l'infection par *P. falciparum*, les spécimens d'*An. funestus* s.s. ont affiché un taux d'infection général de 38,62% comparable à

celui des spécimens d'*An. coluzzii* souche Ngouso de laboratoire (39,92%). Cependant, le nombre d'oocystes (médiane : 13 ; moyenne 8 ; variation : 1-139) était relativement moins élevé ($P > 0,05$) chez les spécimens d'*An. funestus* s.s. que chez ceux d'*An. coluzzii* souche Ngouso de laboratoire (médiane : 32 ; moyenne 20 ; variation : 1-351).

Par ailleurs, l'étude de l'influence de la résistance du moustique aux insecticides sur le développement de *P. falciparum* a montré que pour la résistance à base de glutathion S-transférase (GST), le taux d'infection était plus élevé ($P < 0,001$) chez les moustiques de génotype hétérozygote et homozygote sensible comparé à celui des individus homozygotes résistants. Cependant, l'intensité de l'infection a présenté un profil d'évolution différent car les moustiques possédant l'allèle résistant (L119F-GSTe2) développaient mieux le parasite (stade oocyste) comparés aux individus sensibles ($P < 0,01$). L'analyse des séquences du gène GSTe2 n'a pas révélé une association entre le polymorphisme de ce gène et l'infection d'*An. funestus* s.s.. Pour le gène *kdr* (la mutation L1014F) chez *An. coluzzii*, aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne le taux et l'intensité de l'infection des moustiques de génotype résistant comparé à celui du génotype sensible ($P > 0,05$).

D'une manière générale, cette thèse nous a permis de mieux déterminer le rôle vecteur d'*An. funestus* s.s dans la transmission du paludisme, et d'évaluer l'influence de la résistance sur le développement du *P. falciparum*. Une attention particulière sera portée sur ces résultats pour l'amélioration des mesures de lutte contre les vecteurs du paludisme.

Mots-clés : résistance aux insecticides, *Anopheles funestus* s.s., *Anopheles coluzzii*, *Plasmodium falciparum*, GSTe2, *kdr*, infection expérimentale.

Abstract

Anopheles funestus s.s. and *Anopheles coluzzii* are major vectors of plasmodium malaria parasites in sub-Saharan Africa. They belong respectively to the *An. funestus* group and *An. gambiae* complex. Despite its important epidemiological role, *An. funestus* s.s. remains poorly studied, as compared to *An. gambiae* s.l. Consequently, many aspects of the bionomic of this species as well as molecular markers of resistance to insecticides are unknown. This represents a limit for vector control particularly in areas where this species is involved in malaria transmission. After decades of repeated use of insecticides for vector control, some major vectors of malaria including *An. coluzzii*, *An. gambiae* s.s. and *An. funestus* s.s. have developed resistance to insecticides, particularly pyrethroids, the only class of insecticide recommended for impregnating bed nets. The rapid expansion of insecticide resistance in vector populations poses serious threat to malaria vector control. In the perspective of strengthening the fight against malaria vectors, we investigated the influence of insecticide resistance on *An. funestus* s.s. susceptibility to malaria parasite. The susceptibility of wild specimens of both *An. funestus* s.s. and *An. coluzzii* to natural isolates of *P. falciparum* was explored. The influence of two genes involved in insecticides resistance namely glutathione s-transferase (mutation L119F-*GSTe2*) and the knock down resistance (mutation L1014F-*kdr*) was assessed.

Anopheles funestus s.s. females were highly anthropophilic (100%) and was the most represented major malaria vectors species in our study localities, with *P. falciparum* infection rate of 6.86%. In addition, wild specimens of *An. funestus* s.s. from Obout and Mebelong were resistant to pyrethroids and DDT. This resistance was associated with a slight increase of knockdown times compared to the Kisumu (*An. gambiae* s.s.) reference strain, suggesting no implication of *kdr* resistance in this species. High resistance to both pyrethroid and DDT in *An. gambiae* s.l. was also recorded.

Regarding the susceptibility of mosquitoes to *P. falciparum* infection, specimens of *An. funestus* s.s. had an overall infection rate of 38.62% and this was similar to that of *An. coluzzii* Ngousso Lab-strain (infection rate: 39.92%). However, the number of oocysts (median: 13; mean 8; variation: 1-139) was lower in *An. funestus* s.s. compared to *An. coluzzii* Ngousso Lab-strain (median: 32; mean 20; variation: 1-351).

The assessment of the influence of *GST*-based resistance on the success of *P. falciparum* infection showed significantly higher infection rate ($P < 0.001$) in heterozygotes

and susceptible homozygote individuals compare to homozygotes resistant individuals. The intensity of the infection presented a different profile with mosquitoes carrying the resistant allele (L119F-*GSTe2*) both homozygote and heterozygote displaying high parasite load compared to susceptible individuals ($P < 0.01$). Sequencing analysis did not reveal any association between the polymorphism of the *GSTe2* gene and the infection in *An. funestus* s.s. For resistance mediated by *kdr* gene in *An. coluzzii*, no significant difference was observed between mosquitoes of different genotypes ($P > 0.05$).

Overall, the study undertaken under the frame of this thesis allowed us to better determine the role of *An. funestus* s.s in malaria transmission, and assess the influence of insecticide resistance genotypes and phenotypes on *P. falciparum* development. Particular attention need to be given to these results to improve malaria vector control interventions.

Key words: insecticide resistance, *Anopheles funestus* s.s, *Anopheles coluzzii*, *Plasmodium falciparum*, *GSTe2*, *kdr*, experimental infection.

INTRODUCTION

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde (WHO, 2015). Il constitue un risque majeur pour plus de deux milliards d'êtres humains. L'Afrique subsaharienne, qui ne compte que 8% de la population mondiale, fournit 85% à 93% des cas de paludisme, dont 99,7% dus à *Plasmodium falciparum* Welch, 1897 (WHO, 2019). Au Cameroun, le paludisme demeure l'endémie majeure et la première cause de morbidité et de mortalité dans les groupes les plus vulnérables, à savoir les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. Les statistiques sanitaires révèlent qu'il est responsable de 43% des consultations médicales chez les enfants de moins de 5 ans, de 42% de morbidité et de 60% de décès dans la même tranche d'âge, de 49% des hospitalisations à travers le pays et de 40% du budget annuel de santé (PNLP, 2015 et 2019 ; Minsanté, 2019).

En ce qui concerne les avancées dans la lutte contre le paludisme, des efforts intenses ont été déployés depuis 2000 pour réduire ce fardeau en Afrique, en s'appuyant sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII), principale mesure préventive. La pulvérisation intradomiciliaire (PID) d'insecticides à effet rémanent est une autre mesure importante de prévention du paludisme (WHO, 2017). La mise en œuvre de ces mesures de lutte antivectorielle a entraîné une réduction significative de l'incidence et de la mortalité du paludisme de 21% et 31% respectivement, sur le continent africain entre 2011 et 2015 (WHO, 2017). Cependant, l'émergence de la résistance aux insecticides dans les populations de vecteurs, résultant de l'utilisation abusive des biocides en santé publique et en agriculture, est un véritable obstacle au développement de la lutte et du contrôle du paludisme en Afrique (Ranson and Lissenden, 2016 ; Chouaibou *et al.*, 2016 ; Nkya *et al.*, 2014). On craint qu'une telle résistance puisse accroître la compétence/capacité vectorielle des vecteurs du paludisme et, par conséquent, l'augmentation de la transmission de la maladie. En effet, après des décennies d'utilisation répétée d'insecticides, les vecteurs majeurs du paludisme à l'instar d'*Anopheles funestus* s.s. (Giles, 1900) et *Anopheles gambiae* s.l. (Giles, 1902). Ces vecteurs ont développé une résistance à toutes les quatre classes d'insecticides dont on se sert en santé publique et particulièrement vis-à-vis des pyréthrinoïdes (WHO, 2018).

Une bonne gestion de la résistance des vecteurs aux insecticides nécessite une bonne compréhension des mécanismes y sont impliqués ainsi que leur influence sur la capacité/compétence vectorielle des anophèles. Les mécanismes de résistance aux insecticides sont considérés comme interférant avec le développement des agents pathogènes que les moustiques transmettent. Par exemple, Il a été démontré que les changements drastiques qui accompagnent l'évolution de la résistance aux insecticides peuvent altérer la

capacité de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 à laisser se développer la filaire *Wuchereria bancrofti* Seurat, 1921 (McCarroll *et al.*, 2002). Par ailleurs chez *An. gambiae* s.s Giles, 1902, Alout *et al.* (2013) ont montré que les mutations (*Ace-1/G119S* et *kdr/L1014F*) des sites cibles des insecticides influencent les résultats de l'infection par *P. falciparum* en augmentant le taux d'infection. En revanche, l'allèle *kdr* résistant est associé à une réduction de la charge parasitaire au stade d'oocyste chez les individus infectés comparativement à la souche sensible, alors que l'allèle résistant *Ace-1R* n'a pas montré une telle association. Chez *An. funestus* s.l., Lo & Coetzee (2013) ont rapporté que la souche *FUMOZ-R* résistante aux pyréthriinoïdes produit les plus faibles nombres d'oocystes et de sporozoïtes de *P. berghei* Vincke & Lips, 1948 comparée à la souche sensible *FUMOZ-BS*.

Chez les anophèles, la résistance aux insecticides est principalement due à deux mécanismes : la résistance par modification de la cible et la résistance métabolique. Par exemple chez *An. gambiae* s.l., des mutations ponctuelles au niveau du gène codant pour le canal sodium confèrent une résistance croisée dite "*kdr*" ("*knock-down resistance*") aux pyréthriinoïdes et aux organochlorés (Ranson *et al.*, 2000). La mutation du gène *Ace-1*, codant pour l'enzyme acétylcholinestérase, confèrent une résistance croisée aux carbamates et organophosphorés (Alout *et al.*, 2008 ; Weill *et al.*, 2004). Chez *An. funestus* s.s., la résistance aux insecticides est principalement placée sous l'action des enzymes métaboliques telles que les glutathions S-transférases (*GSTs*) et les gènes de la famille des cytochromes P450s (Hemingway *et al.*, 2000). Contrairement au mécanisme de résistance par modification de la cible, le contrôle de la résistance métabolique est plus complexe et nécessite des méthodes d'analyse génomique avancées telles que les *qPCR*, les microarrays ou le séquençage de l'ARN.

Hormis *An. gambiae* s.l., vecteur majeur du paludisme dans le monde, qui du fait de sa vaste distribution en Afrique et son élevage facile en laboratoire est largement employé comme modèle pour différentes études sur la résistance, la génétique des populations, l'immunité et la transgénèse. Les vecteurs tels qu'*An. funestus* s.l., qui ont également une large répartition sur le continent africain et jouent un rôle important dans la transmission du paludisme mais ne sont pas facilement cultivables en laboratoire, restent très mal ou très peu étudiés. Des travaux récents sur ce vecteur montrent que cette espèce joue un rôle important dans la transmission du paludisme, parfois surpassant largement celui d'*An. gambiae* s.l. dans certaines parties du continent (Mutuku *et al.* 2011 ; Kloke *et al.*, 2011). Du fait de leur forte affinité à l'homme, *An. funestus* s.s. et *An. coluzzii* se trouvent exposés à une forte pression

sélective due aux insecticides utilisés en santé publique et qui sont responsables de l'émergence et de l'expansion de la résistance au sein des espèces. La résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. funestus* s.s. et *An. gambiae* s.l. a été rapporté dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne (WHO, 2018). Les mécanismes de résistance identifiés sont divers parmi lesquels on peut citer les mutations L119F-*GSTe2* et L1014F-*kdr* impliquées respectivement dans la résistance métabolique et la résistance par modification du site cible. Malgré la forte implication d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzii* dans la transmission du paludisme et la montée rapide de la résistance au sein de leurs populations naturelles, l'influence de la résistance aux insecticides sur leur compétence vectorielle reste très peu étudiée en condition naturelle.

Ce travail a pour objectif principal d'évaluer l'influence de la résistance aux insecticides sur le développement de *P. falciparum* dans les populations naturelles d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzii*, vecteurs majeurs du paludisme en Afrique.

Plus spécifiquement, il s'agit :

- de déterminer le taux d'infection par *P. falciparum* et le niveau de sensibilité aux insecticides des populations naturelles d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l.;
- d'étudier la susceptibilité des spécimens sauvages d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzii* à l'infection par des isolats naturels de *P. falciparum* dans les conditions de laboratoire ;
- d'évaluer l'influence de la résistance aux insecticides sur le développement de *P. falciparum* chez les spécimens sauvages d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzii*.

Ce document se subdivise en trois chapitres dont les généralités sur le paludisme (chapitre I), le matériel et méthodes (chapitre II), enfin les résultats et la discussion (chapitre III), qu'entourent l'introduction, la conclusion et les perspectives.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PALUDISME

I.1 Situation actuelle du paludisme dans le monde

De nos jours, le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde (figure 1) et dont le nombre de cas a été estimé à 229 millions en 2019, contre 238 millions en 2000 et 231 millions en 2017. La plupart des cas (213 millions ou 93%) ont été enregistrés dans la région Afrique de l’OMS. *Plasmodium falciparum* est l’agent du paludisme le plus fréquent dans cette région ; Il a en effet été à l’origine de 99,7% des cas de paludisme estimés en 2018, tout comme dans les régions Asie du Sud-Est (50%), Méditerranée orientale (71%) et Pacifique occidental (65%) selon la WHO (2019). Au niveau mondial, le nombre de décès dus au paludisme a été évalué à 409 000 en 2019, contre 453 000 en 2015 (WHO, 2020). Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables face à cette maladie ; en 2019, ils ont représenté 67% des décès associés au paludisme dans le monde (WHO, 2020). Dans la région Afrique de l’OMS, le nombre de décès dus au paludisme a diminué de 44%, passant de 680 000 en 2000 à 384 000 en 2019 (WHO, 2020).

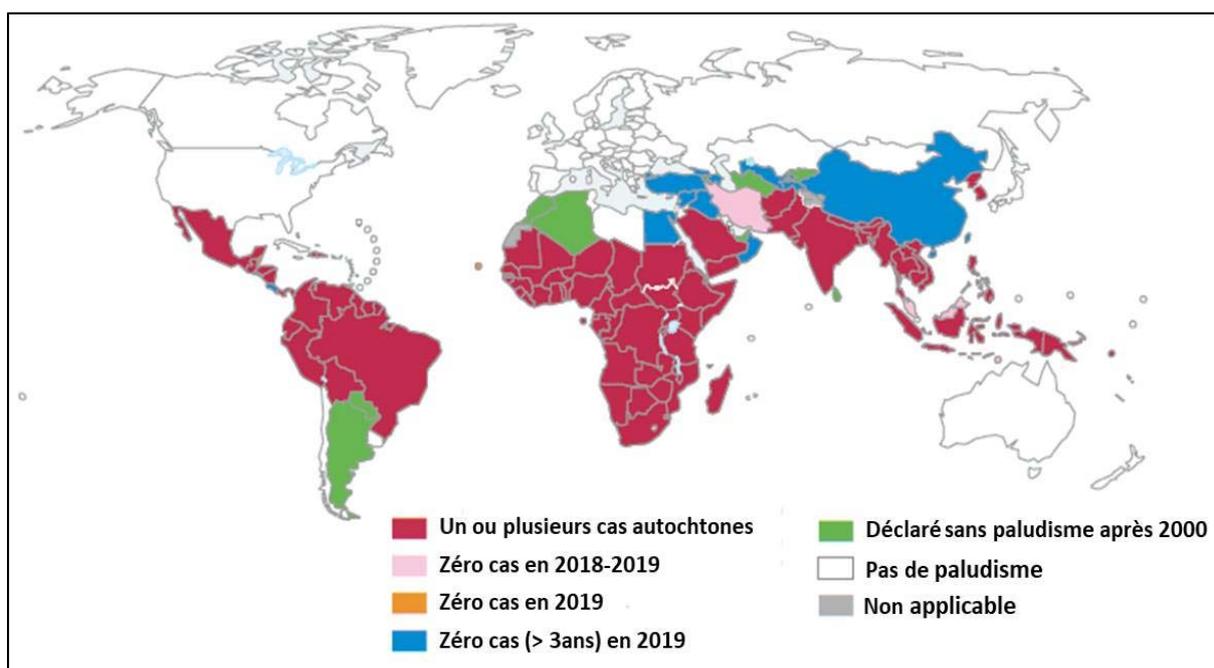


Figure 1 : Situation du paludisme dans le monde (Source : WHO, 2020).

I.2 Agents du paludisme

I.2.1 Position systématique et répartition géographique des plasmodiums

Les parasites responsables du paludisme sont des protozoaires dont la position systématique est la suivante (Wéry, 1995) ; ils appartiennent au règne Animal, embranchement des Sporozoaires (Apicomplexa), classe des Haemosporidea, sous-classe des

Haematozoae, ordre des Haemosporida, famille des Plasmodiidae et genre *Plasmodium* Marchiafava et Celli, 1895.

Les plasmodiums sont transmis aux animaux et à l'homme par une piqûre des femelles de moustiques du genre *Anopheles* Meigen, 1818. A ce mode de transmission majeur chez l'homme s'ajoutent la contamination congénitale et la transfusion sanguine. Plus de 140 espèces de *Plasmodium* infectent les hématies de divers hôtes vertébrés mais seules 5 espèces sont responsables du paludisme humain, à savoir : *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, *Plasmodium malariae* Laveran, 1881, *Plasmodium ovale* Stephens, 1922, *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890 et *Plasmodium knowlesi* Sinton and Mulligan, 1932.

Plasmodium falciparum (figure 2) est l'agent de la fièvre tierce maligne ; il est responsable des accès de fièvre survenant toutes les 48 heures. Cette espèce plasmodiale est la plus redoutable et la plus mortelle (WHO, 2018). *Plasmodium falciparum* est présent dans les régions chaudes intertropicales (Amérique centrale et du sud, Asie tropicale et en Afrique sub-saharienne). Il est très pathogène pour les personnes n'ayant aucune immunité acquise (jeunes enfants, femmes enceintes) chez qui il cause des accès pernicioeux graves, notamment le neuropaludisme et les anémies souvent mortels en absence de traitement ou suite à une mauvaise prise en charge.

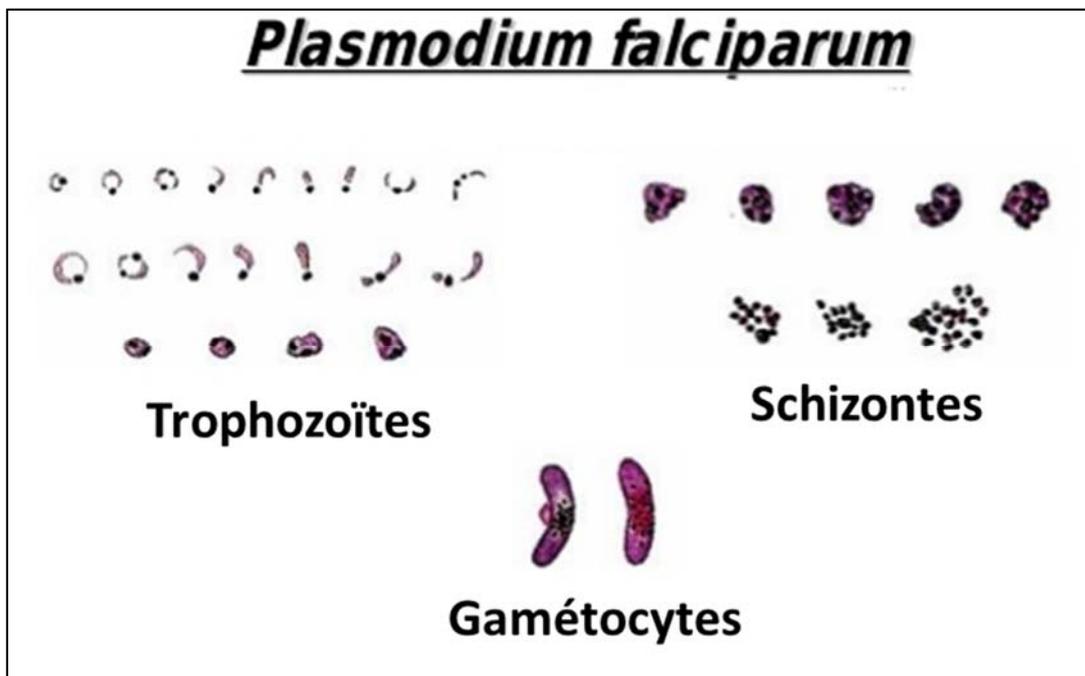


Figure 2 : Différents stades de *Plasmodium falciparum* chez l'homme (Menard, 2007).

Plasmodium malariae est l'agent responsable de la fièvre quarte avec les accès toutes les 72 heures. Il est essentiellement présent en Afrique et en Asie mais beaucoup plus rare en Amérique tropicale (Gentilini and Duflo, 1986). Le paludisme à *P. malariae* est surtout remarquable par sa périodicité de ses accès intermittents et sa longévité (Baudon, 1987).

Plasmodium ovale est l'agent de la fièvre tierce bénigne. Il est essentiellement trouvé en Afrique tropicale ; il a aussi été signalé en Asie du Sud-Est. Le paludisme à *P. ovale* est proche de celui à *P. vivax* par sa bénignité, sa durée d'incubation qui varie de quinze jours à plusieurs mois.

Plasmodium vivax est également responsable de la fièvre tierce bénigne. *Plasmodium vivax* prédomine dans la région Amériques de l'OMS qui représente 74,1 % des cas de paludisme. Il est absent en Afrique du fait que les populations d'Afrique noire ne possèdent pas l'antigène Duffy et sont naturellement réfractaires à *P. vivax*. Le paludisme à *P. vivax* détermine habituellement des accès fébriles sans gravité.

Plasmodium knowlesi, que l'on croyait jusqu'à une date récente spécifique aux espèces simiennes, compte désormais parmi les plasmodiums affectant également les humains. Son identification et sa différenciation sont maintenant possibles grâce aux techniques de biologie moléculaire comme la PCR (Padley, *et al.*, 2003). Pour l'instant, cette espèce n'est retrouvée chez l'homme qu'en Asie du Sud-est (Cox-Singh *et al.* 2008 ; 2010 ; Cox-Singh, 2009 ; Van den Eede *et al.*, 2010).

I.2.2 Cycle de développement du *Plasmodium*

Le cycle évolutif du *Plasmodium* (figure 3) est assez complexe et nécessite successivement deux hôtes : un hôte intermédiaire (l'homme) et un hôte définitif hématophage (la femelle d'un moustique du genre *Anopheles*).

I.2.2.1 Phase chez l'homme

A l'occasion d'un repas de sang, l'anophèle infesté injecte des sporozoïtes avec sa salive (Ponnudurai *et al.*, 1991 ; Beier *et al.*, 1993). Ceux-ci sont transportés par le sang et passent dans le foie au bout d'une heure. Ils pénètrent ensuite les cellules du foie (hépatocytes) où ils effectuent une reproduction asexuée et constituent, en 8 à 10 jours, des schizontes hépatiques matures ou corps bleus volumineux. L'éclatement des schizontes libère de milliers de mérozoïtes dans le circuit sanguin. Ces derniers vont soit infecter de nouveaux hépatocytes, soit infecter des hématies.

La phase érythrocytaire débute par la pénétration d'un mérozoïte dans une hématie. Celui-ci croît pour atteindre le stade de trophozoïte qui se divise plusieurs fois donnant des schizontes. L'éclatement des schizontes matures ou corps en rosace libère à nouveau des mérozoïtes. Chaque mérozoïte va ensuite parasiter une hématie saine et le cycle schizogonique recommence. La durée du cycle schizogonique varie de 48 heures pour *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. ovale*, à 72 heures pour *P. malariae*. A la fin du cycle schizogonique apparaissent des éléments à potentiel sexuel dans les hématies : les gamétocytes mâles et femelles. Ceux-ci sont absorbés, avec d'autres stades du parasite, par le moustique pendant la prise du sang sur un paludéen.

I.2.2.2 Phase chez l'anophèle

Lors de son repas de sang sur un sujet infecté, l'anophèle femelle absorbe différents stades du parasite. Les éléments asexués (trophozoïtes et schizontes) sont digérés, seuls les gamétocytes poursuivent leur développement. Dans l'estomac du moustique, le gamétocyte femelle évolue en un macrogamète tandis que le gamétocyte mâle subit un processus d'exflagellation conduisant à l'obtention d'un nombre variable d'éléments flagellés longs appelés microgamètes. La fusion entre un macrogamète (femelle) et un microgamète (mâle) aboutit à la formation d'un œuf ou zygote diploïde. Entre 18 et 36 heures après l'infestation, ce dernier se transforme en ookinète mobile qui traverse l'épithélium intestinal et s'enkyste sous la membrane basale pour former l'oocyste.

Au fur et à mesure que l'oocyste se développe (figure 3), son noyau se divise plusieurs fois pour former des sporozoïtes. La durée de cette maturation est étroitement dépendante de la température extérieure. Chez *P. falciparum*, la maturation des oocystes est maximale vers 24°C alors qu'elle est stoppée en dessous de 18 °C ou au-dessus de 35°C. Quand l'oocyste rompt, il relâche les sporozoïtes qui migrent dans l'hémocoèle du moustique jusqu'aux glandes salivaires d'où ils pourront être injectés à l'homme lors du prochain repas de sang du moustique. On estime que moins d'un quart des sporozoïtes atteignent les glandes salivaires (Hillyer, *et al.*, 2007) mais les sporozoïtes, une fois dans les glandes salivaires, survivent jusqu'à la mort du moustique ; ce dernier reste donc infectant toute sa vie (Beier *et al.*, 1998). La durée du cycle sporogonique varie selon les espèces parasites et la température ; elle est en moyenne de 14 jours à 27°C pour *P. falciparum* (Noden *et al.*, 1995).

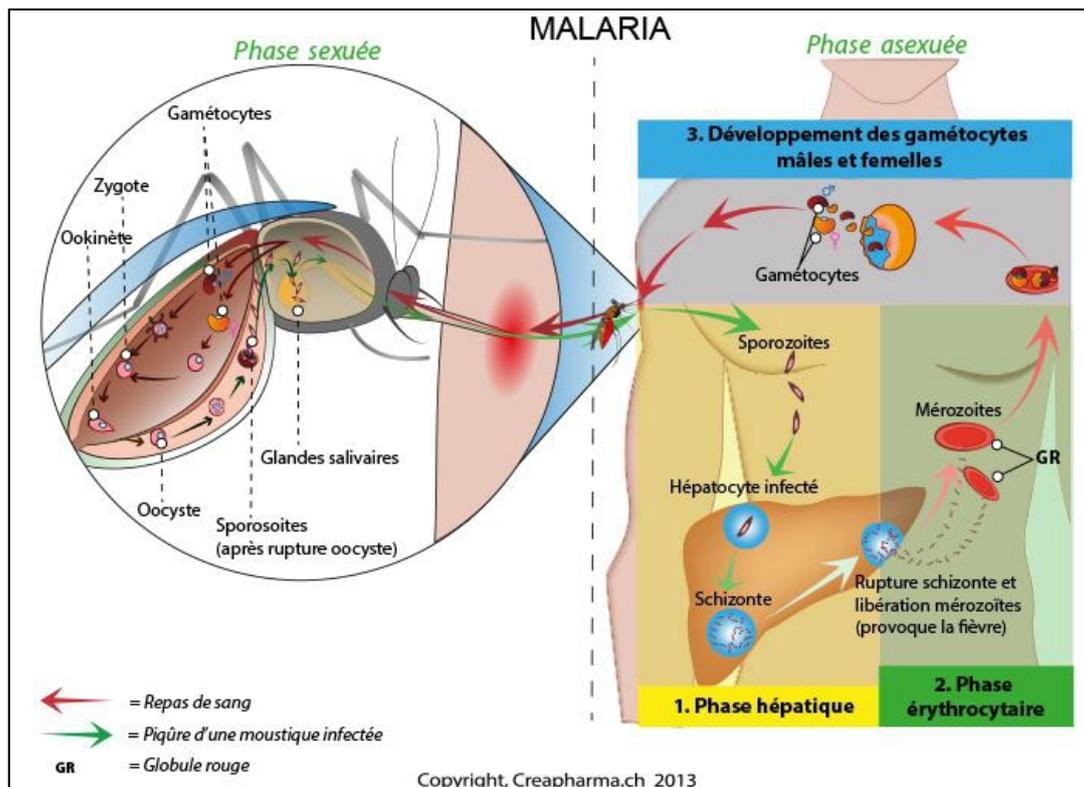


Figure 3 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* chez l'homme et chez l'anophèle (Copyright.Creapharma.ch 2013).

I.3 Vecteurs de *Plasmodium* : les anophèles

I.3.1 Systématique et morphologie des anophèles

D'après Harbach (2004), la position systématique des anophèles est la suivante : règne Animal, embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, sous-classe des Ptérygotes, ordre des Diptères, famille des Culicidae, sous-famille des Anophelinae et genre *Anopheles*.

Les anophèles ont un corps long, fusiforme et grêle, doté de longues pattes et de longues pièces buccales en forme d'aiguille. Ils se distinguent facilement des Culicinae par les critères suivants. Les ailes des anophèles présentent une succession de taches noires et claires caractéristiques des espèces alors que celles des Culicinae en sont dépourvues. Les œufs d'anophèles comportent des flotteurs latéraux alors que ceux des Culicinae en sont dépourvus (Russell *et al.*, 1963). Les larves d'anophèles ont une position parallèle à la surface de l'eau (parce qu'elles respirent par des spiracles dorsaux) alors que celles des Culicinae ont une position oblique (Holstein, 1949). Au repos, les femelles d'anophèles ont une position oblique par rapport au support alors que les Culicinae se tiennent parallèlement au support.

I.3.2 Bio-écologie et cycle de développement des anophèles

I.3.2.1 Bio-écologie des anophèles

I.3.2.1.1 Bio-écologie des stades préimaginaux

La bio-écologie des larves est entièrement dominée par la nature des gîtes larvaires dont le choix est fonction des exigences écologiques de chaque espèce. Ces exigences tiennent aux caractéristiques physiques et chimiques de l'eau du gîte (mouvement, salinité, ensoleillement, présence ou absence de végétation, taille, durée de la mise en eau, etc.). Les gîtes larvaires des anophèles sont de nature très variées et les larves reflètent leur capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales.

Œuf : l'œuf d'anophèle est pondu isolément sur la surface de l'eau (Rodhain et Perez, 1985). Il possède deux flotteurs latéraux qui lui permettent de conserver une position horizontale à la surface de l'eau (**figure 4**). La taille des œufs est généralement de l'ordre de 0,5 millimètre (Rodhain et Perez, 1985). L'œuf comprend, de l'intérieur vers l'extérieur, trois membranes : la membrane vitelline pellucide qui entoure le vitellus et l'embryon ; l'endochorion épais qui durcit peu après la ponte et est coloré brun foncé, l'exochorion plus ou moins pigmenté et ornementé.

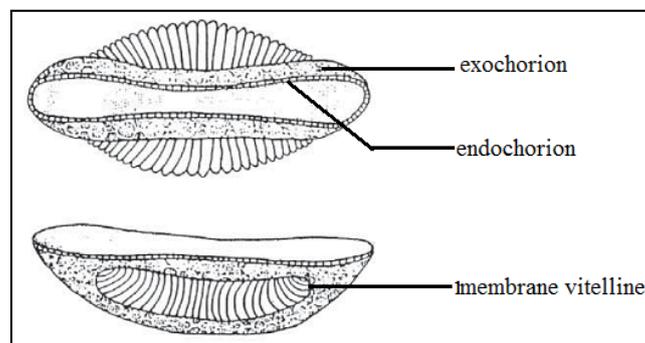


Figure 4 : Œuf d'*Anopheles* (Russell *et al.*, 1963)

Larve : Selon Holstein (1949), Vingt-quatre à 48 heures après la ponte, l'éclosion de l'œuf libère une larve de stade I qui reste en position horizontale à la surface de l'eau grâce à ses soies palmées dorsales. Elle mesure 1 à 2 millimètres. Elle est détritophage, se nourrit d'organismes de surface qu'elle attire vers la cavité buccale en provoquant un courant d'eau grâce aux vibrations des brosses buccales. Comme elle a une respiration aérienne et qu'elle est dépourvue de siphon contrairement aux autres Culicidae, la larve d'anophèle se maintient dans une position horizontale caractéristique. Elle subit trois mues (Rodhain et Perez, 1985) et passe par quatre stades L1, L2, L3 et L4 morphologiquement comparables. La mue qui survient après chaque stade permet l'accroissement de la taille de la larve. Au stade IV, la

larve d'anophèle mesure 12 à 15 millimètres. Sa morphologie présente trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen (**figure 5**).

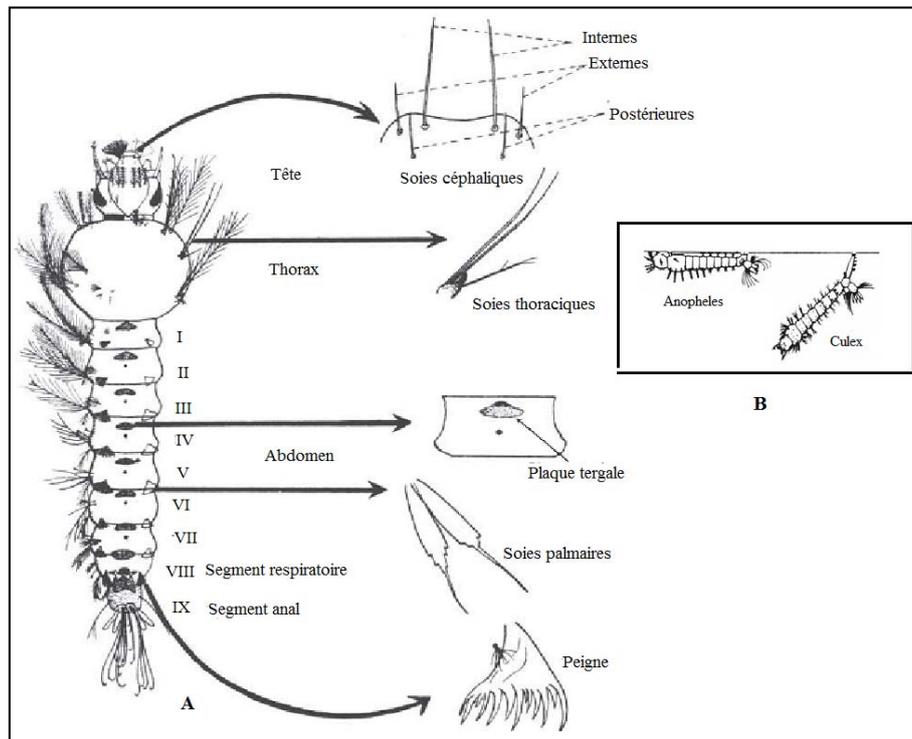


Figure 5 : Caractérisation morphologique des larves d'anophèle

A : Larve d'Anophèle, B : Position de la larve des Anophélineae à la surface de l'eau (Holstein 1949).

Nymphe : après une quatrième mue, la larve de stade IV se transforme en une nymphe dont la forme est semblable à une virgule. Elle est formée de deux parties : un céphalothorax globuleux et un abdomen recourbé. La nymphe ne se nourrit pas ; elle représente le dernier stade de transition au cours duquel l'insecte subit des profondes transformations morphologiques et physiologiques qui l'amènent au stade adulte (Rodhain et Perez, 1985).

I.3.2.1.2 Bio-écologie de l'adulte

- **Nutrition** : seules les femelles sont hématophages et par conséquent susceptibles de transmettre des maladies. Les mâles ne piquent pas et se nourrissent principalement de nectar de fleurs, de jus sucrés et exsudats végétaux. La prise d'aliments sucrés n'est pas limitée aux mâles puisque les femelles ont également besoin de sucre comme source d'énergie pour voler. Le repas de sang conditionne la ponte car les produits de la digestion sont essentiellement utilisés pour la production des œufs (Wanson, 1949). Les hôtes, pour la plupart des vertébrés homéothermes, sont choisis en fonction des préférences trophiques de chaque espèce d'*anopheles*. Certaines espèces sont strictes dans ce choix mais d'autres s'attaquent à un large

éventail d'hôtes. La transmission du paludisme n'est assurée que par les taxons qui ont une forte tendance à piquer l'homme et sont dits anthropophiles.

- **Dispersion** : le régime hématophage de la femelle d'anophèles lui impose la recherche d'un hôte qu'elle trouve à une distance plus ou moins éloignée de son gîte. Suivant la disponibilité d'un hôte, une femelle peut parcourir jusqu'à 3km (Costantini *et al.*, 1996, Gillies, 1961 ; Thomson *et al.*, 1995) pour trouver un repas lui convenant. Ce déplacement peut se faire de façon active par la puissance du vol propre de l'insecte mais le transport passif, par le vent ou les moyens de transport divers, peut permettre à l'insecte de parcourir de grandes distances (Gillies, 1961).

- **Comportement trophique-lieux de repos** (Hamon, 1963) : en général, les anophèles sont nocturnes et piquent toute la nuit avec un pic d'activité qui se situe entre 00 et 04 heures. L'étude du comportement trophique des anophèles est essentielle pour déterminer leurs rôles dans la transmission du *Plasmodium* et pour développer ou appliquer des méthodes de lutte adaptées. La préférence trophique (anthropophilie versus zoophilie) d'une espèce d'anophèle capable de transmettre le *Plasmodium* définit son statut de vecteur ; une espèce exclusivement zoophile ne présente pas de risque pour l'homme en termes de transmission.

Après le repas de sang qui peut être pris à l'intérieur des habitations (endophagie) ou à l'extérieur (exophagie), la femelle d'anophèle cherche un lieu de repos pour la maturation ovarienne. Les espèces endophiles sont celles qui demeurent dans les habitations après le repas de sang par opposition aux espèces exophiles qui s'abritent dans la nature ou dans les gîtes de repos extérieurs.

- **Cycle gonotrophique** : c'est un ensemble de processus physiologiques et comportementaux qui se déroulent chez l'anophèle femelle entre deux repas de sang successifs (figure 4). Après la ponte, la femelle cherche à prendre un nouveau repas sanguin afin d'effectuer une nouvelle oviposition : ce cycle est appelé cycle gonotrophique ou trophogonique (Beklemishev, 1940 *in* Detinova, 1962) dont les trois phases peuvent être résumées ainsi :

- la femelle à jeun recherche un hôte sur lequel prendre son repas de sang et le pique ;
- elle ingère le sang et le digère en situation de repos ; la maturation des follicules ovariens s'effectue ;

- la femelle gravide recherche un site d'oviposition. La durée du cycle gonotrophique est une donnée essentielle en épidémiologie du paludisme puisqu'elle rythme la fréquence des

contacts hôtes-vecteurs et donc le passage des parasites des uns aux l'autre. Les femelles qui n'ont jamais pondu sont dites "nullipares" tandis que celles ayant déjà effectué au moins une oviposition sont dites "pares".

- **Longévité** : elle conditionne les chances du moustique d'atteindre l'âge à partir duquel il est susceptible d'inoculer les sporozoïtes lors d'une piqûre. La durée moyenne de vie d'une femelle adulte d'anophèles varie selon les espèces et les conditions climatiques. Elle est de trois à quatre semaines pour *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* s.l. en Afrique tropicale mais peut atteindre six semaines en zone tempérée (Williams, 2012).

I.3.2.2 Cycle de développement des anophèles

Les anophèles sont des insectes holométaboles, c'est-à-dire des insectes chez qui le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal. Les larves et les adultes de ces insectes ont en général des morphologies et des modes de vie très différents dont le développement se déroule en quatre stades : œuf, larvaire et nymphal qui sont aquatiques et le stade adulte (ou imaginal) qui est aérien et ailé (figure 6).

- ❖ **Phase aquatique** : l'anophèle femelle pond isolément entre 40 et 150 œufs à la surface de l'eau. Ces œufs éclosent un à trois jours plus tard libérant chacun une larve de premier stade qui va subir successivement trois mues au terme desquelles elle devient une nymphe. La durée de la phase aquatique dépend de l'espèce, de la disponibilité du gîte en nourriture et de la température. Elle est en moyenne de 10 jours à 30°C pour *An. gambiae* s.l. (Carnevale *et al.*, 2009).

- ❖ **Phase aérienne** : de la nymphe émerge l'insecte imago (mâle ou femelle) qui, après durcissement de la cuticule (24 à 48h), s'envole. Lors de la rencontre entre mâles et femelles, ces derniers s'accouplent. Les femelles ne sont inséminées qu'une fois au cours de leur vie et stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque jusqu'à leur mort mais un second accouplement n'est pas exclu (Rodhain et Perez, 1985). L'activité de reproduction chez les anophèles est accompagnée de la recherche successive d'un repas sanguin, d'un site de repos et d'un site d'oviposition (Assako *et al.*, 2005). Le repas de sang est nécessaire à la maturation des follicules ovariens.

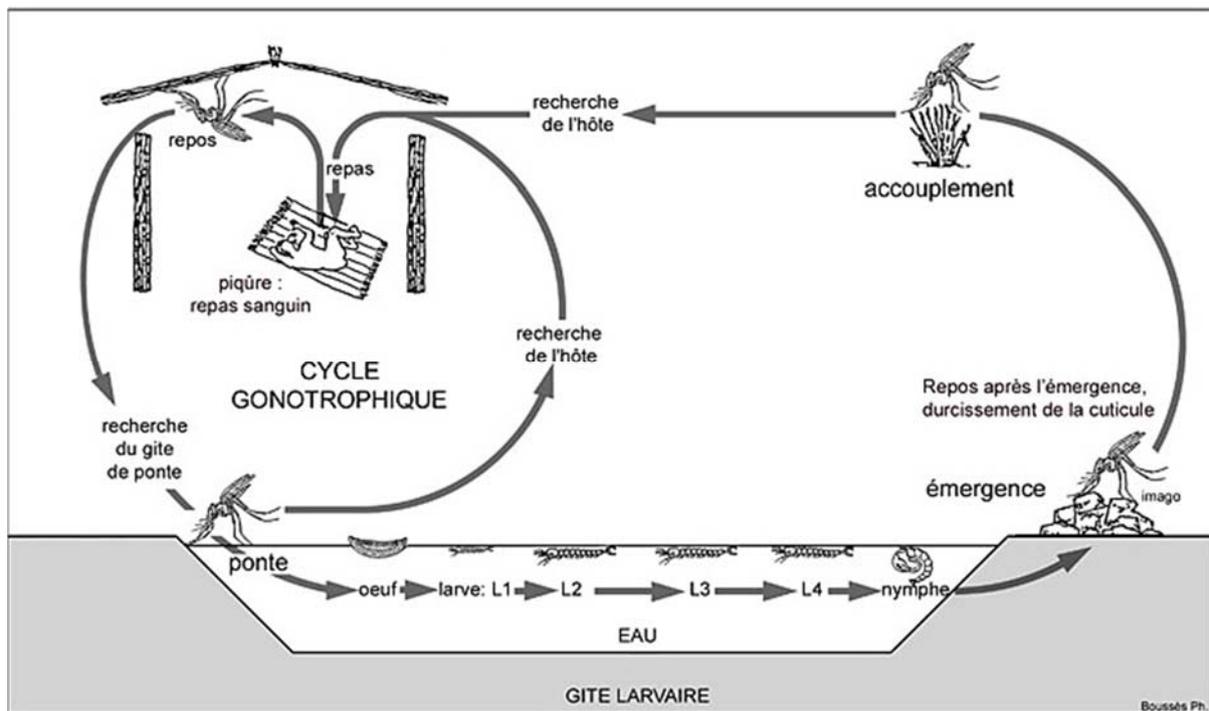


Figure 6 : Cycle biologique des anophèles (Carnevale *et al.* 2009).

L1-L2-L3-L4 : Larve stade 1, 2, 3 et 4

L3.3 Vecteurs de plasmodiums en Afrique

Le vecteur de plasmodiums sont très différents d'une région à une autre. Chaque espèce d'anophèle possède des caractéristiques de longévité, d'adaptation au parasite, de préférence trophique (homme ou animaux) ainsi que des choix des lieux de repos et de gîtes larvaires qui lui sont propres. Le contact homme-vecteur est la condition principale de transmission du parasite. Il dépend de l'écologie des moustiques et de celle de l'homme. Il est modulé directement par les activités humaines et indirectement par les modifications de l'environnement. Ces facteurs conditionnent la répartition géographique des anophèles dans le monde.

En Afrique intertropicale, on dénombre de nos jours 142 espèces d'anophèles parmi lesquelles environ 16 sont impliquées dans la transmission des plasmodiums à l'homme mais seulement cinq sont qualifiées d'importance majeure à savoir : *An. gambiae* s.l., *An. arabiensis* Patton, 1905, *An. funestus* s.s., *An. moucheti* Evans, 1925 et *An. nili* Theobald, 1904 (Hervy *et al.*, 1998). La répartition de ces vecteurs n'est pas uniforme sur le continent. *Anopheles gambiae* s.l. et *An. funestus* s.l. sont rencontrés un peu partout en Afrique, alors que *An. moucheti* et *An. nili* sont confinés dans la région forestière et péri-forestière et *An. arabiensis* en zone de savane (Gillies et De Meillon, 1968). Ces espèces appartiennent toutes

à des groupes ou complexes d'espèces morphologiquement proches, colonisant des environnements différents et ayant des comportements trophiques et de repos très contrastés (Fontenille *et al.*, 2003 ; Fontenille & Simard, 2004 ; Mouchet *et al.*, 2004). Cependant, d'autres espèces telles qu'*An. pharoensis* Theobald, 1901, *An. coustani* Laveran, 1900, *An. ovengensis* Awono-Ambene, 2004, *An. paludis* Theobald, 1900, *An. hancocki* Edwards, 1920, *An. marshalli* Theobald, 1903 et *An. ziemanni* Grünberg, 1902 sont considérées comme vecteurs d'importance locale et jouent un faible rôle dans l'épidémiologie du paludisme (Awono-Ambene *et al.*, 2004; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2005 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 ; Bigoga *et al.*, 2007 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2008 ; Atangana *et al.*, 2009 ; Tabue *et al.*, 2017).

I.3.4 Groupe *Anopheles funestus*

I.3.4.1 Organisation du groupe

A l'origine, le groupe *An. funestus* était composé de 9 espèces : *An. funestus* s.s (qui fait l'objet de notre étude), *An. parensis* Gillies, 1962, *An. aruni* Sobti, 1968, *An. vaneedeni* Gillies & Coetzee, 1987, *An. rivulorum* Leeson, 1935, *An. confusus* Evans & Leeson, 1935, *An. fuscivenosus* Leeson, 1930, *An. brucei* Service, 1960 et *An. leasoni* Evans, 1931 (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987). D'autres travaux de systématique réalisés à travers l'Afrique subsaharienne ont permis de décrire au sein de ce groupe quatre autres espèces notamment : *An. funestus-like* (Spillings *et al.*, 2009), *An. longipalpis* type A et type C (Dia *et al.*, 2013) et *An. rivulorum-like* (Cohuet *et al.*, 2003). Le groupe *An. funestus* compte aujourd'hui 13 espèces en Afrique, réparties dans 3 sous-groupes (tableau I) : Funestus, Rivulorum et Minimus (Dia *et al.*, 2013).

Tableau I : Caractéristiques écologiques des espèces du groupe *Anopheles funestus* en Afrique (Dia *et al.*, 2013)

Sous-groupe	Espèces	Distribution géographique	Préférence d'hôte	Rôle vecteur
Funestus	<i>An. funestus</i> s.s.	continentale	anthropophile	majeur
	<i>An. funestus-like</i>	locale	inconnu	inconnu
	<i>An. aruni</i>	locale	inconnu	inconnu
	<i>An. confusus</i>	régionale	zoophile	inconnu
	<i>An. parensis</i>	régionale	inconnu	mineur
	<i>An. vaneedeni</i>	locale	inconnu	inconnu
	<i>An. longipalpis type C</i>	locale	zoophile	inconnu
Minimus	<i>An. lesoni</i>	continentale	zoophile	mineur
	<i>An. longipalpis type A</i>	locale	zoophile	inconnu
Rivulorum	<i>An. rivulorum</i>	continentale	zoophile	mineur
	<i>An. rivulorum-like</i>	locale	inconnu	inconnu
	<i>An. brucei</i>	locale	inconnu	inconnu
	<i>An. fuscivenosus</i>	locale	inconnu	inconnu

I.3.4.2 Caractérisation morphologique du groupe *Anopheles funestus*

Les adultes d'*An. funestus* s.s. sont de taille petite ou moyenne, avec des ailes sombres présentant par endroit des taches pâles, blanchâtres ou jaunâtres. Le palpe est sombre et présente 3 anneaux pâles, les deux apicaux étant presque toujours beaucoup plus étroits que l'anneau sombre qui les sépare. Les pattes sont entièrement sombres (Annexe 1). La Costa présente 4 taches pâles, toujours plus réduites que les zones pâles qui les séparent. La frange alaire est sombre, avec des zones pâles en face de l'apex de toutes les veines, sauf la veine N°6 (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987).

Les larves ont une coloration sombre et sont reconnaissables à leurs plaques tergaux très développées, atteignant ou dépassant en largeur les bases des soies palmées et couvrant dans le sens de la hauteur au moins la moitié du segment. A la partie postérieure de la plaque tergale, on distingue trois points plus sombres, englobées dans la plaque principale (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987).

I.3.4.3 Répartition géographique des espèces du groupe *Anopheles funestus*

Parmi les espèces de ce groupe *Anopheles funestus*, *An. funestus* s.s., *An. lesoni* et *An. rivulorum* présentent la plus large distribution. Ils sont traditionnellement représentés dans toute l'Afrique subsaharienne (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987). La figure 5 illustre la répartition attendue de ces espèces (Cohuet *et al.*, 2003 ; Hackett *et al.*, 2000). *Anopheles funestus* s.s. se trouve pratiquement partout sur le continent (figure 5 A) ; étant principalement un moustique de la savane (Ayala *et al.*, 2009), ce vecteur du

plasmodium est présent dans de nombreuses autres régions, telles que celles de haute altitude soit 900 m à Madagascar (Andrianaivolambo *et al.* 2010), 1400 m en Afrique centrale (Tchuinkam *et al.*,2010) et jusqu'à 2000 m au Kenya (Okara *et al.*,2010)) et les zones boisées d'Afrique de l'Ouest et centrale (Ayala *et al.*, 2009 ; Oyewole *et al.*, 2007 ; Betsi *et al.*, 2010 ; Adja *et al.*, 2011 ; Tanga *et al.* 2010). En outre, il peut habiter des conditions extrêmement sèches au Sahel, lorsque des lieux de reproduction appropriés sont disponibles tels que les zones d'irrigation (Konaté *et al.*, 2001 ; Labbo *et al.*, 2004). Par ailleurs, *An. funestus* s.s. est rare ou complètement absent le long de la côte (Ayala *et al.*, 2009). *Anopheles funestus* s.s. a disparu de plusieurs parties de l'Afrique après l'installation des conditions climatiques défavorables, c'est-à-dire des sécheresses récurrentes et/ou la mise en place des programmes de lutte antivectorielle (Mouchet *et al.*, 1996). Malheureusement, ce moustique est progressivement réapparu une fois que les mesures de lutte ont cessé ou que des conditions environnementales appropriées sont réapparues (Elissa *et al.*, 2005 ; Fontenille *et al.* 1988 ; Hargreaves *et al.* 2000 ; Dia *et al.*, 2010), ce qui a mis en évidence son extraordinaire plasticité environnementale et sa capacité de dispersion.

Les autres espèces de ce groupe présentent une distribution définie localement (figure 7 B, C). *Anopheles parensis*, *An. confusus* et *An. aruni* sont localisés en Afrique de l'Est (Muturi *et al.*, 2009 ; Kamau *et al.*, 2003). En Afrique de l'ouest et centrale, on trouve *An. rivolorum-like* et *An. brucei* (Hackett *et al.*, 2000 ; Cohuet *et al.*, 2003). Enfin, en Afrique australe, on retrouve *An. vaneedeni*, *An. parensis*, *An. fuscivenosus*, *An. funestus-like* et *An. longipalpis types A* (Afrique du Sud) et *C* (Zambie) (Gillies *et al.* 1987 ; Spillings *et al.*, 2009 ; Koekemoer *et al.*, 2009). Il est certain que ces données sont fondées sur les efforts d'échantillonnage et on pourrait s'attendre à des changements dans le nombre d'espèces composant ce groupe ainsi que dans leur répartition.

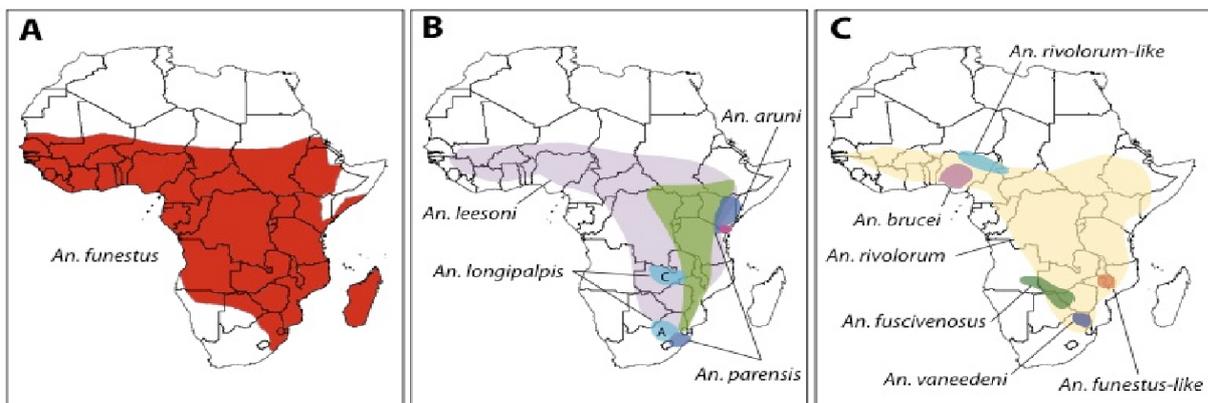


Figure 7 : Répartition géographique des 13 espèces du groupe *Anopheles funestus* en Afrique.

A : *An. funestus* s.s., **B** : *An. leesonii*, *An. longipalpis* (type A et C), *An. aruni* et *An. parensis*, **C** : *An. rivolorum*, *An. rivolorum-like*, *An. funestus-like*, *An. vaneedeni*, *An. fuscivenosus* et *An. brucei* (Dia *et al.*, 2013).

I.3.4.4 Biologie des espèces du groupe *Anopheles funestus*

I.3.4.4.1 Lieu de reproduction

Anopheles funestus s.s. se reproduit dans des étendues d'eau naturelles/artificielles permanentes et semi-permanentes avec une végétation flottante ou émergente. Cependant, dans les zones où les deux types de végétation sont présents, ce moustique préfère la végétation flottante (Gillies *et al.*, 1968). La reproduction naturelle se produit au bord des marais, dans les parties herbeuses des rivières, des ruisseaux, des sillons, des fossés, des lacs et des étangs. La présence de végétation est cruciale pour la reproduction des moustiques (figure 8), principalement parce que leurs stades aquatiques ont une nette préférence pour les habitats ombragés et peuvent à peine survivre dans les points d'eau directement exposés à la lumière du soleil. Les possibilités de reproduction artificielle comprennent les rizières, les puits et les récipients d'eau domestique (Gillies *et al.*, 1968). Les principaux facteurs limitant leur développement sont la salinité, les températures extrêmes et parfois les fortes pluies.

Pour les autres espèces du groupe *Anopheles funestus*, la biologie des stades aquatiques est mal comprise. Les larves d'*An. lesoni*, d'*An. rivulorum* et d'*An. vaneedeni* sont souvent trouvées en sympatrie avec celles d'*An. funestus* s.s.. Celles d'*An. parensis* se développent dans des marécages et des étangs permanents entre les roseaux et la végétation émergente. Cependant, *An. parensis* est une espèce d'eau stagnante qui n'a jamais été trouvée dans les rivières. *Anopheles aruni* se reproduit dans les étangs, les rizières ou les fossés près des habitations humaines. Des larves d'*An. brucei* ont été trouvées dans des lits de rivières boisées. *Anopheles confusus* se reproduit dans la végétation des bords des rivières à débit lent. *Anopheles longipalpis* préfère l'eau relativement calme avec une végétation aquatique abondante sur les rives des rivières à débit rapide (Gillies *et al.*, 1968). Dans de nombreuses occasions, les lieux de reproduction sont semblables à ceux d'*An. funestus* s.s.. Malheureusement, il n'existe aucune information sur les lieux de reproduction d'*An. fuscivenosus*, d'*An. rivulorum-like* et d'*An. funestus-like* (Gillies *et al.*, 1987 ; Gillies *et al.*, 1968 ; Koekemoer *et al.*, 2009 ; Cohuet *et al.*, 2004).



Figure 8 : Gîtes typiques d'*Anopheles funestus* s.l., **A, B** : Lac et **C** : Etang de pisciculture (Photo : Kopya, 2016).

I.3.4.4.2 Préférence trophique, lieu de repos et rôle vecteur

Malgré les similitudes morphologiques qui existent entre les membres du groupe *Anopheles funestus*, ces espèces présentent des différences de comportement extrêmes qui affectent leurs capacités vectorielles. À ce jour, toutes les études de transmission des plasmodiums ont montré qu'*An. funestus* s.s. est le principal vecteur de paludisme dans le groupe, avec des taux d'infection allant jusqu'à 11 % (Shiff *et al.*, 2005) et exceptionnellement 50 % (Costantini *et al.*, 1999). *Anopheles funestus* s.s. a tendance à piquer tard dans la nuit, généralement entre minuit et les premières heures du matin (Oyewole *et al.*, 2007 et 2006 ; Robert *et al.*, 2006). C'est aussi le membre le plus endophile et anthropophile du groupe *Anopheles funestus* (Awolola *et al.*, 2005 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006; Dabiré *et al.*, 2007). Dans les zones de savanes où ses sites de reproduction dépendent de la pluie, *An. funestus* s.s. précède son homologue *An. gambiae* s.l., prolongeant ainsi la transmission du paludisme du début de la saison des pluies à la première partie de la saison sèche (Fontenille *et al.*, 1997 ; Dia *et al.*, 2003).

Les autres espèces du groupe *Anopheles funestus* sont principalement zoophiles mais peuvent parfois se nourrir sur les humains (Gillies *et al.*, 1968). *Anopheles rivulorum* a été incriminé comme vecteur du paludisme en Tanzanie (Wilkes *et al.*, 1996). En effet, cette espèce a été trouvée naturellement infectée par *P. falciparum*. Cependant, elle est principalement zoophile (77% d'hôtes animaux) et montre une longévité plus faible par rapport à *An. funestus* s.s. Des spécimens infectés d'*An. rivulorum* ont également été observés sur la côte tanzanienne par Temu *et al.* (2007), qui ont également trouvé des spécimens d'*An. leesoni* et d'*An. parensis* positifs à *P. falciparum*, suggérant un rôle secondaire de ces moustiques dans l'épidémiologie du paludisme. Des spécimens d'*An. parensis* infectés par *P. falciparum* ont aussi été échantillonnés au cours d'une étude entomologique en Afrique du Sud. *Anopheles vaneedeni* se nourrit rarement sur des humains à l'extérieur (1,22%). Bien

qu'expérimentalement infecté par *P. falciparum* en laboratoire, il n'a jamais été trouvé impliqué dans la transmission de parasites du paludisme en conditions naturelles (De Meillon, 1977). *Anopheles longipalpis* n'a jamais été impliqué dans la transmission du *Plasmodium* (Gillies *et al.*, 1987 ; Gillies *et al.*, 1968 ; Kent *et al.* 2006). En Afrique de l'Est, précisément en Tanzanie et en Éthiopie, différents auteurs ont signalé q'*An. longipalpis* provenant de collections intérieures et extérieures se nourrit sur l'homme (Adugna *et al.*, 1996 ; Smith, 1961). Récemment, Kent *et al.* (2006) ont rapporté en Zambie que même lorsqu'on le trouve en grand nombre reposant à l'intérieur des habitations avec *An. funestus* s.s., *An. longipalpis* reste principalement zoophile.

I.3.4.4.2 Résistance d'*Anopheles funestus* s.s. aux insecticides

En raison de son comportement hautement anthropophile et endophile, *An. funestus* s.s. a été une cible «facile» dans les programmes de lutte contre le paludisme, c'est-à-dire dans l'utilisation des matériaux imprégnés d'insecticides ou dans la pulvérisation intradomiciliaire. Cette espèce a développé une résistance aux insecticides dans de nombreuses régions du continent africain (Brooke *et al.*, 2001 ; Casimiro *et al.*, 2006 ; Cuamba *et al.*, 2010 ; Morgan *et al.*, 2010 ; Riveron *et al.*, 2015 ; Djouaka *et al.*, 2016). À ce jour, *An. funestus* s.s. s'est montré résistant aux pyréthrinoïdes, à la dieldrine, au malathion, aux carbamates et au DDT. Les premiers rapports documentés sur la résistance aux insecticides chez ce vecteur du paludisme provenaient d'Afrique de l'Ouest (Mali, Ghana, Bénin), d'Afrique Centrale (Cameroun) et d'Afrique de l'Est (Kenya), suite à la mise en place de programmes de lutte antivectorielle (Hamon *et al.*, 1968 ; Brown, 1986 ; Touré, 1982 ; Service, 1960). Des études récentes ont montré que la résistance à la dieldrine est encore élevée dans les populations d'*An. funestus* s.s. du Burkina Faso, malgré le fait que cet insecticide n'est plus utilisé en santé publique (Dabiré *et al.*, 2007). En ce qui concerne les pyréthrinoïdes, les populations résistantes d'*An. funestus* s.s. ont été détectées pour la première fois en Afrique australe, ce qui a été à l'origine des flambées de paludisme à la fin des années 1990 (Hargreaves *et al.*, 2000 ; Casimiro *et al.*, 2006).

Des populations d'*An. funestus* s.s. résistantes aux pyréthrinoïdes et aux carbamates ont également été signalées au Ghana, en Afrique de l'Ouest (Coetzee *et al.*, 2006). Dans l'ensemble, il est maintenant clair que les populations d'*An. funestus* s.s. en Afrique montrent une résistance à au moins 4 classes d'insecticides recommandées par l'OMS pour la lutte antivectorielle.

Au cours de la dernière décennie, des efforts ont été faits pour détecter les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux insecticides chez *An. funestus* s.s.. Les mécanismes mis en évidence impliquent la détoxification des insecticides par une ou plusieurs voies métaboliques médiées par la glutathion S-transférase (GST), les monooxygénases et/ou les estérases (Brooke *et al.*, 2001 ; Okoye *et al.*, 2008 ; Wondji *et al.*, 2009 ; Matambo *et al.*, 2010). Aucune preuve de la présence d'une mutation *Kdr/L1014F* ou de la mutation *Ace-1/G119S* n'a été donnée chez *An. funestus* s.s. (Cuamba *et al.*, 2010 ; Morgan *et al.*, 2010 ; Okoye *et al.*, 2008 ; Wondji *et al.*, 2009). Les progrès réalisés récemment ont conduit à la détection de marqueurs à base d'ADN pour le gène de la glutathion S-transférase Epsilon 2 (*GSTe2*) à travers un seul changement d'acide aminé (L119F) selon Riveron *et al.*, (2014). Ce nouvel outil offre désormais l'occasion d'étudier l'impact de la résistance métabolique médiée par la *GST* sur la compétence des vecteurs du paludisme. Chez *An. funestus* s.s., les mécanismes de résistance détectés jusqu'à présent au Cameroun comprennent la mutation L119F-*GSTe2* qui confère une résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes et la mutation 296S-*RDL* qui induit une résistance à la dieldrine. L'implication des monooxygénases (cytochrome P450) dans la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes est suspectée (Wondji *et al.*, 2011 ; Menze *et al.*, 2016).

I.3.5 Complexe *Anopheles gambiae*

I.3.5.1 Biologie et répartition géographique des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

Le terme *Anopheles gambiae* regroupe un complexe d'espèces (Davidson, 1962) semblables morphologiquement mais qui se distinguent tant par leurs éthologies que par leurs structure génétique. Le complexe *Anopheles gambiae* compte neuf espèces jumelles dont l'importance épidémiologique est très variable ; *An. gambiae* Giles, 1902, *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 et *An. arabiensis* Patton, 1905 sont les trois espèces les plus anthropophiles et les meilleurs vecteurs de *Plasmodium*.

Anopheles gambiae s.s. (ou *Anopheles gambiae*) et *An. coluzzii* sont les vecteurs des zones de forêts mais ils pénètrent assez profondément dans les zones de savanes (figure 9). Leurs larves sont associées aux collections d'eaux douces éventuellement temporaires, peu profondes, ensoleillées et avec peu ou pas de végétation (empreintes de pas et de roues, flaques, rizières, etc...) comme le montre la figure 10 ; leurs adultes sont à la fois anthropophiles et zoophiles mais essentiellement endophages et endophiles. Toutefois, en

fonction des conditions environnementales, ils peuvent devenir plus zoophiles, exophages et exophiles (Robert *et al.*, 1989).

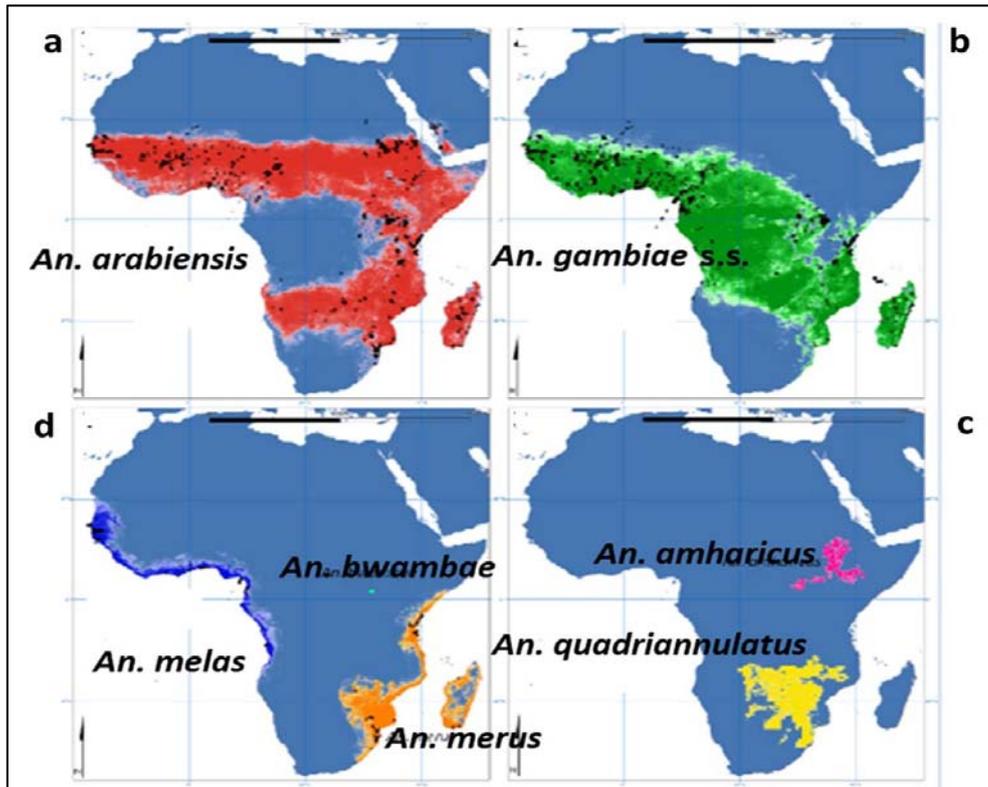


Figure 9 : Carte de répartition des espèces du complexe *An. gambiae* s.l. sur le continent africain ;

Cette figure ne présente pas la distribution d'*An. coluzzii* d'après Lee *et al.* (2013).

Anopheles arabiensis est présent dans les zones de savanes sèches, sur les plateaux d'Afrique méridionale, et pénètre assez loin dans les zones de savanes humides où il est sympatrique à *An. gambiae* s.s. (figure 9). Ses larves sont associées aux collections d'eaux douces éventuellement temporaires, peu profondes, ensoleillées et avec peu ou pas de végétation, aux empreintes de pas et de roues, aux flaques et aux rizières, etc...(figure 10) ; ses adultes sont à la fois anthropophiles et zoophiles (Robert *et al.*, 1989). En fonction aussi des conditions environnementales, ils peuvent devenir plus zoophiles, exophages et exophiles (Robert *et al.*, 1989).

Anopheles melas Theobald, 1903 et *An. merus* Doenitz, 1902 (figure 9) sont deux espèces d'eaux saumâtres localisées respectivement sur la côte Ouest et la côte Est de l'Afrique respectivement. Moins anthropophiles que les précédentes, ce sont de médiocres vecteurs de *Plasmodium* (Akogbeto, 2000).

Anopheles quadriannulatus Theobald 1911 et *An. amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013 (figure 9) sont limités à quelques pays d'Afrique de l'Est et méridionale. Ils sont présents dans les mêmes gîtes larvaires qu'*An. gambiae* s.s., *An. coluzzii* et *An. arabiensis*. Leurs femelles étant strictement zoophiles, ils n'ont pas de rôle dans la transmission du paludisme (Mouchet *et al.*, 2004).

Anopheles bwambae White, 1985 est localisé dans une zone forestière d'Ouganda (figure 9). Il se développe uniquement dans de l'eau minéralisée des sources chaudes et a un rôle anecdotique (Mouchet *et al.*, 2004).

Anopheles comorensis Brunhes a été décrit par Le Goff & Geoffroy et nommé par Brunhes *et al.* (1997) sur la base de la morphologie d'un seul spécimen des îles de l'Océan Indien aux Comores dans le canal mozambicain. Jusqu'à ce qu'une confirmation génétique adéquate de la distinction entre les espèces soit faite, le statut d'*An. comorensis* et son association avec le complexe *Anopheles gambiae* demeurent discutables.

Anopheles gambiae s.s., forme moléculaire M, a été nommé *An. coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 tandis que la forme moléculaire S a conservé le nom typique *An. gambiae* s.s. Giles, 1902. L'espèce éthiopienne *An. quadrianulatus* B a été nommée *An. amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013 (Coetzee *et al.*, 2013).

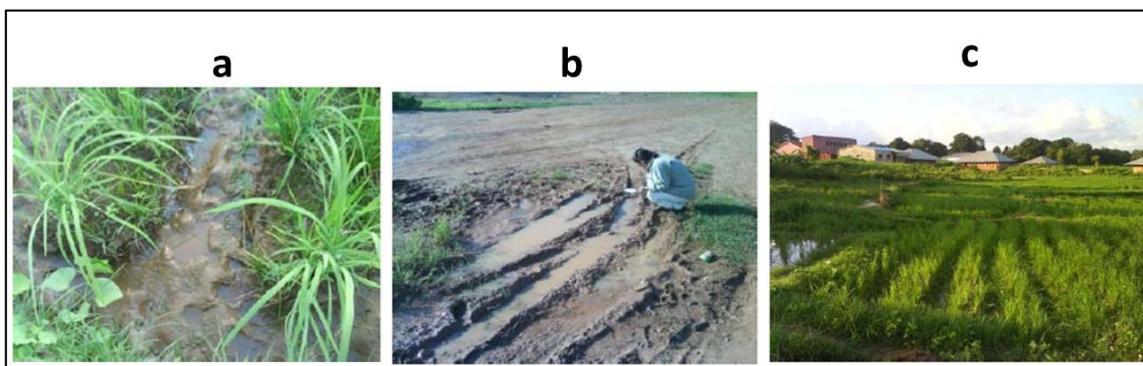


Figure 10: Types de gîtes d'*Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles coluzzii* et *Anopheles arabiensis* (source : cha-manuel, 2012).

a : petite flaque d'eau temporaire ; **b :** empreintes de pneu temporaire et **c :** rizière semi-permanente.

I.3.5.2 Caractérisation morphologique du complexe *Anopheles gambiae*

Bien que leurs caractéristiques écologiques diffèrent notablement, les espèces du complexe *Anopheles gambiae* sont pratiquement identiques morphologiquement. Leur différenciation est basée sur la morphologie des chromosomes polyténiques (Coluzzii *et al.*, 1979), sur l'utilisation de locus discriminants par électrophorèse des isoenzymes (Mahon *et*

al., 1976 ; Miles, 1978) et, plus récemment, sur des tests diagnostiques par PCR (Scott *et al.*, 1993).

Les adultes de ce complexe sont de taille moyenne, avec des ailes formées d'écaillés blanc crème ou jaunâtres présentant par endroits des taches pâles, blanchâtres ou jaunâtres. La nervure I montre une interruption pâle dans la troisième aire sombre (Annexe 1). Le palpe est mince et pourvu de trois bandes pâles. La bande apicale est large et couvre la totalité du V^e article et l'apex du IV^e ; la bande médiane est large de moins de la moitié de la précédente et englobe l'extrême base du IV^e article et l'apex du III^e ; la bande basale a les mêmes dimensions que la médiane et couvre l'apex du II^e article (Annexe 1). Les fémurs, tibias et I^{er} article du tarse sont mouchetés d'écaillés crème ou jaunâtres et forment des taches plus ou moins nombreuses comme le montre l'Annexe 1 (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987).

Longue de 5 à 6 mm, la larve a une coloration sujette à de grandes variations. Généralement, les jeunes larves sont noires et présentent une collerette claire, presque blanche et très nette, alors que les larves âgées sont brun clair ou grisâtres, sans ornementation apparente (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987).

I.3.5.3 Résistance d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides

La résistance d'*An. gambiae* s.l. est apparue pour la première fois en Afrique de l'Ouest, au Nord du Nigeria en 1954, quelques mois seulement après les premiers traitements à la dieldrine. Limitée à quelques localités au départ, elle s'est rapidement étendue à l'ensemble de la zone traitée et aux zones voisines non traitées (Armstrong *et al.*, 1958). Si dans certains cas, les traitements effectués en santé publique semblent à l'origine de cette résistance à la dieldrine, la principale cause de son extension résulte, de toute évidence, de l'emploi massif des cyclodiènes et du lindane en agriculture pour le traitement du coton, du café et du cacao (Mouchet, 1988).

Contrairement à la dieldrine, la résistance d'*An. gambiae* s.l. au DDT a été plus lente à apparaître et surtout beaucoup plus localisée. Le premier cas a été détecté en 1967 à Bobo-Dioulasso, soit sept ans après l'arrêt complet de l'usage des insecticides en santé publique (Hamon *et al.*, 1968). Son apparition a coïncidé avec l'introduction massive d'une formulation à base de DDT et d'endrine pour la protection du coton. Par la suite, la résistance au DDT a été décelée en Côte d'Ivoire, au Nigeria et dans plusieurs localités du Mali (Coz *et al.*, 1968 ; Touré, 1982 ; 1984). Elle est rapportée par l'OMS (1992) principalement en Afrique de

l'Ouest et dans cinq autres pays, dont deux où il s'agit probablement d'*An. arabiensis* (Tanzanie, Afrique du Sud).

Au Cameroun, les enquêtes sur la sensibilité d'*An. gambiae* s.l. aux insecticides ont été effectuées depuis 1997. Quatre composés ont été régulièrement testés : le DDT, la perméthrine, la deltaméthrine et la lambdacyhalothrine (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Entre 1998 et 2000, dans plus de 85 % des localités, un taux de sensibilité élevé (taux de mortalité de 90 %) d'*An. gambiae* s.l. à la deltaméthrine et quelques cas de résistance ont été signalés pour le DDT et la perméthrine à Yaoundé, Douala et Mbalmayo, où *An. gambiae* s.s. et *An. coluzzii* sont les espèces les plus répandues (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). La résistance à la Dieldrine a été détectée dans toutes les localités. La période qui court entre 2006 et 2010 a vu une augmentation significative du niveau de résistance des populations d'*An. gambiae* s.l. au DDT et aux pyréthriinoïdes. Une augmentation du niveau de résistance d'*An. gambiae* s.l. aux carbamates (carbosulfan et bendiocarb) a également été enregistrée (Bigoga *et al.*, 2007 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2016). De 2011 à 2017 et dans presque toutes les localités du pays, des niveaux élevés de résistance des populations d'*An. gambiae* s.l. au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine ont été relevés (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Parallèlement, on observait continuellement une forte sensibilité de ces moustiques aux organophosphorés dans toutes les localités. Bien que la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes ait émergé assez rapidement dans les hautes terres de l'Ouest, où l'agriculture intensive est pratiquée par la population (Etang *et al.*, 2006 ; Nwane *et al.*, 2009), une augmentation graduelle de la tolérance des populations d'*An. gambiae* s.l. au DDT, à la perméthrine et à la deltaméthrine a été enregistrée dans les autres milieux géographiques, ce qui suggère une sélection accrue d'insecticides. La résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes chez *An. gambiae* s.l. est principalement associée à la présence du gène *kdr* et à la surexpression des gènes de détoxification tels que *cyp6m2*, *cyp6z3* et *cyp6p3* (Tene *et al.*, 2013 ; Bamou *et al.*, 2019). De 1998 à 2017, une augmentation graduelle des fréquences des allèles *kdr* a été notée dans presque tous les contextes. Les deux allèles *kdr*-1014S de l'est et 1014F d'Afrique de l'ouest ont été retrouvés, le gène *kdr* d'Afrique de l'ouest (L1014F) étant le plus répandu. Bien qu'*An. arabiensis* ait rarement possédé l'allèle *kdr* (Ndjemai *et al.*, 2008 ; Etang *et al.*, 2009 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015 ; 2017) entre 2000 et 2010, des études plus récentes indiquent une forte prévalence de l'allèle *kdr*-1014F chez cette espèce (Knox *et al.*, 2014). La résistance au bendiocarb carbamate a été attribuée à la surexpression de plusieurs gènes du cytochrome P450 (Antonio *et al.*, 2016). Tout récemment, la mutation

G119S a été détectée pour la première fois dans les populations d'*An. gambiae* s.l. du Cameroun (Bamou *et al.*, 2019).

I.4 Quelques paramètres de mesure de la transmission du *Plasmodium* moustique-homme

Le niveau de transmission du *Plasmodium* dans une population peut être mesuré par un ensemble d'indicateurs. Ces derniers sont essentiels pour la comparaison de régions écologiquement différentes ainsi que pour l'évaluation de l'efficacité des mesures de lutte. Sur chacun des maillons de la chaîne épidémiologique (anophèle-homme) interviennent divers facteurs à savoir : chez l'anophèle le taux d'anthropophilie, l'indice sporozoïtique et la compétence vectorielle, chez l'homme l'indice plasmodique, l'indice gamétocytaire et la densité parasitaire.

I.5 Déterminants de la transmission du *Plasmodium* chez le vecteur et facteurs contrôlant le déroulement du cycle sporogonique

Le développement sexué du *Plasmodium* est un processus dynamique qui fait intervenir plusieurs composantes de différentes natures. Celles-ci concernent à la fois le parasite, l'hôte vertébré et le moustique vecteur. Il est évident que le parasite, en passant de l'homme au moustique et vice-versa, subit des modifications morphologiques et des remaniements structuraux importants du fait du changement de milieu.

Au cours des différentes étapes du cycle sporogonique, lors du passage des parasites à travers les différents épithéliums du moustique, des pertes conséquentes de certains individus s'opèrent. De nombreux facteurs influent sur le rendement de la transmission à savoir : la charge en gamétocytes, la sex-ratio, les facteurs immuns de l'homme mais aussi le système immunitaire du moustique, la flore intestinale ou encore les enzymes digestives (Pumpuni *et al.*, 1996 ; Christophides *et al.*, 2004 ; Levashina 2004 ; Dong *et al.*, 2009). Ces processus sont susceptibles à la fois de favoriser ou d'empêcher le développement parasitaire.

I.5.1 Facteurs liés au parasite

Les parasites à transmission vectorielle sont caractérisés par des stratégies adaptatives leur permettant de préserver efficacement la chaîne de transmission d'un hôte à l'autre. Le parasite se développe alors à travers plusieurs stades successifs, établissant un cycle complet. Au cours de ce processus, les pathogènes exploitent souvent leurs propres structures moléculaires et celles de l'environnement de l'hôte (Shahabuddin *et al.*, 1993). L'un des défis

de la lutte contre le paludisme est aujourd'hui d'identifier ces mécanismes et de rendre impossible la survie ou la transmission du parasite.

Dans le cas de *P. falciparum*, une modulation environnementale et une souffrance parasitaire peuvent entraîner, chez l'homme infecté, l'apparition des gamétocytes, stades permettant le passage le moustique dans lequel ils suivent un cycle sexué. Ce dernier cycle est un maillon essentiel de la chaîne de transmission. Son étude approfondie est capitale pour déterminer les différentes phases du développement parasitaire, les modifications structurales et moléculaires (Sinden, 1975), les mécanismes effecteurs contre le parasite (Kaslow, 1993), afin de cibler d'éventuelles interventions pour interrompre le cycle sporogonique.

Dans l'estomac du moustique, le parasite élabore plusieurs modifications morphologiques et antigéniques ; l'étude détaillée de ces changements pourrait aider à identifier les molécules cibles et les mécanismes de blocage de la transmission. De plus au cours de son développement chez le moustique, le parasite doit faire face à un environnement très différent de celui de l'homme et doit franchir des barrières physiques (membrane péri-trophique et stomacale). La variation de la composition chimique de ces structures suggère que le parasite élabore nécessairement des dispositifs lui permettant de se développer malgré ces obstacles.

❖ Gamétogénèse

Chez les plasmodiums, la gamétogénèse implique l'activation simultanée de diverses séquences d'événements cellulaires apparemment indépendants (Aikawa et al., 1984) ; il s'agit : de la rupture de la vacuole parasitophore et de la membrane érythrocytaire suivie de la libération du parasite d'une part et, d'autre part, de la réorganisation des structures cytoplasmiques impliquées dans la formation des microgamètes. Les dernières séquences d'événements comportent un processus dynamique que l'on nomme classiquement ex-flagellation. L'activation des gamétocytes femelles se résume à une simple modification morphologique qui aboutit à la formation d'un volumineux macrogamète d'aspect globulaire. Ces processus d'activation et la fécondation subséquente ont été largement décrits par des observations en microscopie optique et électronique et (Sinden, 1983 ; Carter & Graves, 1988).

La gamétogénèse est modulée à plusieurs niveaux de régulation. Chez plusieurs espèces de *Plasmodium*, les gamétocytes issus de l'hôte vertébré s'activent spontanément une fois parvenus chez le moustique. Ce processus serait contrôlé par deux principaux facteurs : la

température et le pH du milieu (Carter & Nijhout, 1977). De plus, des facteurs liés au moustique lui-même sont probablement essentiels à la formation des gamètes au cours de la transmission naturelle du parasite. Un certain nombre de facteurs ont été identifiés pour expliquer le rendement du cycle sporogonique :

- **Densité gaméocytaire.** Il est établi d'une part que seuls les gaméocytes matures sont capables d'infecter le moustique et, d'autre part que la densité gaméocytaire dans le repas de sang est un facteur clé pour le succès de l'infection du moustique. L'intensité de l'infection dépend de la gaméocythémie ; plus la charge en gaméocytes est élevée, plus le nombre d'oocystes par moustique infecté est important (Boudin *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 2007 ; Mendes *et al.*, 2011 ; Bousema *et al.*, 2012a). En fait l'implication de la densité gaméocytaire dans l'infectivité est complexe et varie selon des seuils (Paul *et al.*, 2007 ; Churcher *et al.*, 2013). *Plasmodium falciparum* est aussi capable d'infecter les moustiques à des densités gaméocytaires inférieures au seuil de détection par la microscopie (Schneider *et al.*, 2007 ; Bousema *et al.*, 2012a).

- **Sex-ratio.** La population de gaméocytes est caractérisée par une importante hétérogénéité liée au rapport entre les sexes des parasites. En effet, la sex-ratio présente une prédominance de femelles ; ce fait qui compense biologiquement la production de 8 microgamètes à partir d'un gaméocyte mâle. Il a été montré que le *Plasmodium* est capable d'ajuster sa sex-ratio pour optimiser sa transmission (Paul *et al.*, 2000 ; Reece *et al.*, 2008). Ainsi, cette sex-ratio varie en fonction de l'état hématologique de l'hôte vertébré ; elle croît avec l'anémie (Sowunmi *et al.*, 2009 ; Gbotosho *et al.*, 2011 ; Paul *et al.*, 2000).

I.5.2 Facteurs liés au moustique

Tous les moustiques ne sont pas aptes à transmettre le *Plasmodium*. Certaines espèces sont biologiquement incompetentes à développer une espèce plasmodiale donnée. Lors de son développement chez le moustique, le *Plasmodium* se heurte à un certain nombre de barrières qui impliquent des composantes physiques, cellulaires et humorales qui le protègent des nombreux microorganismes et agents pathogènes auxquels il est confronté. Il faut noter que les moustiques ont un système immunitaire inné, efficace, leur permettant de combattre les infections bactériennes et parasitaires auxquelles ils sont exposés (Dimopoulos *et al.*, 1997 ; Richman *et al.*, 1997). Celui-ci joue un rôle important dans la régulation des infections par des *Plasmodium*. Nos connaissances sur les mécanismes de la réponse immunitaire chez le moustique viennent du modèle drosophile qui a été largement étudié (Hoffmann, 1995 ; 2003 ; Ferrandon *et al.*, 2007).

La cuticule riche en chitine représente l'une des composantes physiques qui recouvrent la membrane péritrophique synthétisée dans la lumière intestinale des insectes hématophages après un repas de sang. Les ookinètes de *Plasmodium* doivent traverser cette membrane pour poursuivre leur développement (Billingsley and Lehane, 1996). Une fois parvenu dans l'intestin du moustique, le parasite est exposé aux enzymes digestives qui sont secrétées après le repas de sang et qui peuvent affecter la viabilité des ookinètes (Gass and Yeates, 1979). Plusieurs autres facteurs tels que l'âge du moustique (Carnevale, comm.pers.), le choix de l'hôte, la vitesse de digestion du sang (Ponnudurai *et al.*, 1989b) et la quantité de sang absorbée sont susceptibles d'influencer la transmission du *Plasmodium* (Lyimo & Koella, 1992). Le dernier facteur sus-cité dépend de l'âge du moustique, de sa taille et de la source d'alimentation. Lyimo et Koella (1992) ont montré qu'il existe une relation entre la taille du moustique, la quantité de sang (donc la quantité de gamétocytes) absorbée, et l'infectivité du moustique. Finalement de très nombreux facteurs sont susceptibles de jouer sur l'aptitude du moustique à transmettre le parasite ; ces facteurs permettent de définir la notion de « compétence vectorielle » du moustique.

I.5.3 Facteurs liés à l'environnement

Dans leurs habitats, les moustiques sont confrontés à différents facteurs biotiques et abiotiques incluant les prédateurs, les variations de température et les polluants chimiques tels que les pesticides ou les nitrates. Ces facteurs peuvent affecter la survie et la fitness des stades aquatiques et ultérieurement la reproduction, la fécondité des adultes, ainsi que leur compétence vectorielle.

❖ **Température** : Chez les anophèles, les plasmodiums se développent à des intervalles de températures précis. Par exemple, chez *An. gambiae* s.l., *P. falciparum* se développe dans un intervalle de températures compris entre 16°C et 35°C (Okech *et al.*, 2004). Cependant, des expériences menées au laboratoire ont montré que chez *An. stephensi*, le temps de développement des ookinètes de *P. falciparum* est allongé lorsque la température diminue de 27 à 21°C (Noden *et al.*, 1995). Les températures situées au-dessus de 30°C réduisent fortement les taux d'infection du moustique (Noden *et al.*, 1995).

❖ **Pollution** : La pollution pourrait être un facteur qui module la compétence vectorielle des anophèles femelles adultes ; celles provenant des larves résistantes aux composés organiques tels que les nitrates pourraient ainsi devenir moins sensibles au système de nitration (NOS) surexprimé chez le moustique à la suite d'un repas de sang, ce qui augmenterait la

susceptibilité face au développement de *Plasmodium* (Peterson *et al.*, 2007 ; Oliveira *et al.*, 2012).

I.6 Méthodes de lutte contre le paludisme

I.6.1 Lutte antiparasitaire

I.6.1.1 Traitement médicamenteux

Le traitement médicamenteux repose sur l'utilisation des substances antipaludiques actives contre les différents stades du parasite chez l'homme. Il vise soit à éliminer le pathogène déjà présent chez un hôte (chimiothérapie), soit à prévenir son installation et son développement (chimio prophylaxie). Cette dernière voie est généralement réservée aux groupes à risque tels que les femmes enceintes et les personnes non immunes séjournant en zone d'endémie pour de courtes durées (Baudon *et al.*, 1987 ; Carnevale et Mouchet, 1990). Aujourd'hui l'OMS (2019) recommande, pour la prise en charge des cas de paludisme simple, l'utilisation de combinaisons thérapeutiques basées sur l'association d'artémisinine ou de ses dérivés avec d'autres molécules antipaludiques de synthèse telles que la luméfántrine, l'amodiaquine et la sulfadoxine-pyriméthamine.

I.6.1.2 Vaccin antipaludique

Les études sur la vaccination antipaludique piétinent mais plusieurs voies sont en ce moment explorées et il est possible que des vaccins contre le paludisme soient disponibles dans la prochaine décennie (OMS, 2013). Ceux-ci sont basés sur divers antigènes issus de différents stades du cycle évolutif du parasite. Leur efficacité dépendra du stade ciblé dans le cycle de vie du parasite. On peut distinguer entre autres :

- **le vaccin dirigé contre le stade exo-érythrocytaire.** Le RTS, S/AS01 a pour but d'empêcher la pénétration ou le développement des sporozoïtes dans les hépatocytes. La protéine circumsporozoïte (CSP), impliquée dans l'invasion des cellules hépatiques, est l'une des cibles vaccinales potentielles et la mieux étudiée actuellement. Un vaccin basé sur l'antigène CSP et sur RTS a fait l'objet d'essais cliniques en Afrique, notamment au Kenya et en Tanzanie (Alonso *et al.*, 2007 ; Bejon *et al.*, 2008 ; Olotu *et al.*, 2013), qui se sont montrés très prometteurs. Ce vaccin a permis de réduire les cas de paludisme chez les enfants mais son efficacité après une période de 4 ans a été inférieure à 20% (Agnandji *et al.*, 2011 ; 2012 ; Olotu *et al.*, 2013) ;
- **le vaccin anti-stade sanguin asexué ou anti-mérozoïte.** Il vise à prévenir la croissance et le développement du parasite dans les globules rouges. Plusieurs vaccins de ce type font

l'objet d'essais cliniques dont le MSP (Merozoite Surface Protein), l'AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1) et le GLURP (Glutamate Rich Protein) (Girard *et al.*, 2007 ; Esen *et al.*, 2009 ; Goodman *et al.*, 2010 ; Sheehy *et al.*, 2012) ;

- **le vaccin bloquant la transmission (TB : Transmission Blocking vaccine)**. Il induit les anticorps inhibant la maturation des stades sexués (gamétocytes, gamètes, zygote et ookinète) du *Plasmodium* chez le moustique ou encore contre des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal du moustique sur lesquels se fixent les parasites (Dinglasan *et al.*, 2008). Ce type de vaccin permet à l'homme de produire des anticorps qui, une fois ingérés par le moustique, stoppent le développement du parasite et diminuent ainsi le nombre d'anophèles infectés. Les antigènes potentiels pour la préparation de tels vaccins sont le Pfs 25 qui est exprimé à la surface des zygotes et des ookinètes, le Pfs 48/45 et le Pfs 230 qui sont des protéines présentes sur les gamètes (Dinglasan *et al.*, 2013).

I.6.2 Lutte anti-vectorielle

I.6.2.1 Lutte contre les stades préimaginaux

La lutte anti-vectorielle vise non seulement à protéger contre les nuisances et les piqûres de moustiques, mais aussi à supprimer voire limiter la transmission du *Plasmodium*. En l'absence d'un vaccin contre les parasites du paludisme, la lutte anti-vectorielle reste le principal moyen de prévention contre cette maladie. Elle peut être dirigée contre les vecteurs adultes (adulticide) ou contre leurs stades préimaginaux (larvicides). Les moyens utilisés peuvent être chimiques, biologiques, génétiques, physiques ou écologiques.

La lutte contre les stades préimaginaux a été très utilisée au début du siècle dernier, particulièrement en Europe dans les campagnes de démoustication. Elle est préconisée lorsque le nombre de gîtes est limité et quand ils sont facilement repérables et accessibles (Mouchet *et al.*, 2004; OMS, 2012). Les moyens de lutte pouvant être utilisés dans ce cadre sont physiques (l'aménagement de l'environnement par drainage des zones marécageuses, assèchement des marais, construction des drains) ou biologiques (utilisation de traitements larvicides à base d'insecticides ou d'agents biologiques tels que les champignons, les virus, les bactéries *Bacillus thuringensis* et *Bacillus sphaericus*), des prédateurs tels que les nématodes (*Ramanormis cilivorax*), les punaises aquatiques, les planaires, les cyclops, les poissons larvivores gambusies (*Gambusia sp*) et les guppies (*Poecilia reticulata*) (Mouchet *et al.*, 1991). Malgré le potentiel de la lutte anti-larvaire, cette dernière reste très peu utilisée en Afrique du fait de la multiplicité de milieux propices au développement des moustiques

(marécages, marais, rivières, mares d'eaux stagnantes). Toutefois, la plupart des études réalisées en zone urbaine retiennent ce moyen de lutte comme une alternative sérieuse dans le cadre d'une lutte intégrée contre les vecteurs urbains (Fillinger *et al.*, 2008 ; Maheux et De Castro, 2013 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2018).

I.6.2.2 Lutte contre les adultes

La lutte contre les vecteurs adultes a pour objectifs (a) la prévention des piqûres et (b) la réduction de la taille des populations de moustiques ou du moins leur éradication de façon à interrompre la transmission du parasite. Les techniques utilisées sont :

- **la lutte physique.** Elle permet de constituer une barrière physique entre l'homme et les moustiques. La réussite de cette méthode requiert la mobilisation et la sensibilisation des populations. On peut y citer l'installation de grillages aux ouvertures des habitations et l'utilisation régulière des moustiquaires (rendues plus efficaces par leur imprégnation avec des insecticides rémanents), etc. ;

- **la lutte génétique.** Elle consiste à remplacer des populations naturelles par des moustiques génétiquement modifiés. Différentes méthodes existent : le remplacement par sélection ou manipulation génétique des populations de vecteurs par des espèces réfractaires au développement du parasite, et l'introduction des mâles stériles, technique dite de l'insecte stérile ou TIS (Catteruccia *et al.*, 2009). L'efficacité de la TIS dépend essentiellement de la capacité des mâles stériles relâchés dans la nature à entrer en compétition avec les mâles sauvages.

- **la lutte chimique.** Elle repose essentiellement sur l'utilisation d'insecticides chimiques ou biologiques d'origine naturelle ou synthétique qui repoussent ou tuent les insectes. Elle comprend la pulvérisation d'insecticides dans les gîtes larvaires, les aspersion intradomiciliaires d'insecticides et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). Cette dernière méthode s'est avérée offrir une protection efficace contre l'infection palustre. En effet, elle est associée à une réduction de la mortalité chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (Mathanga *et al.*, 2006 ; Eisele *et al.*, 2010).

La lutte par l'utilisation de moustiquaires imprégnées ou après pulvérisations intradomiciliaires constitue la principale méthode de lutte employée contre les moustiques adultes. Toutefois, l'apparition et l'expansion des populations de vecteurs résistants à la plupart des insecticides employés dans la lutte anti-vectorielle hypothèque l'avenir de cette méthode. Afin de contrer cette difficulté, une nouvelle génération de moustiquaires

imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) connue sous le nom de « Permet 3.0 » a vu le jour. Dans ce cas on associe deux produits chimiques, une molécule insecticide (la deltaméthrine) et un synergiste qui est le butoxyde pipéronilique dont le rôle est d'inhiber l'activité des estérases et des cytochromes P450 afin d'augmenter l'efficacité de la molécule insecticide. Cette génération de moustiquaires s'offre une efficacité accrue contre les vecteurs du paludisme résistants aux pyréthriinoïdes. En effet de nombreux essais ont conclu à un effet insecticide accru et une protection efficace de la MILDA (Corbel *et al.*, 2010 ; Tunku *et al.*, 2010).

Dans l'attente de solutions nouvelles, la préservation de cet outil de contrôle reste primordiale et requiert une action concertée, afin de limiter l'effet néfaste engendré par l'utilisation des insecticides en agriculture sur les populations de moustiques. Des alternatives pourraient être le recours aux agents biologiques ou la lutte génétique avec la fabrication de moustiques transgéniques à faible pouvoir infectant.

I.6.2.3 Insecticides utilisés dans la lutte contre les moustiques

❖ Les organochlorés

Les organochlorés représentent le plus ancien groupe d'insecticides chimiques. On y distingue 2 grands sous-groupes :

- le DDT et ses analogues, le DDD et le HCH ;
- les cyclodiènes tels que l'aldrine, la dieldrine, l'endrine, l'endosulfan, etc.

Les organochlorés sont des substances très stables et bioaccumulables. Leur très longue stabilité à la lumière, leur persistance dans la nature et leur accumulation dans les chaînes alimentaires associées aux phénomènes de résistance apparus en particulier chez les diptères (cas avec l'aldrine et la dieldrine) ont été à l'origine de leur interdiction lors de la convention de Stockholm en 2001. Toutefois, suite à la persistance de maladies vectorielles et au manque d'alternatives viables, l'utilisation de certains de ces produits (DDT) a été encore autorisée.

Le DDT agit sur le système nerveux central et périphérique du moustique. Il ouvre les canaux sodiques des neurones des insectes ; il s'ensuit une dépolarisation massive des neurones avec pour conséquence une excitation permanente des fibres nerveuses et l'inhibition ATPasique. Ceci se traduit par un effet de choc dit « knock-down » suivi d'une paralysie puis la mort de l'insecte (Carles *et al.*, 1985).

❖ Les organophosphorés

Ils représentent un vaste groupe de composés chimiques dont les molécules comprennent un radical phosphate central. Ils ont une toxicité aigüe plus élevée que celle des organochlorés mais avec une rémanence plus faible. Les organophosphorés sont neurotoxiques, inhibiteurs de la cholinestérase qu'ils bloquent sous une forme inactive : l'acétylcholine qui s'accumule dans l'espace synaptique empêche alors la transmission de l'influx nerveux et entraîne la mort de l'insecte. Comme organophosphorés, on distingue : le malathion, le fenitrothion, le bromophos, le chlorpyrifos, etc...

❖ Les carbamates

Ce sont des esters de l'acide carbamique. Ils sont très efficaces mais leur usage est restreint du fait de leur toxicité et de leur coût de production élevé. Les plus connus sont le carbofuran, le propoxur, le carbaryl et le bendiocarb. Ils représentent une alternative pour l'imprégnation des moustiquaires en santé publique suite à la résistance des vecteurs du paludisme aux pyréthrinoides (Asidi *et al.*, 2005).

❖ Les pyréthrinoides

Ce sont des esters synthétiques de l'acide chrysanthémique dont les composés naturels, appelés pyréthrines, sont extraits de la fleur du chrysanthème (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Les pyréthrinoides de synthèse sont largement utilisés en santé publique. Leur photo-stabilité, leur toxicité sélective et leur innocuité pour les vertébrés à sang chaud en ont fait des candidats de choix en santé publique, notamment pour l'imprégnation des moustiquaires (Zaim *et al.*, 2000). Comme le DDT, ils agissent en bloquant le fonctionnement des canaux sodiums. On distingue les pyréthrinoides de type I qui n'ont pas de radical cyané, cas de la perméthrine et de la bifenthrin et les pyréthrinoides de type II pourvus d'un radical cyané en position α , par exemple la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine.

I.6.2.4 Mécanismes de résistance aux insecticides

La résistance à un insecticide se traduit par la diminution de la mortalité observée dans une population soumise à un traitement normalement efficace. Ce phénomène, qui se manifeste par l'apparition d'individus tolérants aux doses létales pour d'autres individus sensibles de la même espèce, repose sur une évolution génétique des populations (Poiré et Pasteur, 1992). Une population de vecteurs devient résistante parce que l'insecticide élimine

progressivement la plupart des individus sensibles tout en permettant la survie et la reproduction de ceux qui possèdent un mécanisme de résistance.

Pour être efficace, un insecticide doit entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans son organisme (éventuellement y produire des métabolites), être transporté jusqu'à sa cible biologique et interagir avec celle-ci. Ainsi, on reconnaît trois types de résistances : la résistance métabolique, la résistance par modification de la cible (tableau II) et la résistance comportementale. Chacun de ces mécanismes est contrôlé par au moins un gène dont la mutation peut induire des résistances. Chez les anophèles vecteurs de *Plasmodium*, les mécanismes de résistance les plus importants sont la résistance métabolique et la résistance par modification de la cible.

Tableau II : Principaux mécanismes déterminant une résistance des moustiques aux insecticides

Classes d'insecticides	Résistance métabolique			Résistance par modification de la cible		
	Estérases	Mono-oxygénases	Glutathion-S-transférase	Acétylcholinestérase	Canaux sodium (kdr)	Récepteurs GABA
Pyréthrinoïdes	+	+			+	
DDT		+	+		+	
Cyclodiène						+
Carbamates	+			+		
Organophosphorés	+	+	+	+		

• La résistance métabolique

La résistance métabolique est due à la surexpression d'enzymes capables de détoxiquer ou de séquestrer les insecticides. Ces enzymes sont essentiellement des estérases, des oxydases à cytochrome P-450 et des glutathion-S-transférases ou GST (Hemingway *et al.*, 2004 ; Oppenoorth *et al.*, 1985). Chez les vecteurs de plasmodiums, la résistance métabolique est principalement l'apanage de la surexpression des oxydases à cytochrome P-450. Plusieurs gènes "candidats" (cyp6p3, cyp6m2, cyp6z2, cyp6p9) ont été identifiés chez *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* s.s. comme pouvant être à l'origine de ces résistances (Djouaka *et al.*, 2008 ; Muller *et al.*, 2007 et 2008 ; Wondji *et al.*, 2009). Ces réactions d'oxydation sont impliquées dans la résistance aux organochlorés, aux pyréthrinoïdes et aux organophosphorés (Bonnet *et al.*, 2009). Les estérases sont impliquées dans les résistances aux pyréthrinoïdes et aux organophosphorés (Hemingway *et al.*, 2004). Les Glutathion S-Transférases (GST) quant à

elles sont impliquées dans des résistances aux organochlorés (DDT) et aux organophosphorés (Ranson & Hemingway, 2005).

• La résistance par modification de la cible

La modification d'une cible provoque une réduction de la sensibilité aux insecticides en raison des mutations ponctuelles intervenues sur les gènes codant pour les protéines cibles (O'Reilly *et al.*, 2006). La mutation la plus commune décrite chez les membres du complexe *Anopheles gambiae* est celle du canal sodium, dite "*kdr*" ("*knock-down resistance*"), qui induit une résistance croisée aux pyréthriinoïdes et aux organochlorés. Elle est due à une substitution d'un acide aminé, une leucine sur le codon 1014, par une phénylalanine (mutation L1014F ou "*kdr*-ouest") ou une sérine, c'est la mutation L1014S ou "*kdr*-est" (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Ranson *et al.*, 2000).

Les insecticides des familles des carbamates et des organophosphorés agissent sur l'acétylcholinestérase (une enzyme sécrétée dans les synapses des cellules nerveuses) en l'inhibant, ce qui entraîne la mort de l'insecte par accumulation de l'acétylcholine (substrat de l'enzyme) dans la fente synaptique. Chez les anophèles, la mutation dite « *Ace-1* » de substitution d'une glycine par une serine sur le codon 119 induit une résistance aux carbamates et aux organophosphorés (Weill *et al.*, 2004).

Les récepteurs GABA sont les cibles de certains organochlorés comme les cyclodiènes. En se fixant au récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique, ces insecticides inhibent le fonctionnement du canal chlore en bloquant le passage des ions chlorures et en entraînant une hyperexcitation suivie de la mort de l'insecte. Une mutation ponctuelle au niveau du gène *rdl*, qui code pour les récepteurs du GABA, entraîne une substitution de l'alanine en position 302 par la serine (French-Constant, 1993) ou la glycine (Hosie *et al.*, 1997), ce qui ne permet plus à l'insecticide de s'y fixer et explique la résistance aux cyclodiènes (Bass *et al.*, 2004).

• La résistance comportementale

La résistance comportementale repose sur une modification du comportement de l'insecte lui permettant d'éviter un contact avec la molécule d'insecticide. Ce type de résistance est moins bien connu que les autres mécanismes décrits ci-dessus.

I.7 Quelques techniques utilisées pour l'identification moléculaire

I.7.1 PCR classique

La PCR (Polymerase by Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire, d'amplification génique *in vitro*. Elle permet de copier en grand nombre, à un facteur de

multiplication de l'ordre du milliard, une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité.

I.7.1.1 Principe de la PCR (Elyse *et al.*, 2002)

Le principe de la PCR repose sur la réplication de l'ADN dans les cellules vivantes avant la mitose. Elle permet, à partir de chaque brin d'un ADN bicaténaire, d'engendrer deux nouveaux brins semblables aux brins parentaux et d'amplifier des séquences d'ADN *in vitro*, en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques.

I.7.1.2 Étapes de réalisation de la PCR (David *et al.*, 2002)

- **Extraction de l'ADN génomique** (Elyse *et al.*, 2002)

L'extraction de l'ADN peut être manuelle ou automatisée. Une lyse préalable des cellules est effectuée ; elle est couramment faite par des produits chimiques ou par une variation thermique. Les produits les plus fréquemment utilisés pour la lyse chimique sont : le sulfate de guanidine et le chloroforme. Le reste du principe d'extraction consiste à capter les acides nucléiques et à éliminer les éléments non nécessaires par purification.

- **Amplification**

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. A l'exception de certaines méthodes utilisant des sondes d'hydrolyse, chaque cycle contient trois étapes comme détaillées dans la figure 11 :

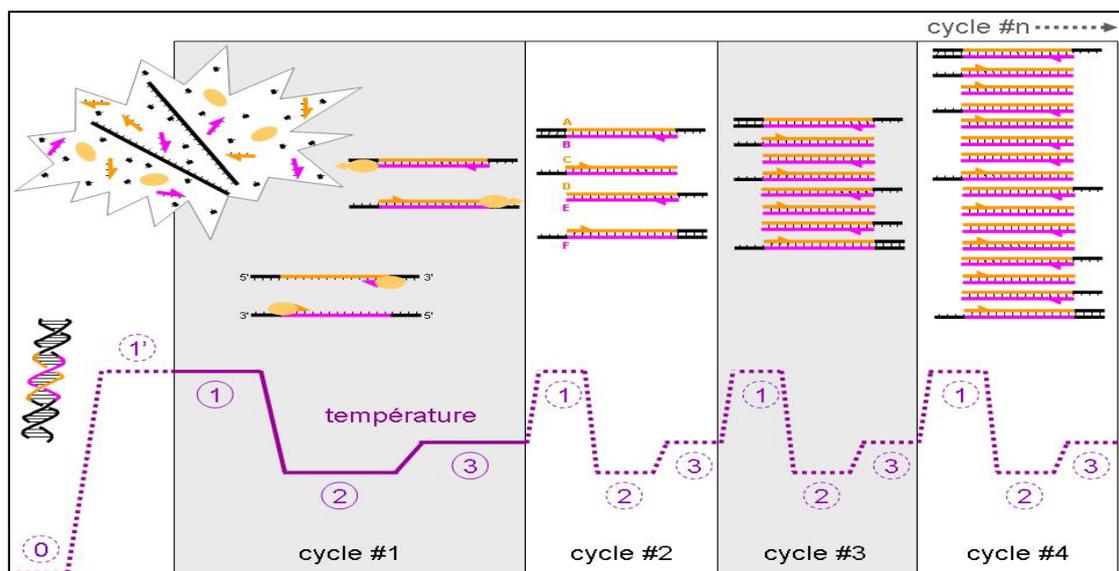


Figure 11: Évolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR (source : Adama DIARRA, 2013).

- (1) la dénaturation de l'ADN matrice à une température élevée, généralement comprise entre 90°C et 95°C suivant le rapport A/T et C/G qui permet d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares ;

- (2) l'hybridation sur l'ADN monocaténaire des amorces oligonucléotidiques complémentaires à une séquence d'ADN cible, à une température comprise entre 40°C et 65°C ;

- (3) l'élongation ou la synthèse du brin complémentaire à 72°C, par l'ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) à partir des oligonucléotides (figure 9). En répétant ce cycle n fois, on multiplie exponentiellement par 2^n le nombre de copies d'ADN dans le milieu réactionnel.

- **Révélation des produits de la PCR**

La révélation des produits de PCR varie selon le mode utilisé.

Dans une PCR classique, la détection des produits est faite en end-point, c'est-à-dire à la fin des réactions de PCR soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Dans une migration électrophorétique, un agent intercalant comme le bromure d'éthidium (BET) ou le Syber®Green est associé au milieu pour la visibilité des bandes. Un marqueur de poids moléculaires est utilisé comme échelle aidant à l'identification des bandes d'intérêt. Une bande contrôle de la taille de nos bandes d'intérêt doit être utilisée.

Dans une PCR en temps réel, la détection des produits est faite en même temps que se réalise la polymérisation des produits PCR grâce aux sondes fluorescentes. Ce sont des oligonucléotides couplés, à leurs extrémités, aux fluorophores. Les sondes les plus connues sont les sondes *TaqMan*, FRET, scorpions, et les balises moléculaires.

I.7.1.3 Variantes associées à la PCR

- **PCR multiplex**

La PCR multiplex (*multiplex PCR*) est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois en l'utilisant au moins trois amorces. Ses produits ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et, éventuellement, le marqueur d'ADN. La PCR multiplex peut être réalisée soit en point final, ses produits étant usuellement différenciés soit par leurs tailles ou par la présence d'un site de restriction, soit en temps réel

et chaque produit étant mesuré par une sonde spécifique couplée à un fluorophore dont le spectre d'émission est différent des autres.

- **PCR quantitative ou PCR en temps réel**

La PCR en temps réel (*Real-time PCR*) est une révolution dans ce domaine. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle, c'est-à-dire en temps réel, grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet de faire des mesures quantitatives, ce qui explique l'appellation PCR quantitative ou *qPCR*. Il existe plusieurs techniques : SyberGreen, *TaqMan*...

- **L'AS-PCR (Allele Specific-PCR).** Elle se rapproche de la PCR spécifique standard et repose sur l'amplification de séquences spécifiques de l'ADN ribosomal du gène ITS2 ; elle utilise des amorces qui diffèrent par une seule base. C'est une PCR multiplex où plusieurs amorces spécifiques de différentes familles sont introduites en même temps.

I.7.2 Séquençage de l'ADN

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Deux méthodes de séquençage ont été développées, l'une par Allan *et al.*, (1977) et l'autre par Sanger (1977). Nous ne détaillons que la méthode de Sanger (1977) que nous avons utilisée pour séquencer le gène GSTe2 des spécimens d'*An. funestus* s.s.. La méthode de Sanger est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire suite à une incorporation aléatoire, par l'ADN polymérase, de didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) dépourvus de groupements 3'-OH lors de l'élongation. Ces ddNTPs sont capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en synthèse en empêchant l'incorporation du nucléotide suivant ; cette aptitude génère un ensemble de fragments de tailles différentes mais se terminant par le même ddNTP.

Dans la méthode de Sanger, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide dit amorce, complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une enzyme, la séquenase, qui est l'ADN polymérase I dépourvue d'activités exonucléasiques 5'-3' et 3'-5'. Les quatre désoxynucleosides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) sont ajoutés ainsi qu'en faibles concentrations les quatre 2'-3' didésoxynucleosides (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. L'échantillon est préparé manuellement puis déposé sur un chargeur dans un séquenceur qui prélève automatiquement l'échantillon et le place sur le capillaire rempli de polymères. Les fragments synthétisés migrent en fonction de

leurs tailles et sont séparés à une base près. Cette méthode permet d'obtenir des résultats sous forme de chromatogramme, où les pics sont déterminés par quatre couleurs différentes, chaque couleur représentant un type de nucléotide (A, T, C ou G) comme le montre la figure 12.

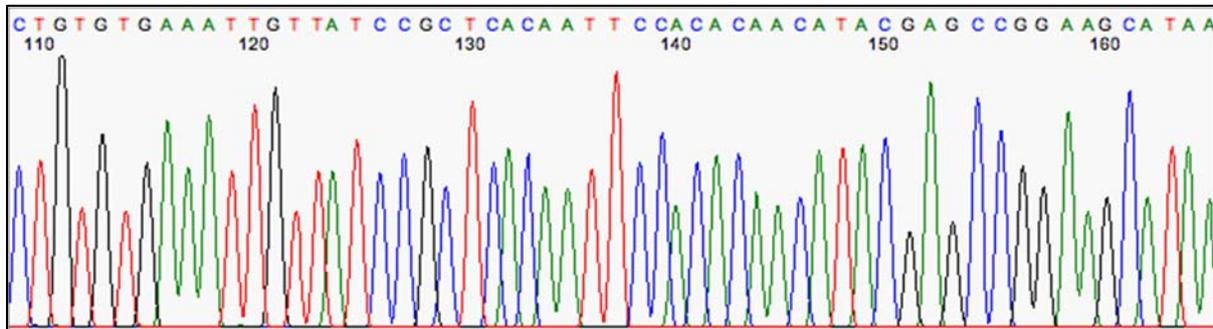


Figure 12: Chromatogramme généré par un séquenceur.

Les pics verts, rouges, bleus et noirs représentent respectivement l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). Les chiffres désignent la position de la base sur la séquence.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Cadre géographique de l'étude

La présente étude a été effectuée au Cameroun, qui est un pays d'Afrique Centrale situé au fond du Golfe de Guinée, entre le 2^{ème} et 13^{ème} degrés de latitude Nord et le 9^{ème} et 16^{ème} degrés de longitude Est. Le Cameroun a une forme triangulaire et s'étend du Sud au Nord sur près de 1200 km, et à sa base d'Ouest en Est, sur 800 km. Il couvre une superficie de 475 442 Km² et est limité à l'Ouest par le Nigeria, au Nord-Est par le Tchad, à l'Est par la République Centrafricaine et au Sud par le Congo, le Gabon et la Guinée Equatoriale. Au Sud-Ouest, le pays s'ouvre sur l'Océan Atlantique sur une longueur de 420 km (Olivry, 1986).

II.1.1 Localités de collecte des moustiques adultes et des larves

Les localités d'études ont été choisies soit parce qu'elles sont parsemées de gîtes propices au développement des larves d'*An. funestus* s.l. (lacs, étangs de pisciculture) et de celles d'*An. coluzzii* (flaques d'eau ou empreintes de pas...), soit parce que la présence de ces espèces y a été signalée au cours des études antérieures (Cohuet *et al.*, 2004 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006). La situation de ces localités est représentée dans la figure 13.



Figure 13: Carte du Cameroun situant les localités d'étude (source : d-maps.com, modifiée par Kopya, 2016).

- **Obout**

Obout1 ($3^{\circ}7'N$, $11^{\circ}65'E$) est située dans la Région du Centre à 27 km de Yaoundé, département de Mefou-et-Akono, arrondissement de Mfou. Elle présente une végétation dégradée à cause de l'avancée de l'urbanisation et de la création des plantations. Le climat y est équatorial de type guinéen. La température moyenne annuelle fluctue entre 19 et 29°C, et

l'hygrométrie moyenne mensuelle entre 66 et 80%. Les précipitations annuelles sont abondantes et varient de 1500 à 2000 mm (Ngatchou, 2006).

L'habitat est de type traditionnel ou moderne, avec des cases en terre battue ou en dur, couvertes de tôles. Les murs des cases en terre battue présentent de nombreux interstices par lesquels les moustiques peuvent entrer dans les maisons. Les populations sont, pour la plupart, de petits agriculteurs qui pratiquent aussi le petit élevage de chèvres, des moutons, des porcs et de volailles. On y note aussi la présence des étangs de pisciculture bordés de végétation, qui constituent des gîtes potentiels pour le développement de larves d'*An. funestus* s.l.

- **Mebelong**

Le village de Mebelong (6°463'N, 11°704'E) est situé dans la Région de l'Adamaoua, département de Mayo-Banyo, arrondissement de Bankim. Sa végétation est constituée d'une savane humide arborée et son climat est de type tropical caractérisé par des températures élevées, avec une moyenne annuelle autour de 28°C et une amplitude thermique moyenne annuelle de 6,4°C (Olivry, 1986). Les pluies sont peu abondantes, avec des précipitations annuelles qui varient de 900 à 1500 mm. La saison pluvieuse s'étale de mai à octobre alors que la saison sèche couvre les mois de novembre à avril.

Les populations sont pour la plupart des agriculteurs ; toutefois, elles pratiquent aussi l'élevage des moutons, des chèvres, des poulets, des bœufs, et la pêche. L'habitat est surtout de type traditionnel, avec des cases rondes ou rectangulaires construites en briques de terre, couvertes de tôles ou de chaume. On note la présence de nombreux interstices entre les murs et le toit par lesquels les moustiques peuvent entrer et sortir. A côté du village est aménagé un étang bordé d'une végétation émergente qui constitue un gîte potentiel pour le développement de larves d'*An. funestus* s.l.

- **Yaoundé**

Yaoundé (3° 52' N ; 11° 31' E), capitale politique du Cameroun, est située dans la Région du Centre dont elle est le chef-lieu. Elle a une superficie de plus de 384 km² et compte environ 2,4 millions d'habitants (<https://fr.wikipedia.org>). Yaoundé est située dans la zone phytogéographique Congo-guinéenne caractérisée par un climat équatorial typique à quatre saisons : une grande saison sèche qui va de mi-novembre à février, une petite saison des pluies qui se situe entre mars et juin, une petite saison sèche de juillet à août et une grande saison des pluies allant de septembre à mi-novembre (Trochain, 1976). La ville est

située à 800 mètres au-dessus du niveau de la mer et reçoit en moyenne 1700 millimètres de précipitations par an (Suchel, 1987), Elle est implantée sur un réseau de collines dominées par les monts Mbam Minkom (1295 m), Nkolondom (1221 m) et Eloumden (1159 m), d'où son surnom de « ville aux sept collines ». Les différents quartiers, qui s'étendent de manière anarchique, comprennent pour la plupart des bas-fonds où se pratique une agriculture saisonnière. La ville est traversée par de nombreux cours d'eau par exemple les rivières Mfoundi, Biyeme et Mefou (Suchel, 1987).

II.1.2 Localités des enquêtes parasitologiques

Les enquêtes parasitologiques pour la recherche des sujets infectés par *P. falciparum* ont été effectuées dans les villages situés dans l'arrondissement d'Okola et/ou dans l'arrondissement de Mfou.

- Okola (4°01'N, 11°22'E) est située dans le département de la Lékié, Région du Centre Cameroun, à environ 25 Km à l'ouest de la ville de Yaoundé ; elle a une superficie de l'arrondissement d'Okola est d'environ 605 Km² pour une population estimée à 65000 habitants (PCD, 2011). Le climat de la localité d'Okola est de type équatorial guinéen. La végétation d'Okola est hétérogène, composée de forêts primaires et secondaires (PCD, 2011). Elle présente une diversification d'espèces avec une stratification complète des grands arbres jusqu'à la strate herbacée. La moyenne annuelle des précipitations est de 1577 mm. La température moyenne annuelle est de 25°C avec une amplitude moyenne annuelle de 2,5°C.

- Mfou (3°7'N, 11°65'E) est le chef-lieu du département de la Mefou-et-Afamba. Située à environ 20 Km à l'est de la ville de Yaoundé, Mfou est limitée par les villages Nsimalen au Nord, Kamba au Sud, Nkolafamba à l'Est et Ngoumodou à l'Ouest. Le climat de cette région est de type équatorial guinéen ; pendant les deux saisons de pluies (août à novembre et avril à juin) lesquelles l'intensité de la transmission est plus élevée (Van der Kolk *et al.*, 2003). Les températures moyennes mensuelles varient entre 19 et 29°C, et l'hygrométrie moyenne mensuelle entre 66 et 80% (DEA Ngantchou, 2006). La superficie de l'arrondissement de Mfou est d'environ 3340 Km² ; sa population a été estimée à 14250 habitants en 2005 d'après les données relatives au dernier recensement du district de santé (DEA Ngantchou, 2006).

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Protocoles de terrain

❖ Capture des moustiques adultes

Les moustiques adultes ont été capturés à Obout et à Mebelong où l'autorisation d'accès dans les domiciles a été sollicitée auprès des chefs de ménage. Les échantillonnages ont été réalisés à l'aide d'aspirateurs électriques (Annexe 2) entre 7h et 11h dans les chambres à coucher. A la suite des captures les anophèles ont été triés et séparés des autres culicidés puis observés sous une loupe binoculaire afin de déterminer l'espèce sur la base des critères morphologiques (Gillies & De Meillon, 1968 ; Gillies & Coetzee, 1987). Les spécimens d'anophèles vivants appartenant au groupe *Anopheles funestus* et au complexe *Anopheles gambiae* ont été transférés séparément dans des gobelets en carton couvert de tulle moustiquaire non-imprégnée d'insecticide, sur laquelle a été déposé un coton imbibé de sucrose 10%.

❖ Collecte des larves d'*Anophles gambiae* s.l.

Les larves d'*An. gambiae* s.l. ont été collectées dans la ville de Yaoundé suivant la méthode du « dipping » ou trempage (Service, 1993) à l'aide de louches munies de manches longs ou d'assiettes. Après avoir vérifié la présence des larves, ces dernières ont été transférées avec l'eau du gîte dans des récipients étiquetés, portant le nom du quartier de collecte qui ont ensuite été transportés au laboratoire pour élevage jusqu'au stade adulte.

II.2.2 Protocoles de laboratoire

II.2.2.1 Elevage des anophèles

Après leur échantillonnage, les femelles d'anophèles ont été conservées dans des gobelets en carton pendant quatre jours pour la maturation complète des œufs. Les individus gravides d'*An. funestus* s.l. et/ou d'*An. gambiae* s.l. ont été placés individuellement dans des tubes Eppendorf en plastique de 1,5 ml contenant du coton humide pour l'oviposition (Morgan *et al.*, 2010). Les moustiques ayant pondu ou non des œufs, et ceux qui étaient morts juste après l'échantillonnage ont été conservés individuellement dans des tubes contenant du silicagel (dessiccateur) pour les analyses ultérieures (PCR, ELISA...).

Les œufs pondus par chaque femelle et les larves d'*An. gambiae* s.l. collectées dans les mares d'eau ont été placés dans des bacs individuels contenant de l'eau de source. Après l'identification moléculaire des espèces, seule les larves appartenant aux espèces *An. funestus*

s.s. et *An. coluzzii* ont été élevées jusqu'au stade adulte. Tout au long de l'élevage, les larves ont été nourries chaque jour avec du TetraMin® Baby, nourriture pour alevins. Au terme du développement larvaire, les nymphes ont été collectées dans des gobelets en plastique puis placées dans des cages recouvertes de tulle moustiquaire pour l'émergence des adultes.

II.2.2.2 Test de sensibilité des anophèles aux insecticides

Les tests de sensibilité aux insecticides ont été effectués en utilisant les moustiques de la génération F1, issus de l'élevage des œufs pondus par les anophèles femelles échantillonnés sur le terrain. Les insecticides utilisés appartenaient à deux classes, à savoir un organochloré (le DDT 4%) et deux pyréthrinoïdes (la perméthrine 0,75% et la deltaméthrine 0,05%). Les papiers imprégnés d'insecticide ont été obtenus auprès d'un centre de référence de l'OMS (*Vector Control Research Unit, University Sains Malaysia, Penang- Malaysia*) ; leur qualité a été d'abord vérifiée en utilisant la souche sensible de référence d'*An. gambiae* s.s. (souche Kisumu).

Les tests ont été réalisés à $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ et à une humidité relative comprise entre 70 et 80% en utilisant le protocole de l'OMS (2013). Chaque test comportait 4 répliques (tubes) de 20 à 25 moustiques qui ont été exposés à l'insecticide et un lot témoin de 20 à 25 moustiques qui n'ont pas été exposés à l'insecticide (figure 14). Le test consistait à prélever individuellement les femelles, à l'aide d'un aspirateur à bouche, à les introduire dans un cylindre d'observation tapissé de papier non imprégné d'insecticide. La durée de la période d'observation a été d'une heure. Au terme de cette période, les moustiques des 4 répliques ont été transférés dans des cylindres d'exposition tapissés de papier imprégnés d'insecticides, alors que ceux du tube témoin ont été transférés dans un autre tube tapissé d'un papier non imprégné d'insecticide. Les moustiques assommés (knockdown) ont été dénombrés à intervalles de temps réguliers de 5 et 10 minutes pendant une heure. A l'issue de la période d'exposition, les moustiques ont été à nouveau transférés dans les cylindres d'observation ; un tampon imbibé d'une solution de saccharose à 10% a ensuite été déposé au-dessus du cylindre. Au bout de 24 heures, les moustiques morts ont été dénombrés à la fois dans les tubes tests et dans le tube témoin. Lorsque la mortalité dans le tube témoin était inférieure à 5%, le test était validé ; par contre lorsqu'elle était supérieure à 20%, le test était invalide. Lorsque la mortalité du témoin était comprise entre 5 et 20%, la mortalité des moustiques d'épreuve était corrigée d'après la formule d'Abott (1925) suivante :

Mortalité corrigée d'après Abott = $\frac{\% \text{ mortalité d'épreuve} - \% \text{ mortalité témoin}}{100 - \% \text{ mortalité témoin}} \times 100$

Les taux de mortalité des moustiques évalués 24h après l'exposition aux doses diagnostiques d'insecticides étaient interprétés suivant les recommandations de l'OMS (2013) définie de la manière suivante :

- taux de mortalité comprise entre **98-100%** = **population sensible** ;
- taux de mortalité comprise entre **90-97%** = **population probablement résistante** ;
- taux de mortalité inférieur à **90%** = **population résistante**.

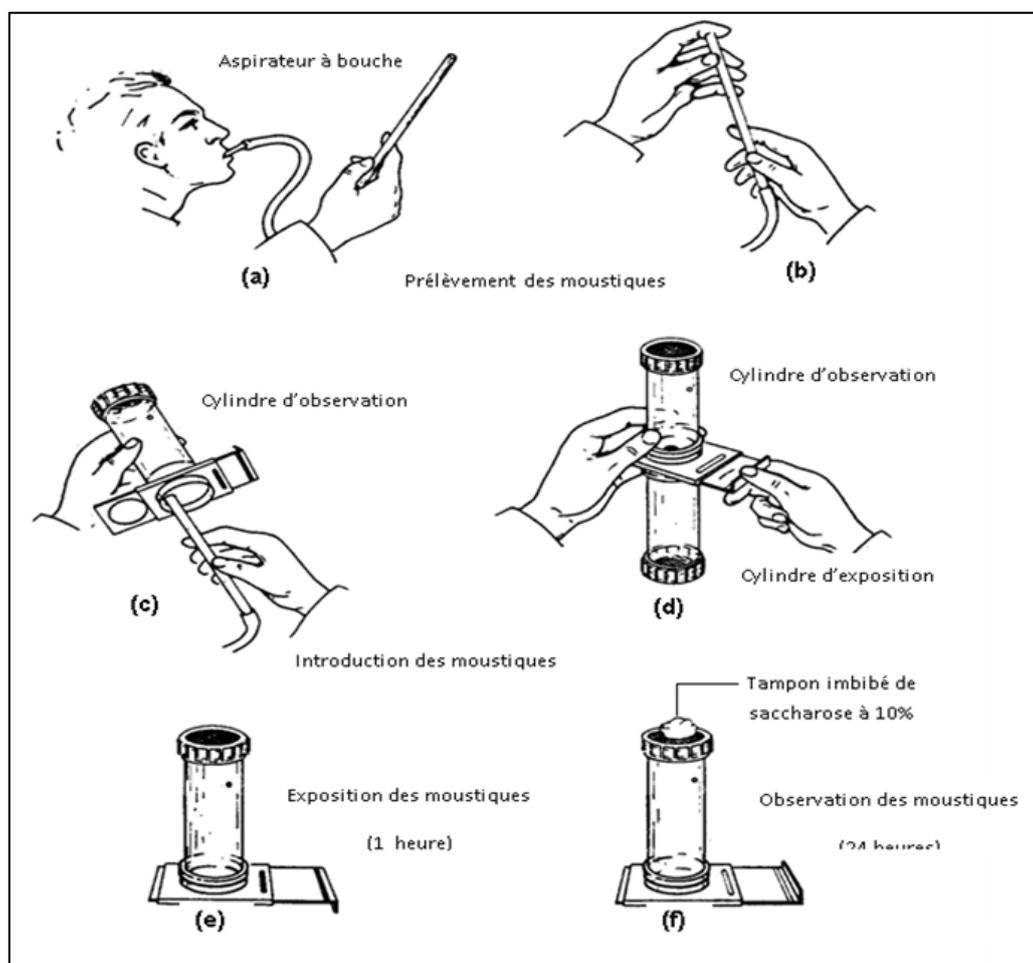


Figure 14: Différentes étapes du test de sensibilité des anophèles aux insecticides (OMS, 2013).

(a, b) Aspirer les moustiques, (c) Les introduire dans le tube d'observation tapissé de papier non imprégné, (d) Connecter un tube d'exposition tapissé de papier imprégné et y transférer les moustiques, (e) Exposer les moustiques pendant 1h et enregistrer le temps de knockdown, (f) Transférer les moustiques dans le tube d'observation et dénombrer la mortalité après 24h.

II.2.2.3 Détermination des préférences trophiques des anophèles par la technique d'ELISA

Le protocole de Beier *et al.* (1988) a été utilisé pour déterminer l'hôte (les hôtes) sur lequel(s) les anophèles se sont nourris. Pour cela, les abdomens contenant du sang sont disséqués et déposés individuellement dans des tubes Eppendorfs de 1,5 ml contenant 250 µl de « tampon Phosphate Buffered Saline » (PBS). Après élution du sang, 750 µl de PBS sont ajoutés à chaque tube puis la solution est homogénéisée. La microplaque (96 puits) est sensibilisée en déposant 50 µl de sang+tampon dans chaque puits, à raison d'un échantillon par colonne de 8 puits. Deux colonnes sont réservées aux témoins (figure 15) ; dans la colonne des témoins négatifs, 50 µl de tampon PBS sont déposés dans chaque puits, tandis que 50 µl de sérum homologue (dilué au 1/100) sont déposés dans les puits de la colonne des témoins positifs. La plaque est alors recouverte et incubée durant 3 heures à température ambiante ou toute la nuit à + 4°C, pour permettre aux IgG de se fixer sur la paroi des puits. Les anticorps spécifiques d'espèces marqués à la peroxydase sont préparés avec les sérums hétérologues pour limiter les réactions croisées. Pour cela, différentes dilutions sont effectuées (Annexes 3). La plaque est lavée deux fois avec du PBS/Tween 20, puis 50 µl de solution d'IgG marqués de chaque espèce sont déposés dans les puits de la colonne correspondante. La plaque est incubée pendant 1h à température ambiante pour que les anti-IgG se fixent sur les IgG correspondants. Après ce temps, la plaque est lavée 4 fois successivement au PBS/Tween 20, afin d'éliminer les anticorps anti-IgG qui ne se sont pas fixés. 100 µl de substrat de la peroxydase (Annexes 3) sont ajoutés dans chaque puits ; la plaque est ensuite incubée à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes au terme desquelles les puits positifs donnent une coloration bleue. La réaction est stoppée en ajoutant 50 µl d'acide sulfurique 4N dans chaque puits, ce qui donne une coloration jaune. Les densités optiques sont déterminées après lecture au spectrophotomètre à 450 et 620 nm.

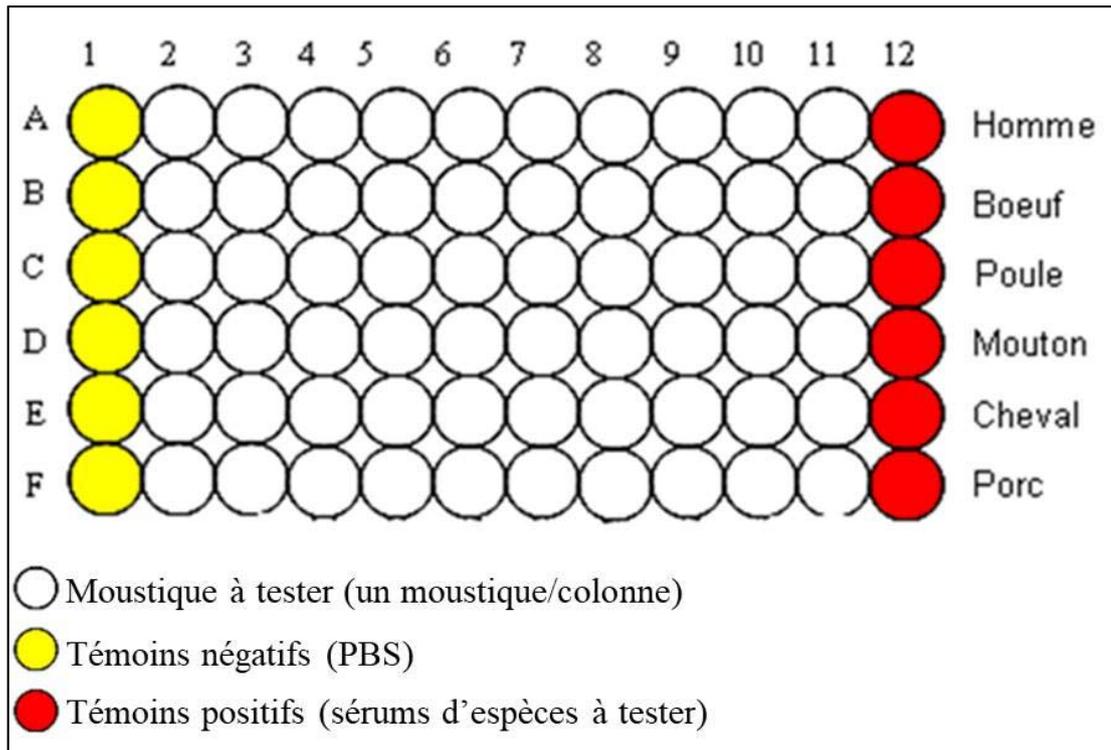


Figure 15: Représentation d'une plaque ELISA et plan de distribution des éluât de sang à tester.

II.2.2.4 Recherche de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* chez les anophèles

La technique ELISA a été utilisée pour rechercher la protéine circumsporozoïte suivant le protocole de Burkot *et al.* (1984) et de Wirtz *et al.* (1987). Pour cela, l'ensemble tête-thorax de chaque moustique est coupé et placé individuellement dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Pour ramollir la tête-thorax, 20µl d'une solution de Nonidet P40 (NP40) sont ajoutés dans chaque tube. Cette solution est un détergent qui facilite la destruction des cellules par hydrolyse des protéines membranaires. Après 1h d'incubation à température ambiante ou toute la nuit au réfrigérateur (+4°C), le broyage des tissus est fait dans 380µl de tampon « Blocking Buffer » (tampon BB). Après cette étape, les broyats sont conservés à -20°C.

L'anticorps monoclonal de capture de *P. falciparum* a été reconstitué et conservé à -20°C. La plaque est sensibilisée en ajoutant 50µl de cette solution d'Acm diluée à 1/300 dans chaque puits, et incubée toute la nuit à température ambiante. Le lendemain, la plaque est vidée sans être lavée ; ensuite 200µl de tampon BB sont déposés dans chaque puits pour saturer les sites de fixation de l'Acm non occupés. La plaque est à nouveau incubée pendant 1h à température ambiante après quoi elle est vidée mais sans être lavée ; 50µl de broyat de

moustique sont ensuite déposés dans chaque puits, à raison d'un échantillon par puits. De même, 50 µl de tampon BB sont déposés dans chaque puits de la colonne réservée aux témoins négatifs, alors que 50µl de la CSP de *P. falciparum* sont introduits déposés dans le puits correspondant au témoin positif (figure 16). La plaque est incubée à température ambiante pendant 2h au cours desquelles la CSP se fixe sur l'anticorps de capture anti-CSP. Au bout de ce temps, la plaque est lavée deux fois au PBS/Tween 20. Avant de procéder au lavage, une solution d'Acm conjuguée à la peroxydase est préparée en mélangeant l'Acm conjugué à la peroxydase de *P. falciparum* avec le tampon BB. A la suite des lavages, 50µl de cette solution sont déposés dans chaque puits. Après 1h d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée 4 fois au PBS/Tween 20. La révélation est faite en déposant 100µl de substrat de la peroxydase dans chaque puits et en incubant la plaque pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée par addition de 50µl d'acide sulfurique 4N dans chaque puits avant de procéder à la lecture au spectrophotomètre.

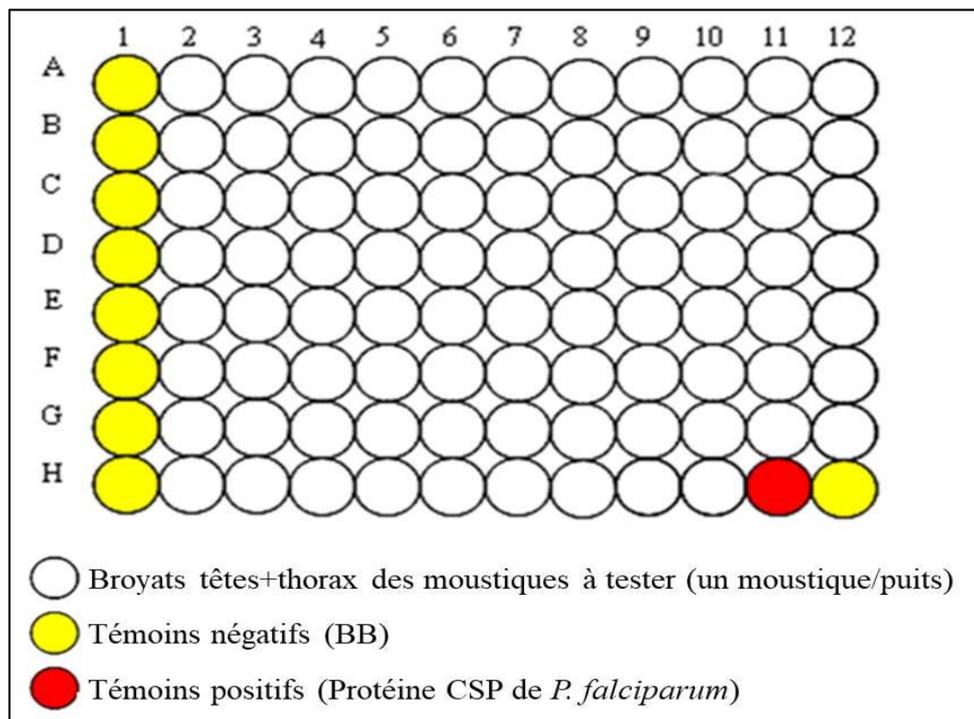


Figure 16: Représentation d'une plaque ELISA et plan de distribution des broyats.

II.2.2.5 Identification moléculaire des espèces d'anophèles par la technique de PCR

- **Extraction de l'ADN des anophèles**

L'ADN génomique a été extrait en utilisant la technique d'extraction au Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) concentré à 2% décrite par Morlais *et al.*, (2004) et qui est présentée à l'Annexes 4. Les moustiques entiers ou leurs fragments (pattes, ailes ou

abdomens) placés individuellement dans des tubes stériles, ont été d'abord broyés dans 200µl de tampon CTAB 2% à l'aide d'un piston. Le broyat a été ensuite incubé au bain marie à 65°C pendant 5 minutes, pour dénaturer les nucléases. Après le retrait du bain marie, 200µl de chloroforme ont été ajoutés dans chaque tube ; l'ensemble a été mélangé doucement par inversion. Les tubes ont été immédiatement centrifugés pendant 5 minutes à 12000 trs/min et à température ambiante (25°C), pour précipiter les débris cellulaires et les protéines dénaturées. Le surnageant de chaque tube a été délicatement transféré dans un nouveau tube stérile portant les mêmes indications que le précédent. A ce surnageant, ont été ajoutés 200µl d'isopropanol ; le tout a été mélangé par inversion et centrifugé pendant 15 minutes à la même vitesse que ci-dessus, pour précipiter l'ADN. Après avoir entièrement vidé l'isopropanol, en évitant de décrocher le culot déposé au fond du tube, 200µl d'éthanol 70% y ont été ajoutés et une nouvelle centrifugation a été effectuée pendant 5 minutes, toujours à 12000trs/min. Une fois l'éthanol vidé, le culot a été séché dans un dessiccateur « speed-vac ». L'ADN ainsi extrait a été reconstitué dans 20µl d'eau stérile puis conservé à -20°C.

- **PCR d'identification des espèces du groupe *Anopheles funestus***

L'identification moléculaire des espèces du groupe *Anopheles funestus* présentes dans nos localités d'étude a été faite en utilisant la technique de PCR décrite par Koekemoer *et al.* (2002) puis modifiée par Cohuet *et al.* (2004).

Cette technique exploite les variations des régions interspécifiques (ITS) de l'ADN ribosomal d'*An. funestus* s.s.. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau III. Le milieu réactionnel est composé de 1µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10x, 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce, 0,04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µL. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer) selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C suivie de 35 cycles d'amplification comprenant : une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 45°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 40 secondes. A la fin des 35 cycles, la dernière phase d'élongation a eu lieu à 72°C pendant 5 minutes. Les produits de la PCR ont été ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%.

Tableau III : Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'identification moléculaire des espèces du groupe *Anopheles funestus* s.s.

Amorces	Séquences	Espèces	Tailles (pb)
UV	5'TGTGACTGCAGGACACAT3'	-	-
FUN	5'GCATCGTGAGGTTAATCATG3'	<i>An. funestus</i> s.s.	505
VAN	5'TGTCGACTTGGTAGCCGAAC3'	<i>An. vaneedeni</i>	587
RIV	5'CAAGCCGTTCGACCCTGATT3'	<i>An. rivulorum</i>	411
PAR	5'TGCGGTCCCAAGCTAGGTTTC3'	<i>An. parensis</i>	252
LEE	5'TACACGGGCGCCTGATAGTT3'	<i>An. lesoni</i>	146
RIVLIKE	5'CCGCCTCCCGTGGAGTGGGGG3'	<i>An. rivulorum</i> -	313

- **PCR d'identification des espèces du complexe *Anopheles gambiae***

L'identification moléculaire des espèces du complexe *Anopheles gambiae* dans nos localités d'étude a été faite en utilisant la technique de PCR SINE décrite par Santolamazza *et al.* (2008). SINE (Short INterspersed Elements) est une séquence d'ADN ribosomal d'environ 200 pb, hautement répétitive et dont le polymorphisme permet d'identifier les espèces du complexe *Anopheles gambiae*, sans passer par une étape de digestion comme dans la méthode de Fanello *et al.*, (2002). Le milieu réactionnel était composé de 1µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10x, 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de chaque amorce, 0,04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µL. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer) selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 10 minutes à 94°C suivie de 35 cycles d'amplification comprenant : une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 54°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute. A la fin des 35 cycles, la dernière phase d'élongation a lieu à 72°C pendant 10 minutes. Les produits de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%. Les séquences des amorces utilisées sont : SIN200-F : 5'-TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA-3', SIN200-R : 5'-CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC-3'.

II.2.2.6 Susceptibilité d'*Anopheles funestus* s.s. et *Anopheles coluzzii* à l'infection par *Plasmodium falciparum*

La susceptibilité d'*An funestus* s.s. et d'*An. coluzzii* à l'infection par *P. falciparum* a été étudiée en réalisant des infections expérimentales des femelles de la génération F1 avec du sang contenant des gamétocytes de *P. falciparum*. La présente étude étant la première du genre chez *An. funestus* s.s., la souche d'*An. coluzzii* maintenue à l'OCEAC depuis 2006 et

connue comme très susceptible à l'infection par *P. falciparum* a servi comme témoin positif, afin de s'assurer de la fiabilité du dispositif et du protocole utilisés et du fait que les gamétocytes contenus dans le sang étaient effectivement infectants.

- **Recherche des porteurs de gamétocytes**

La recherche des porteurs de gamétocytes a été effectuée dans les écoles primaires chez des enfants âgés de 3 à 12 ans, répartis entre la SIL et le CM2. Cette tranche d'âge est très exposée au risque d'infection palustre (Van der kolk *et al.*, 2003 ; Ouédraogo *et al.*, 2010). Les enquêtes de diagnostic du paludisme ont été effectuées en collaboration avec les hôpitaux des districts d'Okola et de Mfou et nous avons été assistés par un infirmier et un technicien de chaque hôpital pour la confection des gouttes épaisses dans les écoles. Ces enquêtes ont été conduites après accord des autorités administratives, notamment de la préfecture et des directeurs d'écoles. Avant le début de chaque enquête, une note d'information portant la planification des passages dans les différentes écoles a été adressée aux autorités administratives et une note de sensibilisation aux parents d'élèves, afin de leur expliquer les objectifs et la méthodologie relative à notre étude. Seuls les enfants ayant reçu le consentement des parents ont participé à l'enquête. Le protocole de collecte d'échantillons a reçu le consentement éclairé du Comité National d'Ethique du Cameroun (accord N° 2015/01/535/CE/NRERSH/SP et N° 216/CNE/SE/09).

Une goutte épaisse a été confectionnée à partir du sang prélevé au doigt de chaque enfant volontaire à l'aide d'un vaccinostyle stérile ; les lames ont été séchées à l'air libre puis ramenées au laboratoire de recherche sur le paludisme de l'OCEAC où elles ont été colorées avec une solution de Giemsa diluée à 10% pendant une demi-heure. Par la suite, les lames ont été lavées, séchées et lues au microscope à travers l'objectif x100. Les résultats de la lecture des gouttes épaisses ont été rendus disponibles à l'hôpital le lendemain et les enfants porteurs de trophozoïtes de *P. falciparum* ont été traités par le médecin séant avec un antipaludique à base d'artémisinine selon les recommandations nationales.

Les enfants dont l'examen microscopique a révélé la présence de gamétocytes de *P. falciparum* (figure 17) ont été conduits à l'hôpital ou au laboratoire de recherche sur le paludisme de l'OCEAC pour subir un prélèvement sanguin en vue de réaliser des infections expérimentales.

- **Prélèvement sanguin et infection des anophèles**

Avant le prélèvement sanguin, le taux d'hémoglobine de chaque enfant a été déterminé à l'aide d'un hémoglobinomètre (HaemoCue®AB, Angelholm, Sweden). Les sujets ayant un taux d'hémoglobine inférieur à 8g/dl ont été écartés du protocole mais ont reçu un traitement antipaludique et antianémique. Par ailleurs, une goutte épaisse de contrôle a été effectuée avant le prélèvement pour confirmer la présence de gamétocytes. Le nombre de gamétocytes pour 200 globules blancs a été compté et la densité gamétocytaire a été estimée en utilisant une moyenne standard de 8000 globules blancs/ μ l de sang.



Figure 17: Gamétocytes mâle (GM) et femelle (GF) de *Plasmodium falciparum* (Wikipedia.org).

Le dispositif de gorgement (figure 16B) utilisé a été mis au point par Rutledge et collaborateurs en 1964. Il est constitué de cellules en verre fixées sur un support en bois. Chaque cellule comprend un circuit externe de régulation thermique et un circuit interne pour l'introduction du sang. Le système est maintenu à 37°C grâce par un bain marie thermostaté (figure 16B). La partie basale de chaque cellule est recouverte d'une membrane de Parafilm® à travers laquelle les moustiques peuvent se nourrir (Rutledge *et al.*, 1964). Le dispositif ainsi apprêté a été mis en marche une heure avant l'expérimentation afin de maintenir les cellules à 37°C.

Les moustiques femelles âgés de 3 à 5 jours ont été transférés dans des gobelets en carton de 450 ml, recouverts d'un tulle moustiquaire, à raison de 100 moustiques/gobelet. Afin d'améliorer le taux d'ingestion de sang, les moustiques ont été affamés 24 heures au préalable. Un volume de 4 ml de sang veineux a été prélevé dans un tube hépariné au pli du coude de chaque porteur de gamétocytes. Ce sang a immédiatement ensuite été centrifugé pendant 2 minutes à 2000 trs/mn grâce à une centrifugeuse placée dans une étuve à 37°C ; le sérum du porteur a été remplacé par une quantité équivalente de sérum AB non-immun pour

limiter l'effet des facteurs immunologiques pouvant bloquer ou influencer le développement du parasite chez le moustique (Boudin *et al.*, 2005). Un volume de 300µl de sang ainsi reconstitué a été distribué dans les cellules de verre et ces dernières ont été posées au-dessus des gobelets contenant les moustiques. La nutrition des moustiques s'est déroulée à l'obscurité pour se rapprocher des conditions naturelles car les anophèles piquent généralement pendant la nuit.

Les moustiques ont été nourris pendant 1h (figure 18B). Au bout de ce temps, ceux ayant pris du sang ont été triés à l'aide d'un aspirateur à bouche, transférés dans de nouveaux gobelets et maintenus à l'insectarium. Ils ont été nourris quotidiennement avec une solution de sucrose 10% jusqu'à leur dissection au septième jour post-ingestion du sang pour la recherche d'oocystes.

- **Dissection des estomacs de moustiques pour la mise en évidence des oocystes**

Sept jours après le repas de sang, les moustiques survivants ont été disséqués pour la détection et le dénombrement des oocystes sur la paroi de l'estomac. Pour cela, les moustiques ont été assommés avec du chloroforme pendant 45 secondes. Par la suite et sous une loupe binoculaire, ils ont été disséqués sur une lame porte-objet, à l'aide de deux pinces fines, dans une goutte de mercurochrome diluée à 0,4%. L'estomac une fois isolé a été recouvert d'une lamelle couvre-objet et observé au microscope optique (x40) pour le dénombrement des oocystes (figure 18C).

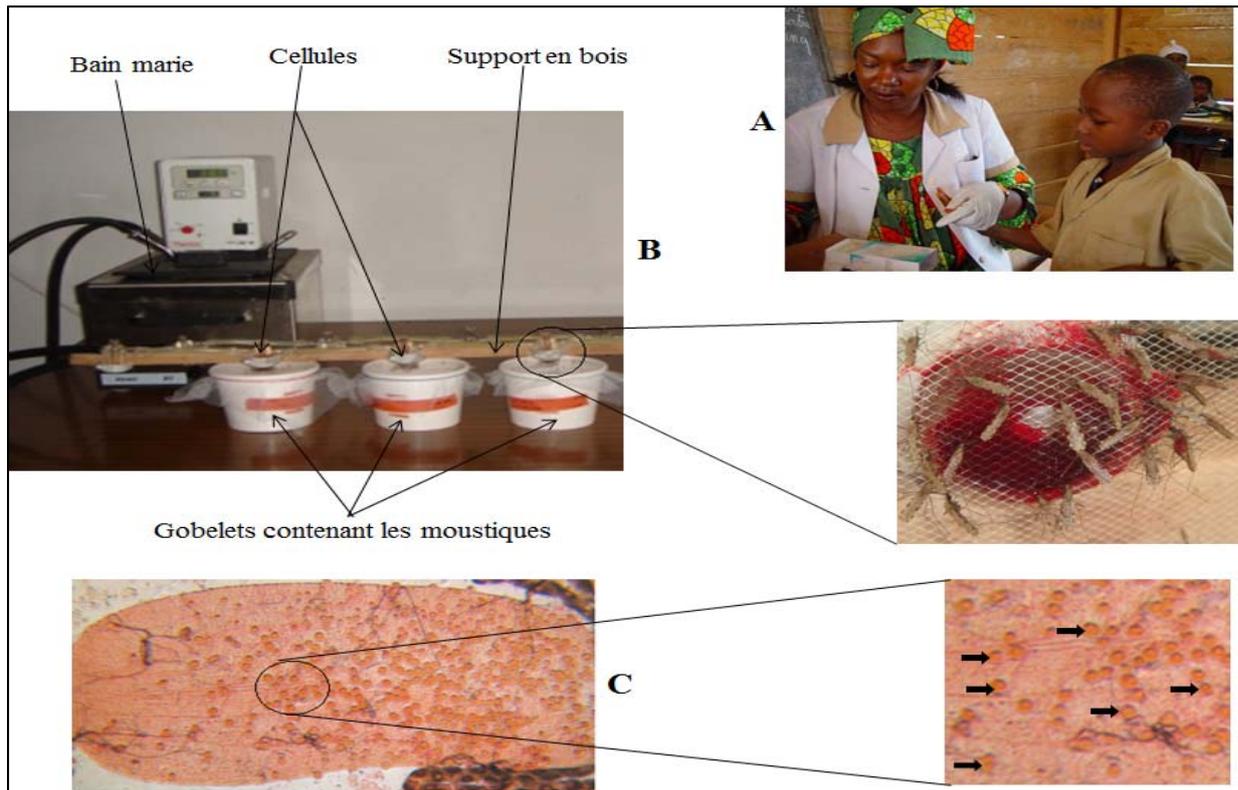


Figure 18: Schéma des infections expérimentales (Kopya, 2016).

A : Confection des gouttes épaisses puis sélection des porteurs de gamétocytes ; **B :** Prise du repas de sang infectant par les femelles d’anophèle à travers une membrane de parafilm ; **C :** Observation microscopique des estomacs 7 jours post-infection, après coloration avec une solution de mercurochrome à 0,4%. Les oocystes sont indiqués par les flèches en noir.

II.2.2.7 Influence de la résistance de *Anopheles funestus* s.s. et de *Anopheles coluzzii* aux insecticides sur le développement de *Plasmodium falciparum*

Pour réaliser cette étude, les femelles F1 d’*An. funestus* s.s. et celles d’*An. coluzzii* issues respectivement de l’élevage des œufs pondus par les anophèles femelles et de l’élevage des larves collectées sur le terrain ont été divisées en deux groupes : le premier groupe de moustiques a été exposé pendant 1h à la perméthrine 0,75% suivant le protocole de l’OMS (2013) décrit ci-dessus (section II.2.2.2). Après exposition, les moustiques ont été maintenus à température ambiante et nourries avec une solution de glucose 10%, le nombre de morts a été compté 24h post-exposition. Les spécimens vivants 24h après l’exposition ont été considérés comme résistants. Le second groupe de moustiques non-exposés à l’insecticide a servi de témoin. Ces deux groupes ont été affamés pendant 24h avant d’être nourris avec du sang infesté de gamétocytes de *P. falciparum* suivant le protocole des infections expérimentales et de dissection des estomacs décrit ci-dessus (section II.2.2.6). Par la suite,

les mutations L119F-*GSTe2* et L1014F-*kdr* associées à la résistance métabolique et à la résistance cible respectivement chez *An. funestus* s.s. et chez *An. coluzzii* ont été recherchées en utilisant les carcasses des moustiques disséqués.

- **Recherche de la mutation L119F-*GSTe2* impliquée dans la résistance métabolique chez *Anopheles funestus* s.s.**

L'association entre la mutation L119F-*GSTe2* impliquée dans les mécanismes de résistance métabolique aux insecticides et la susceptibilité d'*An. funestus* s.s. à l'infection par *P. falciparum* a été recherchée. Pour cela, l'ADN génomique a été extrait des carcasses des moustiques disséqués (infectés et non infectés) suivant le protocole d'extraction décrit ci-dessus (section II.2.2.5) ; leurs génotypes ont été déterminés par la technique PCR allèle spécifique (*AS-PCR*) décrite par Tchouakui *et al.* (2018). Le mélange réactionnel était constitué de : 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10× (*Buffer A*, Qiagen), 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce soit 4 au total (tableau IV), 0,04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µl. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer) selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 5 minute à 94°C, 30 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C, 1 minutes à 72°C) et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les produits amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%.

Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage de la mutation L119-*GSTe2* chez *Anopheles funestus* s.s.

Amorces	Séquences	Fragment	Taille(pb)
Nedel- <i>GSTe2</i> reverse	5'TTCCTCCTTTTTACGATTTTTCGAACT3'	Gène entier	849
Xbal- <i>GSTe2</i> forward	5'ATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT3'	Gène entier	849
L119 Full-Résistant	5'CGGGAATGTCCGATTTTCCGTAGAATAA3'	Sensible (SS)	312
L119 Full-Susceptible	5'CATTTCTTATTCTCATTTACAGGAGCGTAATC3'	Résistant (RR)	523

- **Séquençage du gène *GSTe2* chez *Anopheles funestus* s.s.**

Les variations de la séquence nucléotidique du gène *GSTe2* ont été étudiées chez des spécimens d'*An. funestus* s.s. infectés et non-infectés par *P. falciparum*, afin de rechercher une potentielle association entre la diversité génétique de ce gène et la susceptibilité de ce vecteur à cette espèce de plasmodium.

Le gène *GSTe2* a été amplifié par PCR chez 10 moustiques infectés et 10 moustiques non infectés en utilisant les amorces suivantes : *Nedel-GSTe2* Reverse 5'-TTC CTC CTT TTT ACG ATT TCG AAC T-3' ; *Xbal-GSTe2* Forward 5'-ATG ACC AAG CTA GTT CTG TAC ACG CT-3'. Le milieu réactionnel contenait : 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10× (Buffer A, Qiagen), 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 200 µM de dNTPs, 0,34 µM de chaque amorce, 0,04 unité de *Kappa Taq* polymérase (Qiagen) et de l'eau stérile pour un volume final de 15 µL. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer) selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, 30 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 1 minute à 72°C) et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. La taille du fragment amplifié a été vérifiée en faisant migrer les produits d'amplification sur un gel d'agarose à 1,5%.

Avant de procéder au séquençage, les produits de la PCR ont été purifiés pour éliminer les excès d'amorces, de dNTP, de sels et d'enzyme. Pour cela, 10 µl de chaque produit d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit ExoSAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, New England Biolabs, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les amplicons ainsi purifiés ont été dilués à une concentration finale de 150 ng/µl puis conditionnés pour le séquençage qui a été effectué à Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) en Angleterre.

- **Recherche de la mutation L1014F-kdr impliquée dans la résistance cible chez *Anopheles coluzzii***

L'association entre la mutation L1014F-*kdr* (*kdr*-ouest) impliquée dans les mécanismes de résistance cible aux insecticides et la susceptibilité d'*An. coluzzii* à l'infection par *P. falciparum* a été aussi recherchée. Pour cela, les génotypes des moustiques infectés et non infectés ont été déterminés par la technique *TaqMan* décrite par Bass *et al.*, (2007). L'ADN génomique utilisée a été extrait (protocole d'extraction décrit ci-dessus) des carcasses des moustiques disséqués (infectés et ou pas). Le mélange réactionnel était constitué de : 1 µl d'ADN génomique, 5 µl de Sensimix 1× (Quantace), 0,125 µl de solution amorce-sonde 40× et 3,875 µl d'eau stérile pour un volume final de 10 µl. L'amplification a été réalisée dans une machine *TaqMan* (MxPro-MX300P (Agilent®)) en présence de contrôles positifs (susceptible SS, résistants homozygote RR et hétérozygote RS) et négatifs selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, 40 cycles d'amplification (dénaturation : 10 secondes à 95°C, hybridation-extension : 45 secondes à 60°C). Cette technique est une PCR en temps réel (*qPCR*) qui s'appuie sur deux sondes marquées avec les

fluorophores FAM et HEX. La sonde FAM permet de détecter l'allèle mutant responsable de la résistance et la sonde HEX détecte l'allèle sensible. Au cours de cette réaction, une augmentation substantielle de la fluorescence HEX marque les individus de génotype SS tandis qu'une augmentation substantielle de la fluorescence FAM permet de reconnaître les individus de génotype RR. Une augmentation substantielle des deux types de fluorescence distingue les individus hybrides RS. Les amorces utilisées pour la base oligonucléique standard de la mutation *kdr* sont : *kdr-Forward* (5'-CAT TTT TCT TGG CCA CTG TAG TGA T-3'), *kdr-Reverse* (5'-CGA TCT TGG TCC ATG TTA ATT TGC A-3') ; l'allèle sensible (5'-CTT ACG ACT AAA TTT C-3') avec marquage de la sonde HEX en 5', les allèles mutants *kdr-L1014F* (5'-ACG ACA AAA TTT C-3') et *L1014S* (5'-ACG ACT GAA TTT C-3') marquées avec la sonde FAM.

II.3 Analyse des données

II.3.1 Données de la transmission

Deux paramètres de la transmission ont été calculés au vu des données disponibles :

- **l'indice circumsporoïtique (ICSP)** ; il a été calculé en faisant le rapport entre le nombre de moustiques retrouvés porteurs de l'antigène circumsporoïte de *P. falciparum* et le nombre total de moustiques testés par ELISA ;

- **Le taux d'anthropophilie (TA)** ; Il a été calculé en faisant le rapport entre le nombre de moustiques ayant pris leur repas de sang sur l'homme par le nombre total de moustiques testés par ELISA.

II.3.2 Données de la résistance

Le logiciel WINDEL version 12.0 a permis de calculer les temps KD (*Knock down*). Par ailleurs, les niveaux de sensibilité des moustiques adultes aux insecticides ont été comparés à l'aide du test de Chi-carré grâce au logiciel MedCalc version 15.8.

II.3.3 Données de l'infection expérimentale

Les paramètres analysés pour chaque expérience d'infection étaient : le taux de gorgement, c'est-à-dire la proportion de moustiques ayant ingéré le sang, le taux d'infection qui est la proportion de moustiques infectés après la dissection des estomacs, et l'intensité de l'infection représentée par les nombres moyen et médian des oocystes dans les estomacs.

La répartition des mutations *L119F-GSTe2* et *L1014F-kdr* a été évaluée en déterminant les fréquences alléliques et génotypiques dans chaque localités d'étude. L'influence des

mutations L119F-*GSTe2* et L1014F-*kdr* sur la compétence vectorielle a été étudiée en comparant d'une part les fréquences de leurs allèles résistants entre les moustiques infectés et non infectés et d'autre part, les paramètres d'infection entre les moustiques de différents génotypes (RR, RS et SS). Le taux d'infection, l'intensité moyenne et la médiane d'oocystes ont été calculés et comparés par le test exact de Fisher ou de Chi-carré, le test de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis respectivement. Le lien éventuel entre le taux d'infection, le nombre moyen d'oocystes et le nombre de gamétocytes/ μl a été analysé à l'aide de la corrélation rho (r_s) de Spearman. Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Les logiciels MedCalc version 15.8 et Graph Pad Prism V.7 ont été utilisés dans ces analyses.

II.3.4 Données du séquençage du gène *GSTe2*

- Estimation des paramètres de la variabilité génétique

Les séquences brutes issues du séquenceur ont été corrigées manuellement lorsque nécessaire, après une vérification visuelle des chromatogrammes, en utilisant le logiciel BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999). En effet, le début et la fin des séquences sont souvent de moins bonne qualité que la partie centrale ; l'interprétation du logiciel d'analyse doit alors être vérifiée. L'alignement des séquences a été réalisé grâce aux logiciels ClustalW *Multiple Alignment* intégré dans BioEdit (Thompson et al., 1994) et MEGA v7.0.21 (Kumar et al., 2016)). Pour chaque population, les indices de diversité haplotypique (h et dh) et nucléotidique (π), le nombre de sites polymorphes ou variables (s), le nombre moyen de différences nucléotidiques par séquence (K) ont été calculés grâce au logiciel DnaSP v 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009).

- Test de neutralité des mutations

Les paramètres D de Tajima's (1989), D et F de Fu & Li (1993) permettant de tester la stabilité démographique des populations ont été estimés en utilisant le logiciel DnaSP. Le test de Tajima compare deux estimateurs de la diversité nucléotidique, l'un (θ_s) basé sur le nombre de sites polymorphes (s) et l'autre (θ_π) basé sur le nombre moyen de différences entre les séquences (π). La différence entre ces deux estimateurs, normalisée par l'erreur standard, donne la statistique D . Dans une population en expansion, on s'attend à avoir des valeurs fortement négatives de D , car le nombre de sites polymorphes croîtra relativement rapidement, alors qu'il y aura un excès d'allèles de faibles fréquences qui auront peu d'influence sur π . Par contre, après une contraction de la population, le nombre de sites

polymorphes diminue d'autant plus vite que la taille de l'échantillon est grande (Tajima's, 1990).

- **Analyse de la phylogénie et phylogéographie**

Les distances génétiques entre les haplotypes de chaque groupe de moustiques ont été estimées grâce à MEGA v7.0.21 (Kumar et *al.*, 2016). Ce logiciel a aussi servi à la construction des arbres phylogénétiques en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Cho, 2012). Les intervalles de confiance des associations entre haplotypes ont été calculés par la méthode des « bootstraps » avec 500 répliques (Felsenstein, 1985). Le logiciel d'estimation de cladogramme TCS v1.21 (Clement et *al.*, 2000) et tcsBU (Clement et *al.*, 2000 ; Santos et *al.*, 2015) ont permis d'élaborer les réseaux d'haplotypes.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Résultats

III.1.1 Abondance relative des moustiques adultes dans les localités d'étude

Un total de 12753 moustiques ont été échantillonnés durant notre étude (tableau V). Trois (3) espèces d'anophèles ont été identifiées. Il s'agit par ordre d'abondance décroissante de : *An. funestus* s.l. (89,8%), *An. gambiae* s.l. (9,7%) et *An. ziemanni* (0,02%). Quelques Culicinae ont été également collectés notamment *Mansonia* spp. et *Culex* spp.. Des échantillons de 1006 spécimens d'*An. funestus* s.l. et 155 spécimens d'*An. gambiae* s.l. ont été utilisés pour les identifications moléculaires. Globalement, les analyses PCR ont montré qu'*An. funestus* s.s. (96,82% ; n=974) et *An. lesoni* (3,18% ; n=32) étaient les deux espèces du groupe *Anopheles funestus* (figure 19) présentes dans les localités d'étude, tandis que le complexe *Anopheles gambiae* (figure 20) était représenté par *An. gambiae* s.s. (95,48% ; n=148), *An. coluzzii* (2,58% ; n=4) et 3 hybrides (1,94%).

Tableau V : Abondance des moustiques adultes échantillonnés par aspiration électrique au cours de l'étude

Localités/Périodes	Espèces					Total
	<i>An. funestus</i> s.l.	<i>An. gambiae</i> s.l.	<i>An. ziemanni</i>	<i>Mansonia</i> spp	<i>Culex</i> spp	
Mebelong						
2014	1111	38	0	3	29	1181
2015	3704	126	0	-	-	3830
2016	349	21	0	-	-	370
Total	5164	185	0	3	29	5381
Obout						
2014	252	52	3	28	7	342
2015	419	174	0	-	-	593
2016	5613	824	0	-	-	6437
Total	6284	1050	3	28	7	7372
Grand total	11448	1235	3	31	36	12753

- : pas dénombrés.

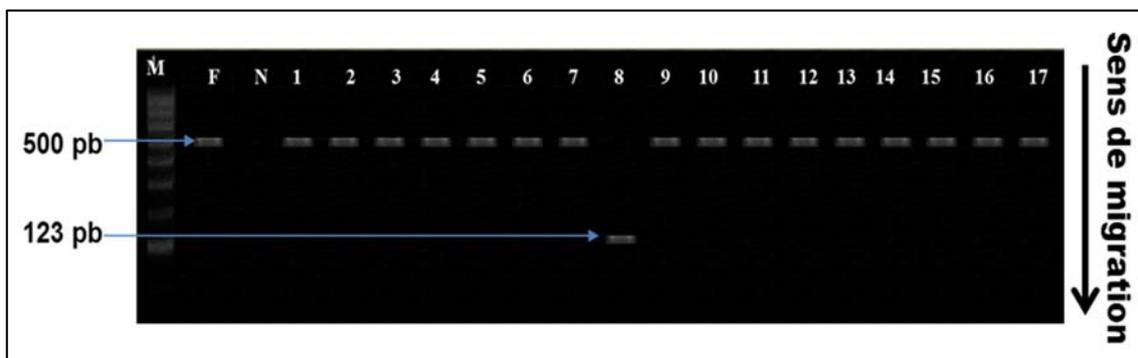


Figure 19 : Electrophorégramme des bandes d'amplification des séquences d'ADN spécifiques des espèces du groupe *Anopheles funestus* s.s..

M : marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases (pb) ; **F :** contrôle positif (*An. funestus* s.s.) ; **N :** contrôle négatif ; **N° 1-7 et 9-17 :** *An. funestus* s.s. ; **N° 8 :** *An. lesoni*.

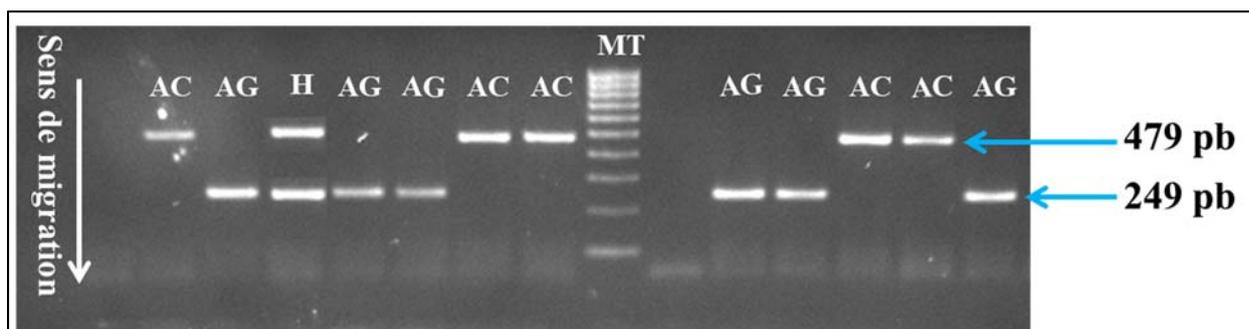


Figure 20: Electrophorogramme des bandes d'amplification des séquences d'ADN spécifiques d'espèce du complexe *Anopheles gambiae*.

MT : Marquer de taille ; AG : *An. gambiae* s.s. ; AC : *An. coluzzii* et H : hybride.

III.1.2 Biologie de *Anopheles funestus* s.s. au laboratoire

III.1.2.1 Oviposition et éclosion

Sur 287 femelles d'*An. funestus* s.s. gravides placées en oviposition au laboratoire dans des tubes individuels, 235 (81,88%) ont pondu entre 2 à 162 œufs/femelle (21378 œufs au total) soit une moyenne de 91 ± 4 œufs par femelle. Après la ponte, les œufs ont mis deux à trois jours pour éclore. Le nombre de larves d'éclosions (13485 larves au total) a varié de 0 à 142 larves, soit une moyenne de $57,38 \pm 4$ larves par ponte et un taux d'éclosion de 63,08% (figure 21).

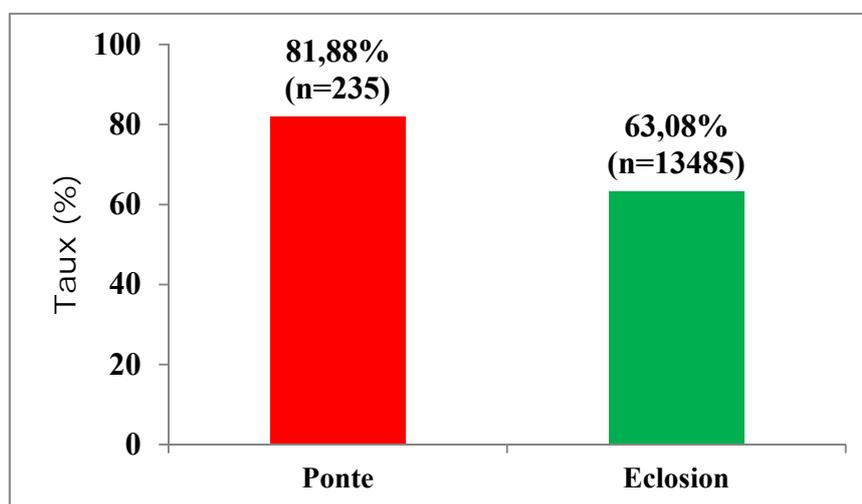


Figure 21: Taux de ponte et d'éclosion des œufs des femelles d'*Anopheles funestus* s.s..

III.1.2.2 Développement des stades préimaginaux

La durée du développement préimaginal d'*An. funestus* s.s. au laboratoire (température moyenne = 30°C) a été étudiée à partir d'un effectif de 13485 larves obtenues de 21378 œufs pondus par 235 femelles. Elle a varié de 8 à 12 jours, soit une durée moyenne de 10 ± 1 jours ;

la phase nymphale a duré 24 à 48 heures. Le sexe ratio à l'émergence a été de 46,5% de femelles et 53,5% de mâles.

III.1.2.3 Durée de vie des imagos

La durée de vie (température moyenne=27°C) des moustiques a été de 5 à 21 jours pour les mâles avec une moyenne de 13±2 jours et de 8 à 36 jours pour les femelles avec une moyenne de 22±3 jours (figure 22). La comparaison des proportions de survie des femelles et des mâles a révélé une différence très significative ($\chi^2 = 108,7$; $P < 0,0001$), ce qui suggère que les femelles ont une durée vie supérieure à celle des mâles en condition de laboratoire.

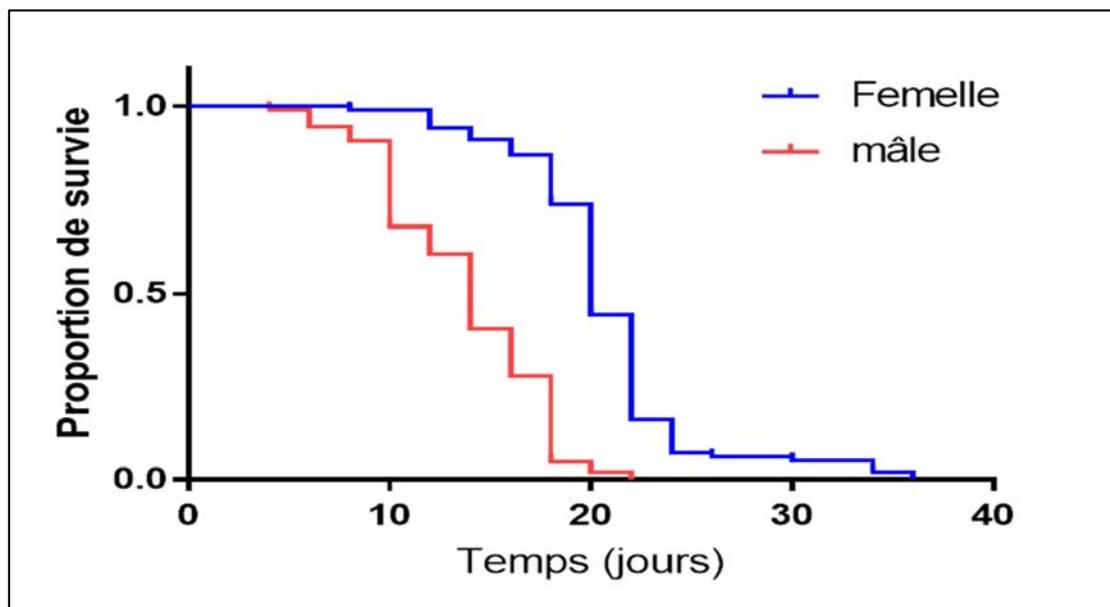


Figure 22: Durée de vie des imagos d'*Anopheles funestus* s.s. au laboratoire.

III.1.3 Préférences trophiques et taux d'anthropophilie de *Anopheles funestus* s.s. et de *Anopheles gambiae* s.l.

Au total 226 repas de sang ont été analysés dont 183 provenant d'*An. funestus* s.s, 43 d'*An. gambiae* s.l. Il est apparu que dans les 2 localités, Obout et Mebelong, 100% des repas de sang ont été pris sur l'homme, ce qui confirme la forte anthropophilie des taxa *An. funestus* s.s et *An. gambiae* s.l. en ces lieux.

III.1.4 Prévalence de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* chez les spécimens sauvages d'*Anopheles funestus* s.s. et d'*Anopheles gambiae* s.l.

La prévalence d'infestation d'*An. funestus* s.s. a été déterminée par la technique ELISA et comparée à celle d'*An. gambiae* s.l., en recherchant la présence de la protéine circumsporozoïte dans la tête et le thorax des moustiques. Le tableau VI présente le nombre

d'anophèles testés par localité d'étude, par année et par taxon, le nombre de spécimens retrouvés infestés, ainsi que les indices circumsporozoïtiques (ICSP) correspondants. Au total 4844 femelles d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l. sur les 12683 anophèles échantillonnés dans les 2 localités, de Août 2014 à Avril 2016 ont été analysées. Parmi ceux-ci, 369 spécimens ont été trouvés infectés par *P. falciparum*, ce qui correspond à un indice circumsporozoïtique (ICSP) global de 7,62%. Cet ICSP a varié de 4% à Mebelong à 11,24% à Obout.

Anopheles funestus s.s. a été retrouvé infecté dans les 2 localités d'étude. Son ICSP moyen global a été de 6,86%. Il a varié de 4,66% (IC_{95%} : 3,87%-5,57%) à Mebelong à 10,4% (IC_{95%} : 8,9%-12,1%) à Obout. Cependant, *An. gambiae* s.l. a présenté l'ICSP moyen le plus élevé (12,66%) variant de 5,2%(IC_{95%} : 1,4%-13,3%) à Mebelong à 13,69% (IC_{95%} : 10,79%-17,14%) à Obout. La comparaison des ICSP moyen de ces 2 vecteurs majeurs de paludisme a révélé une différence très significative ($\chi^2 = 16,18$; $P < 0,0001$).

Tableau VI : Nombre d'anophèles infectés par *Plasmodium falciparum* d'Août 2014 à Avril 2016

Localités/ périodes	<i>An. funestus</i> s.s.				<i>An. gambiae</i> s.l.				Total			
	n ₁	n _{1t}	n _{1p}	ICSP (%)	n ₂	n _{2t}	n _{2p}	ICSP (%)	N	N _t	N _p	ICSP (%)
Mebelong												
2014	1111	1021	30	2,94	38	38	0	0	1149	1059	30	2,83
2015	3704	1478	87	5,89	126	33	4	12,12	3830	1511	91	6,02
2016	349	98	4	4,08	21	6	0	0	370	104	4	3,85
Total	5164	2597	121	4,66	185	77	4	5,2	5349	2674	125	4,67
Obout												
2014	252	252	10	3,97	52	52	4	7,69	304	304	14	4,61
2015	419	211	19	9	174	174	17	9,77	593	385	36	9,35
2016	5613	1152	139	12,07	824	329	55	16,72	6437	1481	194	13,1
Total	6284	1615	168	10,4	1050	555	76	13,69	7334	2170	244	11,24
Grand total	11448	4212	289	6,86	1235	632	80	12,66	12683	4844	369	7,62

n : Nombre de femelles échantillonnées, **nt** : nombre d'individus testés, **np** : nombre d'individus positifs, **ICSP** : indice circumsporozoïtique, **N (n₁+n₂)** : nombre total.

III.1.5 Sensibilité d'*Anopheles funestus* s.s. aux insecticides en 2014 et en 2016

III.1.5.1 Souche de référence Kisumu (*Anopheles gambiae* s.s.)

La souche d'*An. gambiae* s.s. (Kisumu) a été sensible aux deux pyréthrinoïdes (la perméthrine 0,75% et la deltaméthrine 0,05%) utilisés mais a présenté une résistance

probable au DDT 4% (organochloré). La mortalité d'*An. gambiae* s.l. a été de 100% pour les deux pyréthriinoïdes et de 95% pour le DDT aux doses discriminatoires (figure 23). Les temps de *knockdown* (*tkd*₅₀) ont été inférieurs ou égaux à 30 minutes pour le DDT et à 22 minutes pour les pyréthriinoïdes.

III.1.5.2 Evolution de la sensibilité d'*Anopheles funestus* s.s. et d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides à Obout

III.1.5.2.1 Mortalité

La mortalité des anophèles enregistrée à Obout est illustrée à la figure 21 d'où il ressort que la sensibilité des spécimens d'*An. funestus* s.s. au DDT a significativement varié ($\chi^2 = 3,92$; $P = 0,0476$) entre 53,4% en 2014 à 36,05% en 2016 en décroissant ; cela indique que cette espèce a été résistante à ce composé à Obout.

Le niveau de sensibilité des spécimens d'*An. funestus* s.s. à la perméthrine dans la même localité est par contre resté stable ($P > 0,05$) passant de 94,74% (IC_{95%} : 79,9-111,54) en octobre 2014 à 94,12% (IC_{95%} : 85,89-102,93) en avril 2016. D'août à octobre 2014, le taux de mortalité d'*An. funestus* s.s. au contact de la deltaméthrine a été de 76,24% (IC_{95%} : 79,9-111,54). Trois ans plus tard, c'est-à-dire du mois de mars au mois d'avril 2016, le niveau de sensibilité de cette espèce à ce composé a légèrement baissé, la mortalité à cette période ayant été de 69,46% (IC_{95%} : 62,8-76,63). *Anopheles funestus* s.s. a donc résisté à cet insecticide.

Les spécimens d'*An. gambiae* s.l. testés parallèlement à *An. funestus* s.s. ont présenté une résistance aux trois molécules. D'août à octobre 2014, leur taux de mortalité était de 1,12%, 36,6% et 56,45% au contact du DDT, de la perméthrine et de la deltaméthrine respectivement. De mars à avril 2016, cette résistance est restée relativement stable au DDT avec une mortalité de 1,33% ; par contre, elle a significativement augmenté ($\chi^2 = 20$; $P < 0,0001$) avec la perméthrine et la deltaméthrine, puisque les mortalités ont été de 5,94% et 18,66% respectivement.

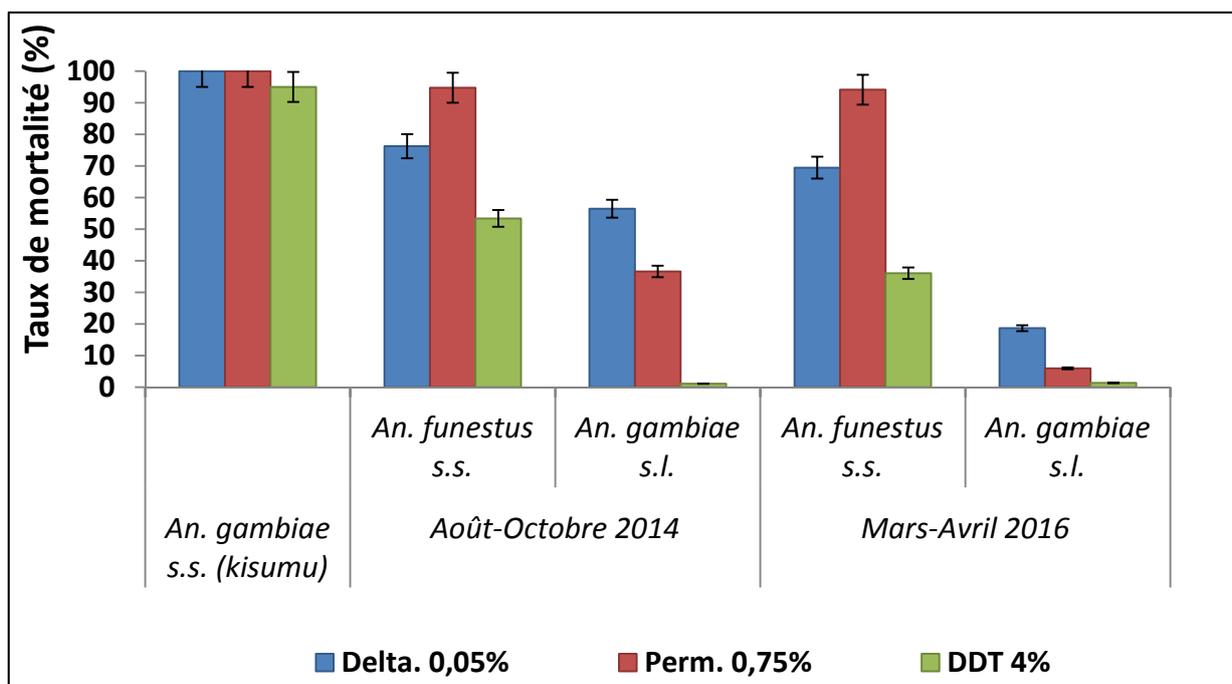


Figure 23: Taux de mortalité après 1h d'exposition aux insecticides et 24h d'observation chez les anophèles provenant d'Obout.

Delta : deltaméthrine 0,05% et **Perm :** perméthrine 0,75%.

III.1.5.2.2 Temps de knockdown

La résistance des spécimens d'*An. funestus s.s.* au DDT et aux pyréthriinoïdes pendant les deux périodes de notre enquête a été associée à une faible augmentation des temps de knockdown (tkd_{50} et tkd_{95}) (tableau VII). Le tkd_{50} le plus élevé a été enregistré avec le DDT entre mars et avril 2016 ; il a été de 2,4 fois plus élevé que celui de la souche Kisumu. Les ratios les plus élevés de tkd_{50} pour la perméthrine et la deltaméthrine par rapport à la souche Kisumu ont été respectivement de 1,4 et 2,2. Toutefois, les valeurs du ratio des tkd_{50} , pour ces insecticides, par rapport à la souche Kisumu sont inférieures à 2,5 et suggèrent que la mutation *kdr* n'est probablement pas responsable du phénotype observé.

En ce qui concerne les spécimens d'*An gambiae s.l.* d'Obout, nous n'avons pas noté les tkd_{50} et tkd_{95} pour le DDT pendant les deux périodes de notre enquête parce qu'ils ont été supérieurs à 2 heures ; Avec un ratio de 5,7 en 2014, les tkd_{50} et tkd_{95} de la perméthrine n'ont pas été notés en 2016. Cependant, avec la deltaméthrine, les tkd_{50} et tkd_{95} ont été respectivement inférieurs à 1 heure et 2 heures en 2014 avec un ratio 2 fois supérieur à celui de la souche Kisumu. En 2016, les tkd_{50} et tkd_{95} face à la deltaméthrine ont été respectivement supérieurs à 1 heure et 2 heures avec un ratio 5,8 fois plus élevé que celui de la souche Kisumu.

III.1.5.3 Evolution de la sensibilité de *Anopheles funestus* s.s. et de *Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides à Mebelong

III.1.5.3.1 Mortalité

Tout comme à Obout, les spécimens d'*An. funestus* s.s. de Mebelong étaient résistants aux trois molécules d'insecticides testées.

La mortalité de ces anophèles au cours des deux périodes de notre enquête est illustrée à la figure 22. Contrairement à Obout, on a noté une augmentation de la mortalité au DDT chez les spécimens d'*An. funestus* s.s. de Mebelong. Entre septembre et décembre 2014, le taux de mortalité a été de 81,02% (IC_{95%}: 73,25-89,4), caractérisant une résistance de cette espèce à ce composé. De novembre à décembre 2016, ce taux est passé à 97,2% (IC_{95%}: 81,72-114,77), indiquant que ces insectes ont une résistance probable au DDT. Cette variation du taux de mortalité au cours de ces deux périodes n'est pas statistiquement significative ($\chi^2 = 1,593$; P = 0,207). Une tendance similaire a été observée avec la deltaméthrine, avec un taux de mortalité qui est passé de 79,4% en 2014 à 94,04% en 2016 ($\chi^2 = 1,411$; P = 0,234).

Tout comme à Obout, la mortalité induite par la perméthrine chez les spécimens d'*An. funestus* s.s. est restée relativement stable entre les deux périodes d'échantillonnage puisque les valeurs du taux de mortalité étaient de 86,86% et 82,11% respectivement. En outre, le test de sensibilité effectué parallèlement chez les spécimens d'*An. gambiae* s.l. de Mebelong a révélé que la mortalité induite par le DDT chez *An. gambiae* s.l. était inférieure à 5% en 2014 et en 2016 (figure 24). Par contre, cette population a présenté une résistance croissante et significative (χ^2 ; P < 0,0001) à la perméthrine et la deltaméthrine entre ces deux périodes.

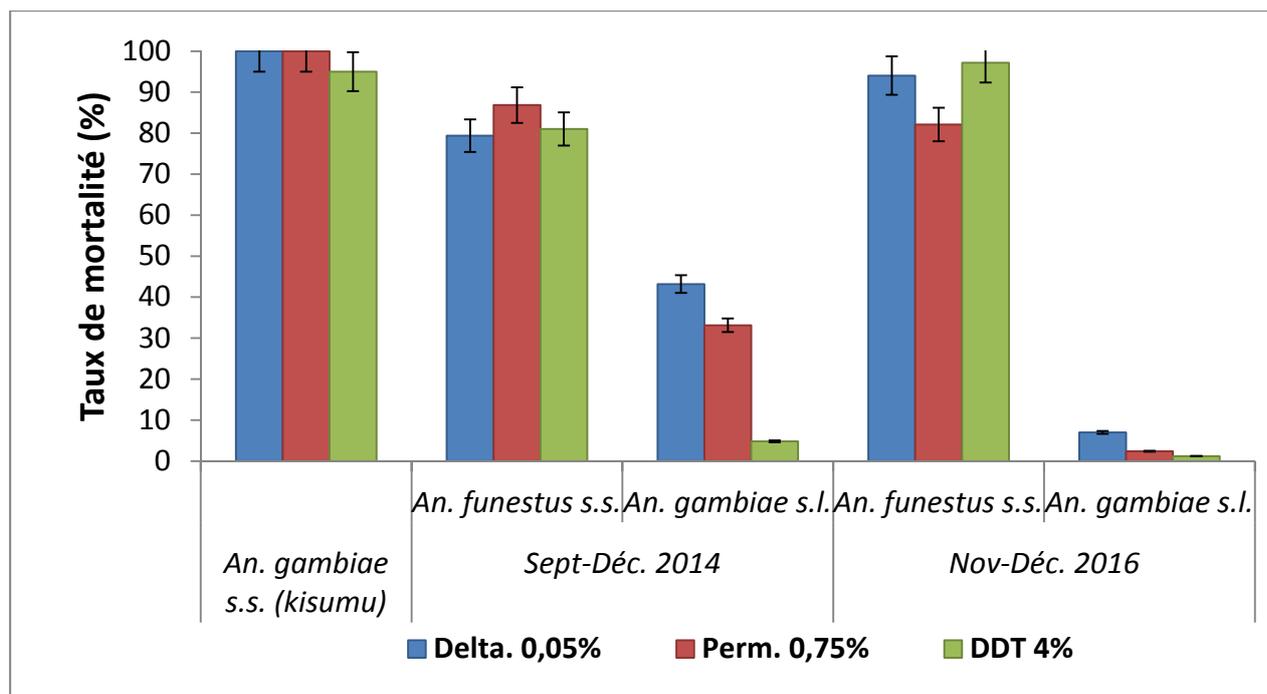


Figure 24: Taux de mortalité après 1h d'exposition aux insecticides et 24h d'observation chez les anophèles provenant de Mebelong.

Delta : deltaméthrine 0,05%, **Perm :** perméthrine 0,75%, **Sept-Déc :** septembre-décembre.

III.1.5.3.2 Temps de knockdown

La baisse de sensibilité des spécimens d'*An. funestus* s.s. au DDT et aux pyréthrinoïdes a été accompagnée d'une faible augmentation des temps de knockdown tkd_{50} et tkd_{95} (tableau VII). Tout comme à Obout, cette augmentation du temps de knockdown à Mebelong a été de moins de 2 fois supérieure par rapport à la souche Kisumu. Les ratios de tkd_{50} les plus élevés, soit 1,3 pour le DDT en 2014 et 1,4 pour la deltaméthrine en 2016, ont été enregistrés dans cette localité. Ainsi à Mebelong également, la mutation *kdr* ne semble pas être responsable du phénotype de la résistance observée chez *An. funestus* s.s.

Tout comme à Obout, nous n'avons pas noté les tkd_{50} et tkd_{95} pour le DDT chez les spécimens d'*An. gambiae* s.l. de Mebelong au mois de septembre-décembre 2014. Cependant, des ratios de 2 et 4,2 ont été enregistrés respectivement avec la deltaméthrine et la perméthrine. De novembre à décembre 2016, nous n'avons pas noté les tkd_{50} et tkd_{95} pour les trois insecticides parce qu'ils ont été largement supérieurs à 2 heures et traduisant une augmentation significative des temps de knockdown tkd_{50} et tkd_{95} chez ces individus.

Tableau VII : Temps de *knockdown* en minutes chez les spécimens sauvages d'*Anopheles funestus* s.s. d'Obout et de Mebelong en 2014 et en 2016

Périodes	Localités	Espèces	Insecticides	N	tkd ₅₀ (min)[IC ₉₅]	tkd ₉₅ (min)[IC ₉₅]	Rtkd ₅₀	Statut	
2014 Août-Octobre	Kisumu	<i>An. gambiae</i> s.s	DDT 4%	80	30,6[26,3-49]	49[45,7-54,4]	-	RP	
			Perm. 0,75%	120	21,2[16,1-25]	40[33,8-55,5]	-	S	
			Delta. 0,05%	100	18,1[17,6-18,9]	24,9[23,4-27,4]	-	S	
	Obout	<i>An. funestus</i> s.s	DDT 4%	103	52,6[48,7-57]	118,8[99,1-155,3]	1,7	R	
			Perm. 0,75%	152	17,2[16,8-17,7]	22,4[21,4-23,8]	0,8	RP	
			Delta. 0,05%	101	26,6[18,2-39,9]	55,2[37,7-214,7]	1,5	R	
		<i>An. gambiae</i> s.l.	DDT 4%	89	-	-	-	R	
			Perm. 0,75%	153	121,3[86-1197]	417,8[177,3-1801]	5,7	R	
			Delta. 0,05%	124	38,3[35-41]	71[65-81,4]	2	R	
	Sept.-Décembre	Mebelong	<i>An. funestus</i> s.s	DDT 4%	490	40,3[36-44,4]	64,1[48,8-390,5]	1,3	R
				Perm. 0,75%	502	13,8[8,5-17,8]	30,7[22,5-79,9]	0,7	R
				Delta. 0,05%	500	18,3[10,7-23,6]	43,3[36,3-55,9]	1	R
<i>An. gambiae</i> s.l.		DDT 4%	166	-	-	-	R		
		Perm. 0,75%	166	89,5[74,6-210,7]	353,5[172-2256,5]	4,2	R		
		Delta. 0,05%	176	37,1[25,3-42,9]	63,3[53,6-104,9]	2	R		
2016 Mars-Avril	Obout	<i>An. funestus</i> s.s	DDT 4%	735	74,6[61,5-198,5]	157,4[97,3-2585]	2,4	R	
			Perm. 0,75%	510	29,4[22,5-38,4]	41,6[32,1-52,8]	1,4	RP	
			Delta. 0,05%	573	39,6[20,6-54,1]	55,1[44,8-903,1]	2,2	R	
		<i>An. gambiae</i> s.l	DDT 4%	75	-	-	-	R	
			Perm. 0,75%	202	-	-	-	R	
			Delta. 0,05%	343	105,2[97,9-148,6]	246,7[168-522,8]	5,8	R	
	Nov.-Décembre	Mebelong	<i>An. funestus</i> s.s	DDT 4%	143	39,3[37,6-40,9]	63,4[59,6-68,8]	1,1	RP
				Perm. 0,75%	151	19,2[1-41]	54,4[0,8-73,8]	0,9	R
				Delta. 0,05%	151	26,2[8,8-77,7]	47,6[32,7-69,4]	1,4	RP
		<i>An. gambiae</i> s.l.	DDT 4%	51	-	-	-	R	
			Perm. 0,75%	82	-	-	-	R	
			Delta. 0,05%	100	-	-	-	R	

Delta : deltaméthrine 0,05% et **Perm** : perméthrine 0,75%, **tkd₅₀** : Temps de knockdown de 50% des populations sauvages, **tkd₉₅** : Temps de knockdown de 95% des populations, **IC₉₅** : Intervalle de confiance à 95%, **Rtkd₅₀** : Ratio du tkd₅₀ de la souche sauvage sur celui de la souche Kisumu, **Août-Oct** : août- octobre, **Sept.** : Septembre, **Nov.** : novembre ; **min** : minutes, **S** : sensible, **RP** : résistance probable, **R** : résistant, - : valeurs non calculables, **Ann** : année, **N** : nombre total de moustiques testés.

III.1.6 Susceptibilité d'*Anopheles funestus* s.s. de Mebelong et d'*Anopheles coluzzii* de Yaoundé à l'infection par *Plasmodium falciparum* dans les conditions de laboratoire

III.1.6.1 Prévalence de portage des trophozoïtes et des gamétocytes chez les enfants examinés à Okola

Au total 2928 enfants âgés de 5 à 11 ans ont été examinés dans 15 écoles primaires de la ville d'Okola pour la détection de l'infection à *P. falciparum* pendant 3 ans (2015, 2016 et 2017). La prévalence globale des stades asexués (trophozoïtes) de ce parasite a été de 43,20% (IC_{95%} = 40,86-45,65) ; de plus aucune différence significative n'a été observée entre les valeurs des taux entre les trois années d'étude ($\chi^2 = 4,662$; P = 0,0972). Chez les enfants infectés, la charge parasitaire a varié de 1+ à 4+, la majorité soit 24,21% d'entre eux appartenant au groupe 1+ et soit 15,51% au groupe 2+ (tableau VIII).

Tableau VIII : Résumé des données sur l'enquête parasitologique chez les enfants examinés à Okola

Année	Nombre d'enfants Examinés	Nombre d'enfants par catégorie de porteurs des trophozoïtes				Nombre total de porteurs des trophozoïtes (%)	Nombre total de porteurs des gamétocytes (%)
		+	++	+++	++++		
2015	1324	287	182	65	10	544 (41,09)	123 (9,29)
2016	852	270	130	31	1	378 (44,36)	103 (12,09)
2017	752	152	142	43	6	343 (45,61)	75 (9,97)
Total	2928	709	454	139	17	1265 (43,20)	301 (10,28)

+ : 1-10 trophozoïtes/traversée (1 à 50 trophozoïtes/ μ l) ; ++ : 1-10 trophozoïtes/traversée (51 à 500 trophozoïtes/ μ l) ; +++ : 1-10 trophozoïtes/traversée (501 à 5000 trophozoïtes/ μ l) ; ++++ : 11-100 trophozoïtes/traversée (5001 à 50000 trophozoïtes/ μ l).

III.1.6.2 Paramètres de l'infection chez les femelles sauvages d'*Anopheles funestus* s.s.

Quatorze essais d'infection expérimentale des spécimens d'*An. funestus* s.s. ont été réalisés en utilisant du sang provenant de différents porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*. Sur les 9728 femelles d'*An. funestus* s.s. exposées, 2518 se sont nourries à travers la membrane artificielle de Parafilm, ce qui correspond à un taux de gorgement global de 25,88% (2518/9728). Cependant, ce taux de gorgement a varié considérablement selon les essais allant de 18 à 47%. Les gamétocytes de *P. falciparum* ont été infectants pour les femelles d'*An. funestus* s.s. dans 9 (64,29%) des 14 expériences menées avec un taux d'infection variant de 6,3 à 100%. 1165 oocystes ont été dénombrés dans les estomacs

infectés et le nombre global médian a été de 13 oocystes/femelle pour une moyenne = 7,67 oocystes/estomac (tableau IX). En prenant individuellement chaque essai, le nombre d'oocystes observés par estomac a varié de 1 à 139 et le nombre médian d'oocystes de 1 à 60 (IC_{95%} : 1-60).

Tableau IX : Résumé des paramètres de l'infection expérimentale chez *Anopheles funestus* s.s.

Ess.	Espèces	Densité gaméto-cytaire (µl/sang)	Nombre de moustiques		Taux d'infection (%)	Nombre total d'oocystes	Variation du nombre d'oocystes par esto.	Nombre moyen d'oocystes (IC _{95%})
			disséqués	infectés				
1	<i>An. funestus</i> s.s.	-	32	11	34,4	45	1-15	4,1(3-6)
	<i>An. coluzzii</i>	-	21	14	66,7	105	1-22	7,5(6-9)
2	<i>An. funestus</i> s.s.	-	36	22	61,1	162	1-18	7,4(6-9)
	<i>An. coluzzii</i>	-	57	23	40,4	57	1-9	2,5(2-3)
4	<i>An. funestus</i> s.s.	-	32	2	6,3	4	1-3	2(1-5)
	<i>An. coluzzii</i>	-	83	16	19,3	35	1-5	2,2(2-3)
5	<i>An. funestus</i> s.s.	368	39	6	15,4	9	1-4	1,5(1-3)
	<i>An. coluzzii</i>	368	73	5	6,9	6	1-2	1,2(0,4-3)
6	<i>An. funestus</i> s.s.	-	24	3	12,5	4	1-2	1,3(0,4-3)
	<i>An. coluzzii</i>	-	102	19	18,6	36	1-6	1,9(1-3)
9	<i>An. funestus</i> s.s.	96	58	42	72,4	241	1-16	5,7(4-6)
	<i>An. coluzzii</i>	96	113	84	74,3	472	1-18	5,6(5-6)
10	<i>An. funestus</i> s.s.	32	43	14	32,6	20	1-2	1,4(1-2)
	<i>An. coluzzii</i>	32	21	4	19,1	4	1	1(0,3-3)
12	<i>An. funestus</i> s.s.	880	9	9	100	539	1-139	59,9(55-65)
	<i>An. coluzzii</i>	880	40	39	97,5	3781	1-351	96,9(94-100)
13	<i>An. funestus</i> s.s.	80	105	37	35,2	96	1-8	2,6(2-3)
	<i>An. coluzzii</i>	80	16	6	37,5	12	1-3	2(1-4)
Total	<i>An. funestus</i> s.s.	-	378	146	38,62	1120	1-139	7,67(6,6-7,4)
	<i>An. coluzzii</i>	-	526	210	39,92	4508	1-351	21,5(21-22)

Ess. : Essai, - : non quantifiée, **esto.** : estomac. La prévalence de l'infection a été calculée en divisant le nombre de moustiques infectés au stade oocyste par le nombre total de moustiques disséqués.

La densité gaméto-cytaire n'a été déterminée que pour 5 des essais d'infection réussie ; il a varié de 16 à 880 gaméto-cytes/µl de sang. La tendance générale montre que le taux d'infection et le nombre moyen d'oocystes dans les estomacs augmentent avec la densité gaméto-cytaire (figure 25). Toutefois, la corrélation rho (r_s) n'a été statistiquement significative qu'entre le taux d'infection et le nombre de gaméto-cytes par microlitre de sang (figure 25 A).

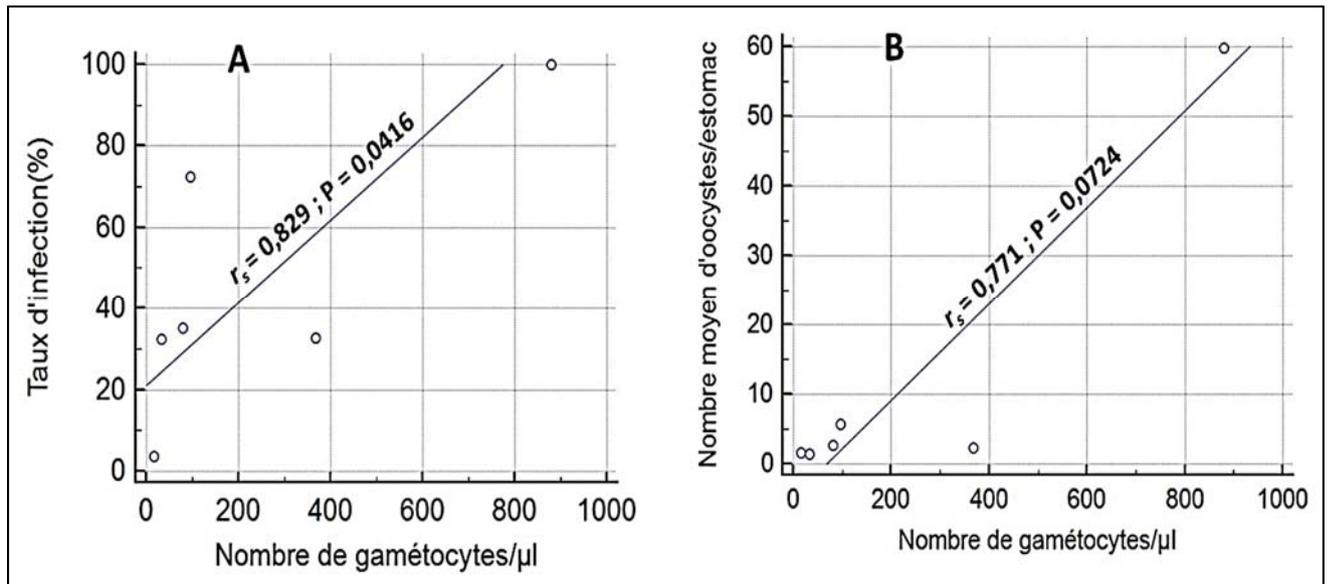


Figure 25: Régression linéaire entre les paramètres de l'infection chez *Anopheles funestus* s.s. de Mebelong.

A : taux d'infection en fonction de la densité du parasite dans le sang. **B :** nombre moyen d'oocystes/estomac en fonction de la densité du parasite par microlitre de sang.

III.1.6.3 Analyse comparative de la susceptibilité à l'infection entre *Anopheles funestus* s.s. de Mebelong et *Anopheles coluzzii* (souche Ngouso de laboratoire)

Simultanément, le même sang infecté de gamétocytes de *P. falciparum* a été utilisé pour nourrir les femelles d'*An. coluzzii* (souche Ngouso de laboratoire) dans 9 essais. Le taux de gorgement a été deux à trois fois plus élevé chez la souche de laboratoire *An. coluzzii* comparée à la souche sauvage d'*An. funestus* s.s. de Mebelong. Lorsqu'on analyse les essais qui ont réussi simultanément chez les deux espèces anophélienne (figure 26), ces dernières présentent une susceptibilité élevée et comparable à l'infection par *P. falciparum* ; le taux d'infection d'*An. funestus* s.s. a été de 38,62% (146/378) et le nombre médian d'oocystes 13 (moyenne 7,67 ; variation : 1-139). En parallèle, le taux d'infection d'*An. coluzzii* souche de laboratoire a été de 39,92% (210/526) et le nombre médian d'oocystes 32 (moyenne 21,5 ; variation : 1-351).

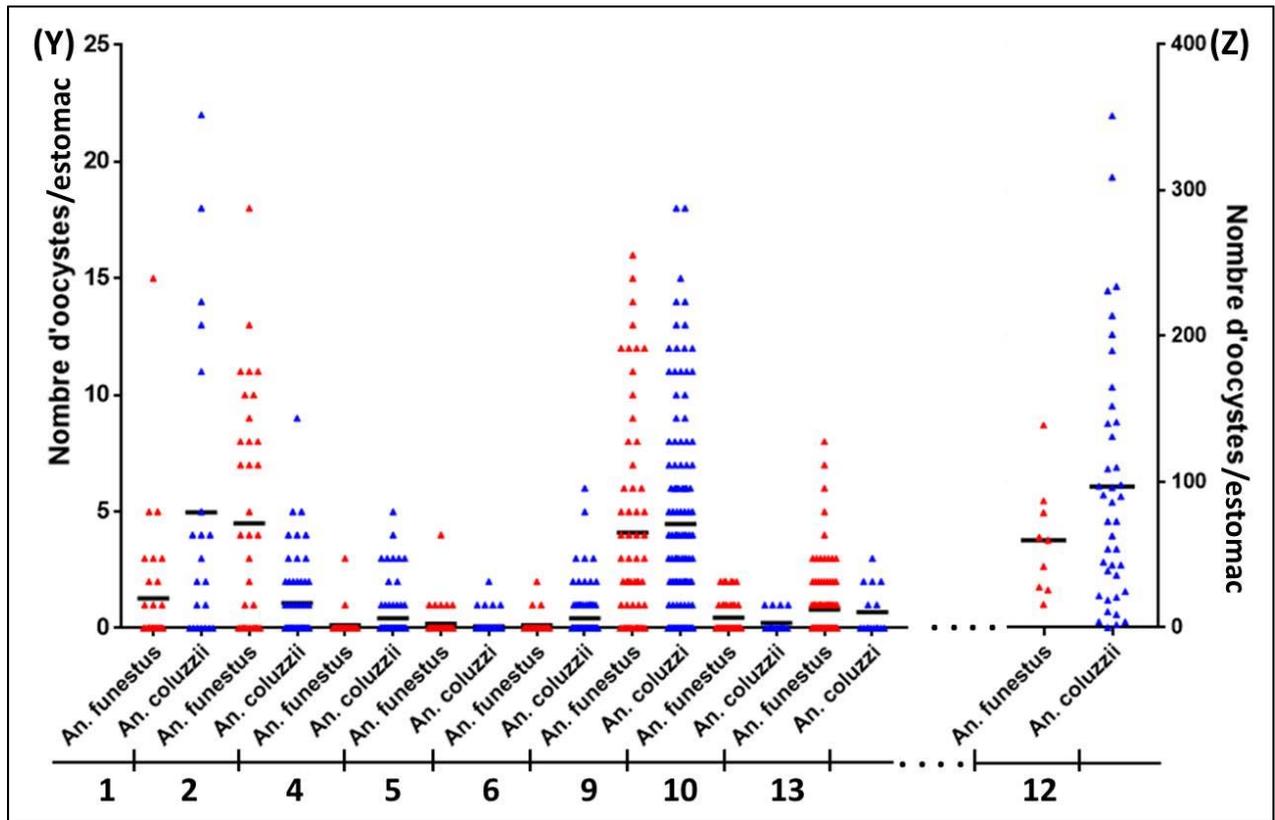


Figure 26: Variation du nombre d’oocystes dans les estomacs d’*Anopheles funestus* s.s. et d’*Anopheles coluzzii* (souche Ngouso de laboratoire).

Chaque triangle représente le nombre d’oocystes dans un estomac individuel. Les lignes pointillées sur l’axe X séparent l’essai 12 du reste pour mieux voir la variation du nombre des oocystes dans tous les cas. L’axe Y est lié aux essais 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 et 13 et l’axe Z à l’essai 12, pour lesquels un nombre très élevé d’oocystes dans les estomacs individuels a été enregistré.

III.1.6.4 Paramètres de l’infection chez les femelles sauvages d’*Anopheles coluzzii*

Comme chez *An. funestus* s.s., quatorze essais d’infection expérimentale des spécimens d’*An. coluzzii* ont été réalisés en utilisant du sang provenant de différents porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*. Au total 2311 femelles d’*An. coluzzii* ont été exposées aux sang de porteurs de gamétocytes et 423 se sont nourries à travers la membrane artificielle de Parafilm, ce qui correspond à un taux de gorgement global de 18,30% (423/2311). Les gamétocytes de *P. falciparum* ont été infectants pour les femelles sauvages d’*An. coluzzii* dans 11 (78,57%) des 14 expériences menées, avec un taux d’infection global de 22,7% (tableau X). Un total de 173 oocystes a été dénombré dans les estomacs infectés avec une moyenne de 5,4 oocystes/estomac (tableau X).

Tableau X : Résumé des paramètres de l'infection expérimentale chez *Anopheles coluzzii*

Essais	Densité gaméto. par μl sang	Nombre de moustiques		Taux d'infection (%)	Nombre total d'oocystes	Nombre d'oocystes/esto.	Nombre moyen d'oocystes/esto.
		disséqués	infectés				
1	10	8	1	12,5	3	3	3
2	21	2	1	50	3	1	3
3	22	13	3	23,1	4	1-2	1,3
4	24	7	0	0	0	0	0
5	29	17	2	11,8	3	1-2	1,5
6	37	8	3	37,5	3	1	1
7	40	31	2	6,5	3	1-2	1,5
8	44	7	0	0	0	0	0
9	56	4	0	0	0	0	0
10	106	5	1	20	1	1	1
11	113	9	4	44,4	13	1-6	3,3
12	174	7	6	85,7	29	1-9	4,8
13	212	11	3	27,3	10	1-5	3,3
14	285	12	6	50	101	1-39	16,8
Total		141	32	22,7	173	1-39	5,4

gaméto. : gamétocytaire, **esto. :** estomac. La prévalence de l'infection a été calculée en divisant le nombre de moustiques infectés au stade oocyste par le nombre total de moustiques disséqués.

Le nombre de gamétocytes par microlitre de sang a été déterminé pour tous les essais d'infection ; il a varié de 10 à 285 gamétocytes/ μl de sang. Une tendance générale a montré que le taux d'infection et le nombre moyen d'oocystes par estomac augmentaient avec la densité gamétocytaire (figure 27). Toutefois, une corrélation mais non significative a été obtenue entre le taux d'infection, le nombre moyen d'oocystes/estomac et le nombre de gamétocytes par microlitre de sang (figure 27 A et B).

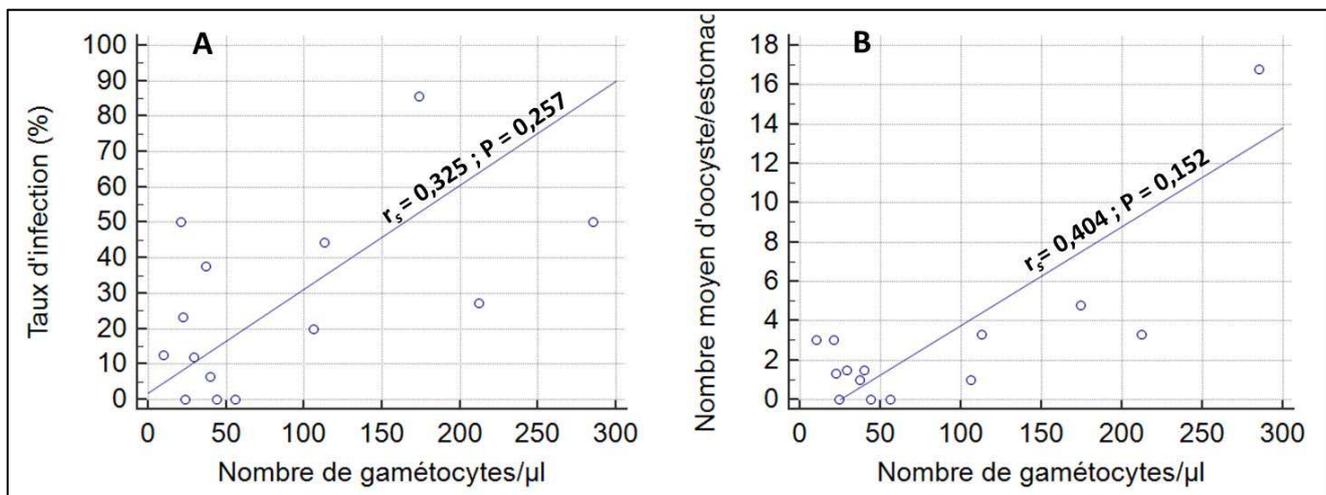


Figure 27: Régression linéaire entre les paramètres de l'infection chez *Anopheles coluzzii* de Yaoundé.

III.1.7 Influence de la résistance d'*Anopheles funestus* s.s. aux insecticides sur sa susceptibilité à l'infection par *Plasmodium falciparum*

III.1.7.1 Paramètres de l'infection en fonction du phénotype résistant

Avant de réaliser les infestations expérimentales, des tests de sensibilité à la perméthrine 0,75% ont été effectués pour sélectionner les moustiques résistants. Au total 3744 moustiques femelles âgés de 2 à 3 jours ont été exposés à ce produit, soit 1207 moustiques d'Obout et 2537 moustiques de Mebelong. Des taux de mortalité de 85,74% (1035/1207) et 74,04% (1980/2537) ont respectivement été enregistrés. Par la suite, les moustiques femelles survivants ont été utilisés pour réaliser les infestations expérimentales.

Au total 20 infestations expérimentales ont été effectuées à l'aide du sang provenant de 20 porteurs de gamétocytes différents. Globalement, le taux de gorgement à travers la membrane artificielle a été faible et n'a pas dépassé 30% dans tous les cas (min-max : 1%-29,19%). Cependant, on a noté une différence significative ($P = 0,0004$) de ce taux entre les moustiques considérés résistants (19,52%) et les témoins (29,19%). A Obout, le taux d'infection a été significativement différent ($P = 0,0457$), variant de 21,95% chez les moustiques de phénotype résistant à 43,31% chez les témoins. Par contre, aucune différence significative ($P = 0,0954$) n'a été observée pour ce même paramètre entre les moustiques résistants et témoins de Mebelong (tableau XI). En revanche l'intensité de l'infection, représentée par la charge moyenne en oocystes dans les estomacs, a été relativement plus élevée chez les moustiques résistants d'Obout (moyenne = $11,56 \pm 6$; témoins : moyenne = $6,78 \pm 1,6$) que chez ceux de Mebelong (moyenne = $3,68 \pm 1$; témoins : moyenne = $3,31 \pm 0,8$) puisque la différence n'était pas significative ($P > 0,05$). Lorsque les données ont été regroupées, le taux d'infection est apparu significativement différent ($P = 0,0126$) entre les deux groupes de moustiques (tableau XI), tandis que le nombre moyen d'oocystes par estomac est resté pratiquement identique puisque $P = 0,07$ (figure 28).

Tableau XI : Taux d'infection d'*Anopheles funestus* s.s. en fonction du phénotype

Phénotypes	Obout			Mebelong			Total		
	N _i	n _i	Taux d'infection (IC _{95%})	N ₂	n ₂	Taux d'infection (IC _{95%})	N	n	Taux d'infection (IC _{95%})
Résistant	41	9	21,95% (10,04-41,67)	54	22	40,74% (25,53-61,68)	95	31	32,63% (22,17-46,32)
Témoin	254	110	43,31% (35,59-52,2)	309	183	59,22% (50,95-68,45)	563	293	52,04% (46,25-58,36)
P-value			0,0457			0,0954			0,0126

N_i : nombre de moustiques disséqués dans la localité *i* ; n_i : nombre de moustiques infectés dans la localité *i* ; N : nombre total de moustiques disséqués ; IC : intervalle de confiance.

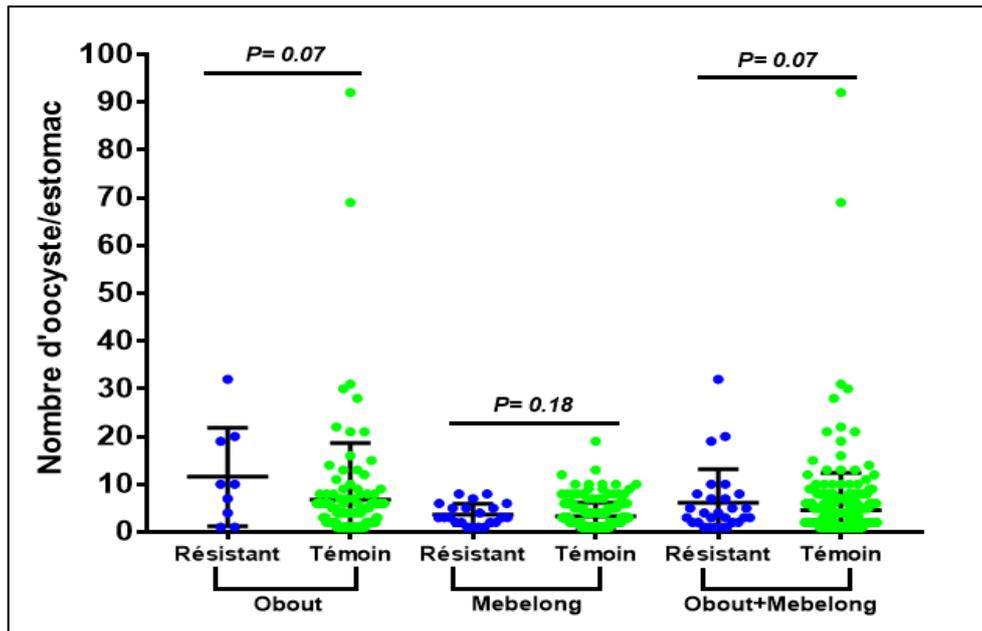


Figure 28: Variation du nombre d’oocystes dans les estomacs de différents groupes de moustiques.

III.1.7.2 Paramètres de l’infection en fonction des génotypes d’*An. funestus* s.s. au locus *GSTe2*

III.1.7.2.1 Fréquences génotypiques et alléliques d’*Anopheles funestus* s.s au locus *GSTe2* à Obout et à Mebelong

La mutation L119F-*GSTe2* a été recherchée chez les moustiques infectés et non infectés. Elle était représentée par 3 génotypes : les homozygotes résistants RR, les hétérozygotes RS et les homozygotes sensibles SS (figure 29).

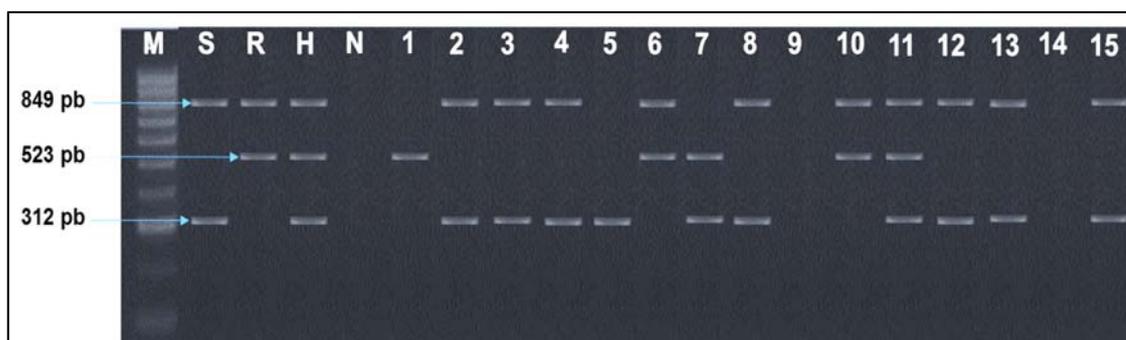


Figure 29: Photo de bandes sur gel d'agarose représentant les génotypes au locus L119F-*GSTe2* chez *Anopheles funestus* s.s..

M : marqueur de taille (100 pb) ; Contrôles positifs (**S** : Contrôle positif homozygote sensible ; **R** : Contrôle positif homozygote résistant ; **H** : Contrôle positif hétérozygote ; **N** : contrôle négatif ; **N° 1, 6 et 10** : échantillons homozygotes résistants ; **N° 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13 et 15** : échantillons homozygotes sensibles ; **N° 7 et 11** : échantillons hétérozygotes ; **N° 9 et 14** : échantillons non amplifiés.

Une différence a été notée dans la répartition de l'allèle L119F-*GSTe2* qui a été de 70% à Obout contre 30% à Mebelong (figure 30 A). Les génotypes homozygotes résistants (RR : 50%) et hétérozygotes (RS : 31%) ont été plus représentés à Obout, suggérant une résistance élevée de cette population d'*An. funestus* s.s. aux insecticides. Ces deux génotypes n'ont concerné que 42% des spécimens à Mebelong, ce qui traduit un niveau de résistance moins élevé qu'à Obout (figure 30 B).

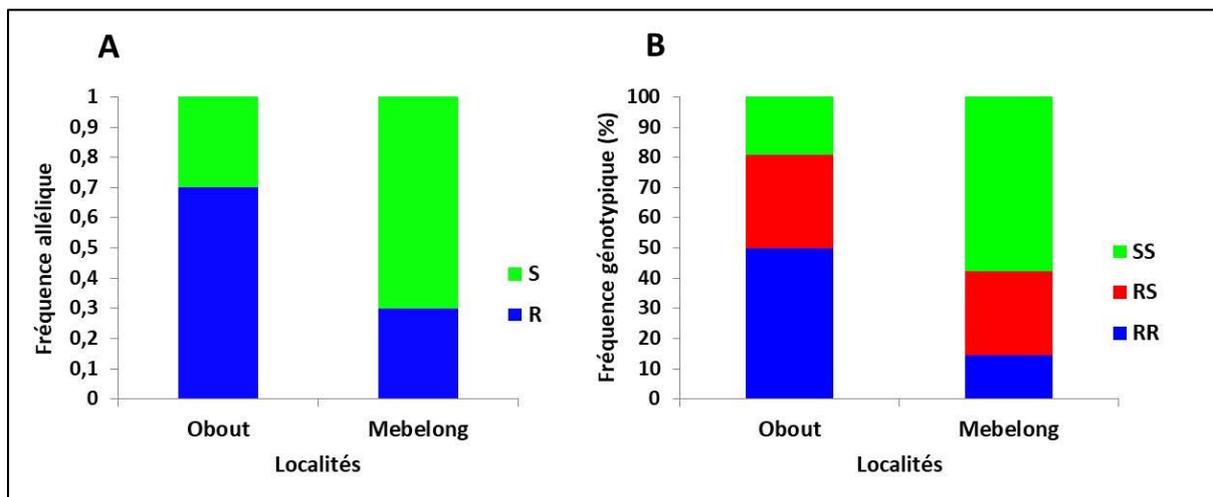


Figure 30: Fréquences alléliques (A) et génotypiques (B) au locus *GSTe2* à Obout et à Mebelong.

III.1.7.2.2 Relation entre la présence de la mutation L119F-*GSTe2* et l'infection par *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles funestus* s.s.

Globalement, la fréquence de l'allèle résistant L119F-*GSTe2* a été bien plus élevée ($P = 0,019$) chez les moustiques non-infectés (57%) comparés aux moustiques infectés (42%). Les taux d'infection des moustiques de génotypes RS (57,77%) et SS (62,05%) ont aussi été plus élevés (Fisher's exact test, $P = 0,037$ pour RR vs RS ; $P < 0,001$ pour RR vs SS ; $P = 0,329$ pour RS vs SS) que ceux des moustiques de génotype RR (40,64%) (figure 31). En outre, l'évaluation des rapports de côtes a montré que les moustiques des génotypes RS et SS étaient significativement plus infectés que ceux du génotype RR (tableau XII), ce qui laisse croire que les moustiques porteurs de l'allèle sensible S seraient plus susceptibles à l'infection par *P. falciparum*. Cependant, les résultats de l'intensité de l'infection (nombre d'oocystes par estomac) ne le confirment pas. En effet, les moustiques porteurs de l'allèle résistant ont été plus favorables au développement du parasite ($H = 12,18$; $P < 0,002$) que les moustiques sensibles (figure 32). En outre, il a été noté une variation des fréquences de différents génotypes en fonction des classes de production d'oocystes (figure 32). Dans l'ensemble, le nombre moyen d'oocystes trouvés dans un estomac était plus élevé chez les moustiques

hétérozygotes (moyenne : 6) et homozygotes résistants (moyenne : 10) comparés aux moustiques sensibles (moyenne : 3) comme le montre la figure 33.

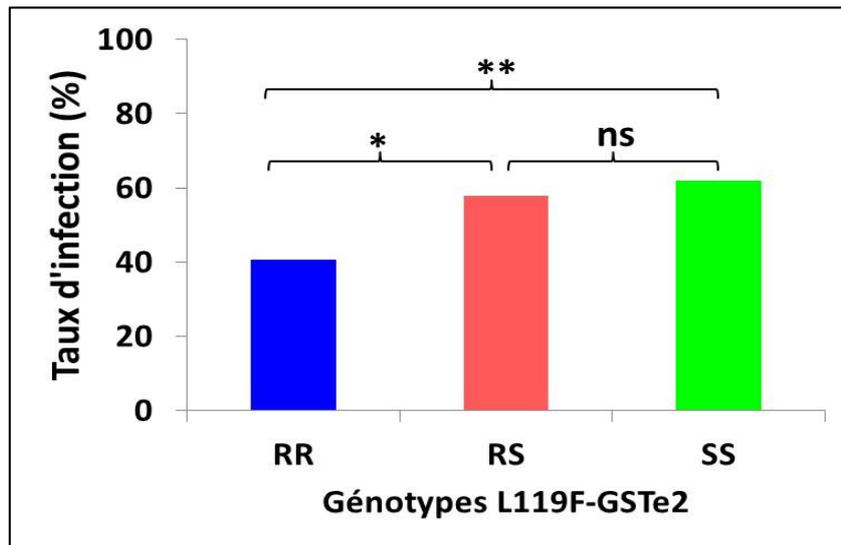


Figure 31: Taux d'infection par *Plasmodium falciparum* en fonction des génotypes *GSTe2*.

* : significatif ; ns : non significatif

Tableau XII : Comparaison des taux d'infection à *Plasmodium falciparum* entre moustiques de différents génotypes au locus *GSTe2*

	Génotypes au locus <i>GSTe2</i>		
	RR vs RS	RR vs SS	RS vs SS
Odds Ratio (IC _{95%})	2 (1,25-3,19)	2,39 (1,52-3,74)	1,19 (0,75-1,90)
P-value	0,004	0,0001	0,45

IC : Intervalle de confiance.

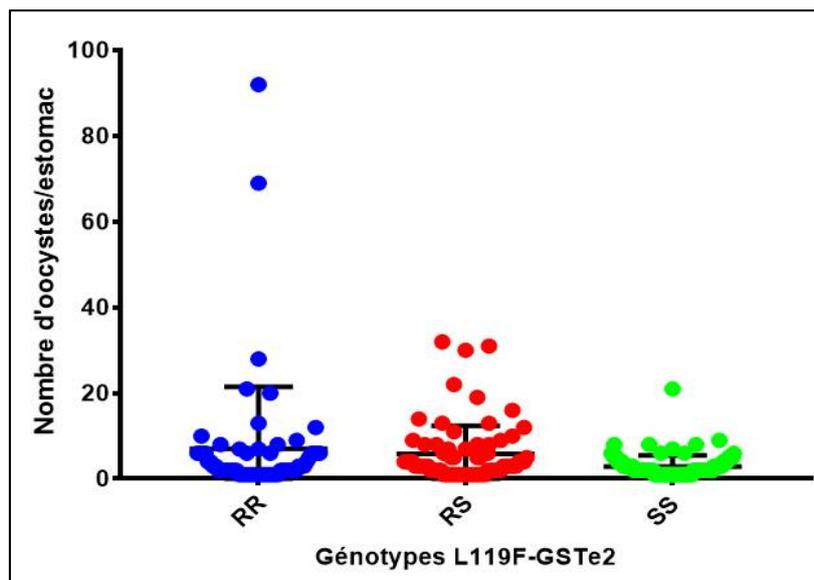


Figure 32: Nombre d'oocystes par estomac en fonction des génotypes au locus *GSTe2*.

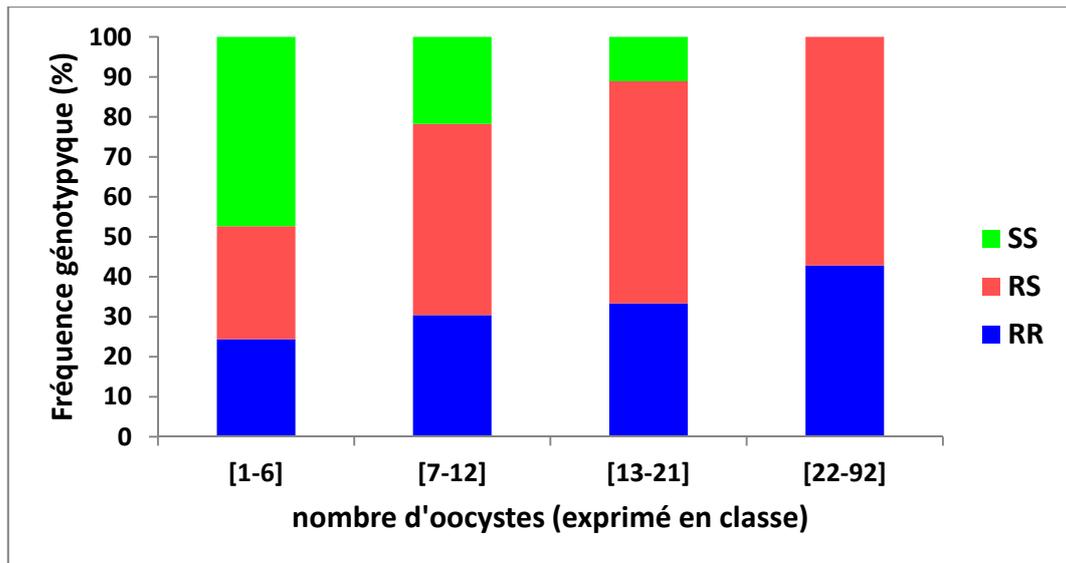


Figure 33: Fréquence génotypique au locus *GSTe2* en fonction du nombre d'oocystes par estomac

III.1.7.2.3 Relation entre le polymorphisme du gène *GSTe2* et l'infection d'*Anopheles funestus* s.s. par *Plasmodium falciparum*

Une séquence nucléotidique d'environ 787 paires de bases a été analysée chez 34 *An. funestus* s.s. dont 18 infectés par *P. falciparum* et 16 non-infectés. Ce fragment était constitué de 3 exons et 2 introns couvrant 92,6% de la séquence complète du gène *GSTe2* chez *An. funestus* s.s. (AFUN015809-RA). Le tableau XIII présente le nombre de séquences analysées en fonction du statut des moustiques, les paramètres de la diversité génétique ainsi que les résultats des tests de neutralité des mutations.

Globalement, la diversité du fragment *GSTe2* analysé était faible avec seulement 15 (1,91%) sites polymorphes dans le groupe non-infecté et 11 sites polymorphes dans le groupe infecté. Cela signifie que la diversité nucléotidique est un peu plus élevée chez les moustiques non-infectés ($\pi = 0,005$) que chez les infectés ($\pi = 0,003$). Le nombre moyen de différences entre les nucléotides des deux groupes, non-infectés et infectés, était de 3,667 et de 2,510 respectivement (tableau XIII). Cependant, aucune mutation fixe n'a été observée entre les séquences nucléotidiques des moustiques infectés comparées à celles des moustiques non-infectés.

Avec un total de 14 haplotypes observés et notés H1 à H14, la diversité haplotypique a été un peu plus élevée chez les moustiques non-infectés (0,883) que dans le groupe infecté (0,797) (tableau XIII). Six haplotypes (42,86%) étaient observés chez des spécimens non-

infectés (H9 à H14), tandis que 5 (35,71%) haplotypes étaient présents dans des échantillons infectés (H2 ; H3 ; H6 à H8). Seuls 3 (21,43%) des 14 haplotypes ont été partagés entre les deux groupes infecté et non-infecté (figure 34). L'haplotype résistant le plus fréquent a regroupé 13 des 34 séquences (9 du génotype RR et 4 du génotype RS) ; de plus il était partagé entre des échantillons non-infectés (61,54%) et infectés (38,46%). Les représentations du réseau haplotypique et de l'arbre phylogénétique à vraisemblance maximale n'ont pas révélé une ségrégation claire des haplotypes ou des individus de ces groupes (figure 34). En outre, le D de Tajima, bien que négatif, était statistiquement non significatif ($P > 0.05$) dans tous les groupes, ce qui suggère qu'il n'existe aucune preuve de la signature d'une sélection (tableau XIII).

Tableau XIII : Paramètres de la diversité génétique des séquences du gène *GSTe2* en fonction du statut d'infection

Statut des moustiques	Région codante				Région non-codante			Séquence entière	
	Exon1	Exon2	Exon3	Total	Intron1	Intron2	Total		
Infectés	N séq.	18	18	18	18	18	18	18	
	N ind.	9	9	9	9	9	9	9	
	Taille (pb)	107	202	309	643	72	72	144	787
	S	2	1	2	6	4	1	5	11
	H	3	2	3	7	5	2	6	8
	Hd	0,307	0,209	0,529	0,791	0,484	0,336	0,562	0,797
	π	0,003	0,001	0,002	0,002	0,009	0,005	0,007	0,003
	K	0,320	0,209	0,765	1,503	0,641	0,366	1,007	2,510
	Fu Li D	-0,552	0,667	0,885	0,577	-0,070	0,667	-0,359	0,164
	Fu Li F	-0,798	0,405	0,977	0,336	-1,008	0,708	-0,607	-0,121
	Tjima's D	-1,096	0,529	0,769	0,331	-1,347	0,488	-0,974	-0,786
Non-infectés	N séq.	16	16	16	16	16	16	16	
	N ind.	8	8	8	8	8	8	8	
	Taille (pb)	107	202	309	643	72	72	144	787
	S	1	2	3	6	3	6	9	15
	H	2	2	4	6	4	4	6	9
	Hd	0,325	0,125	0,692	0,842	0,517	0,442	0,675	0,883
	π	0,003	0,001	0,003	0,003	0,008	0,021	0,014	0,005
	K	0,325	0,250	1,058	1,633	0,575	1,458	2,033	3,667
	Fu Li D	0,688	-1,915	-0,039	-0,706	-1,122	0,612	-0,051	-0,369
	Fu Li F	0,627	0,060	0,117	-0,694	-1,262	0,306	-0,333	0,544
	Tjima's D	0,156	-1,498	0,495	-0,331	-1,055	-0,662	-0,919	-0,740

N séq : nombre de séquences analysées (2n) ; **N ind** : nombre d'individus ; **S** : nombre de sites polymorphes ; **h** : nombre d'haplotypes ; **dh** : diversité haplotypique ; π : diversité nucléotidique ; **k** :

nombre moyen de différences nucléotidiques entre séquences ; **D** : index de Tajima; **F** : index de Fu & Li.

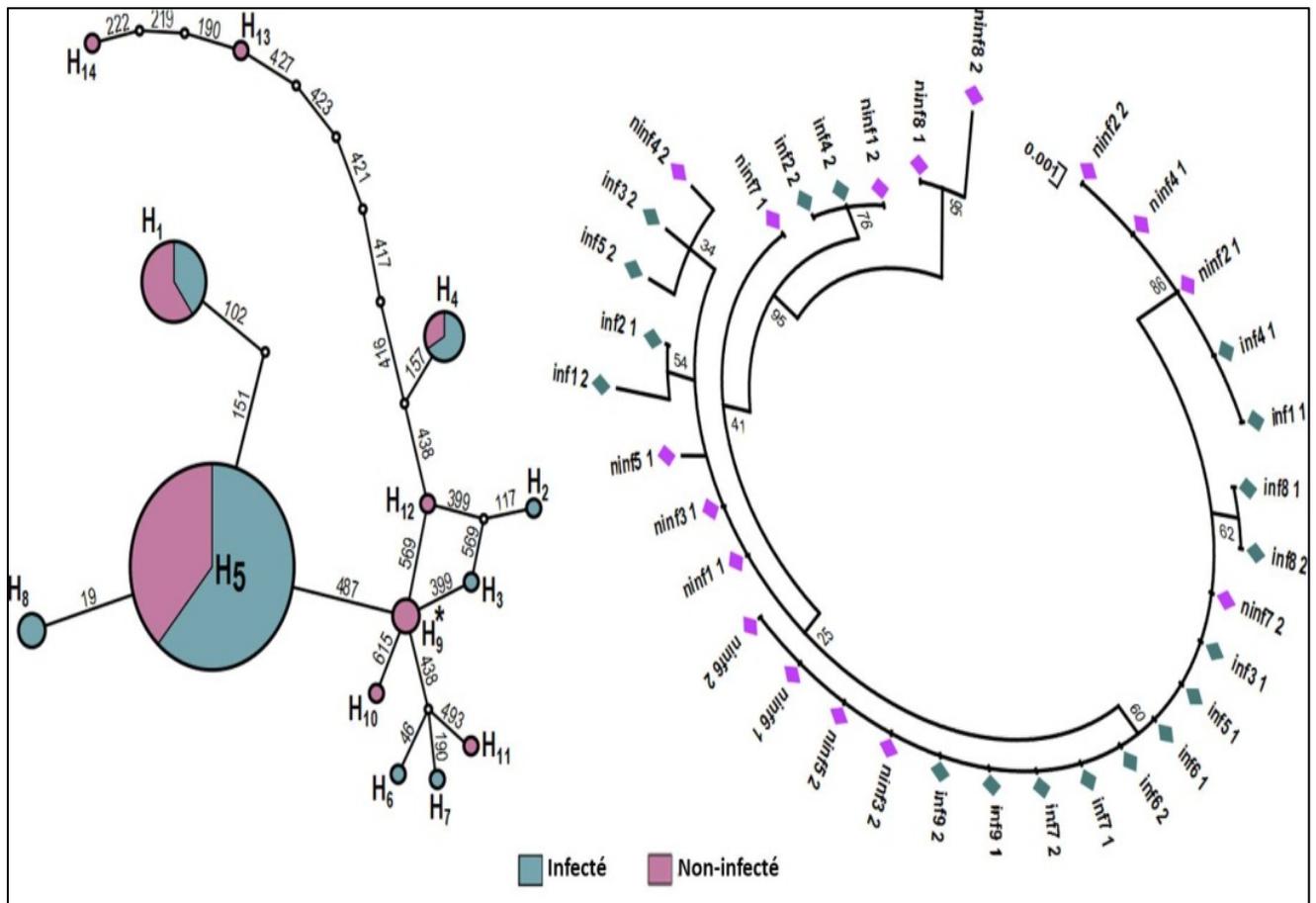


Figure 34: Réseau d'haplotypes du gène *GSTe2* (à gauche) et arbre phylogénétique des haplotypes (à droite) d'*Anopheles funestus* s.s. construit à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance.

III.1.8 Influence de la résistance d'*Anopheles coluzzii* aux insecticides sur sa susceptibilité à l'infection par *Plasmodium falciparum*

III.1.8.1 Paramètres de l'infection en fonction du phénotype résistant

Tout comme chez *An. funestus* s.s., avant de réaliser les infections expérimentales avec les spécimens sauvages d'*An. coluzzii*, des tests de sensibilité de ces moustiques à la perméthrine 0,75% ont été effectués pour sélectionner les moustiques résistants. Sur un total de 2367 moustiques femelles âgés de 2 à 3 jours et exposés à la perméthrine, 1083 ont été décomptés comme morts, soit un taux de mortalité de 45,76%. Par la suite, les moustiques survivants ont été utilisés pour réaliser les infestations expérimentales.

Sur les 3157 *An. coluzzii* femelles sauvages (incluant 750 moustiques survivants à la perméthrine et 2407 moustiques témoins) exposés au sang des porteurs de gamétocytes, seulement 912 s'y (204 résistants et 708 témoins) sont nourries. Aucune différence significative de taux de gorgement n'a été trouvée entre les moustiques considérés résistants (27,2%) à la perméthrine et les moustiques témoins (29,41%) ($P = 0,32$). Le taux d'infection a pratiquement été similaire entre les moustiques résistants 13,95% et les moustiques témoins soit 14,83% ($P = 0,93$). La variation du nombre moyen d'oocystes par estomac non plus n'a été significative ($P = 0,18$) entre les moustiques résistants soit 4,95 (variation : 1-8) et les témoins soit 3,98 (variation : 1-39) (figure 35).

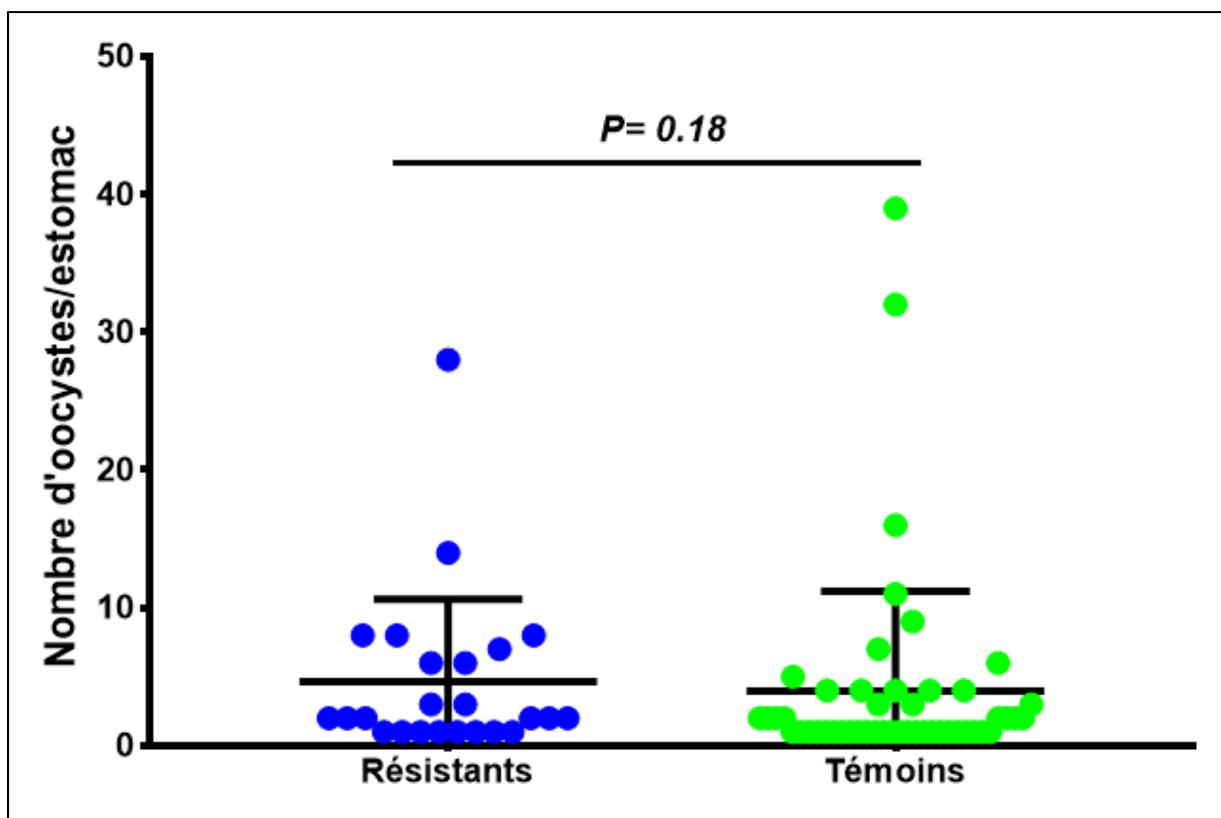


Figure 35: Variation du nombre d'oocystes dans les estomacs de différents groupes de moustiques.

Une analyse de régression a été réalisée pour évaluer la corrélation qui existerait entre la densité gamétocytaire et le taux d'infection au stade d'oocyste dans les groupes de moustiques résistants et des témoins. Une corrélation positive et significative a été enregistrée entre le taux d'infection et la densité de gamétocytes dans le groupe témoin ($P = 0,0027$) alors que, bien que positive, cette corrélation était non significative ($P = 0,076$) dans le groupe d'*An. coluzzii* résistants (figure 36A).

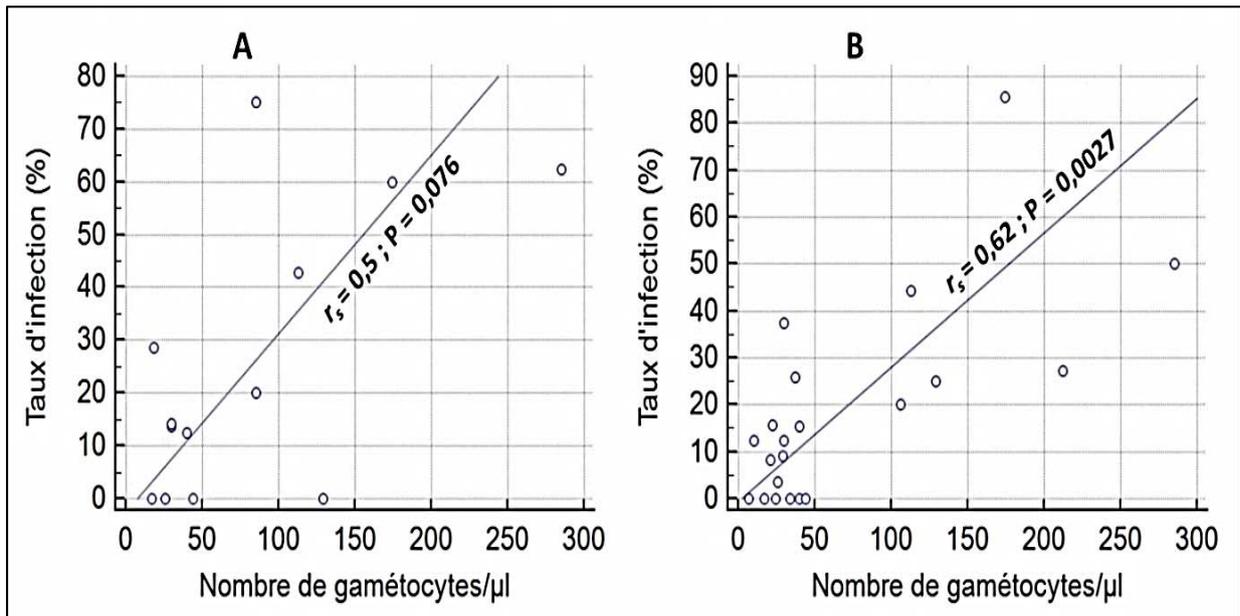


Figure 36: Régression linéaire entre le taux d'infection et le nombre de gamétocytes/μl de sang chez *Anopheles coluzzii* résistants (A) et témoins (B).

Par ailleurs, l'analyse de l'équation de régression entre le nombre d'oocystes et la densité des gamétocytes a montré une corrélation positive et significative ($P = 0,033$) dans le groupe de moustiques résistants et une corrélation positive mais non significative ($P = 0,079$) dans le groupe témoin (figure 36B). D'une manière générale, il semble que les moustiques porteurs de fortes charges en oocystes sont ceux qui se sont nourris avec du sang contenant de fortes densités de gamétocytes (figure 37A et B).

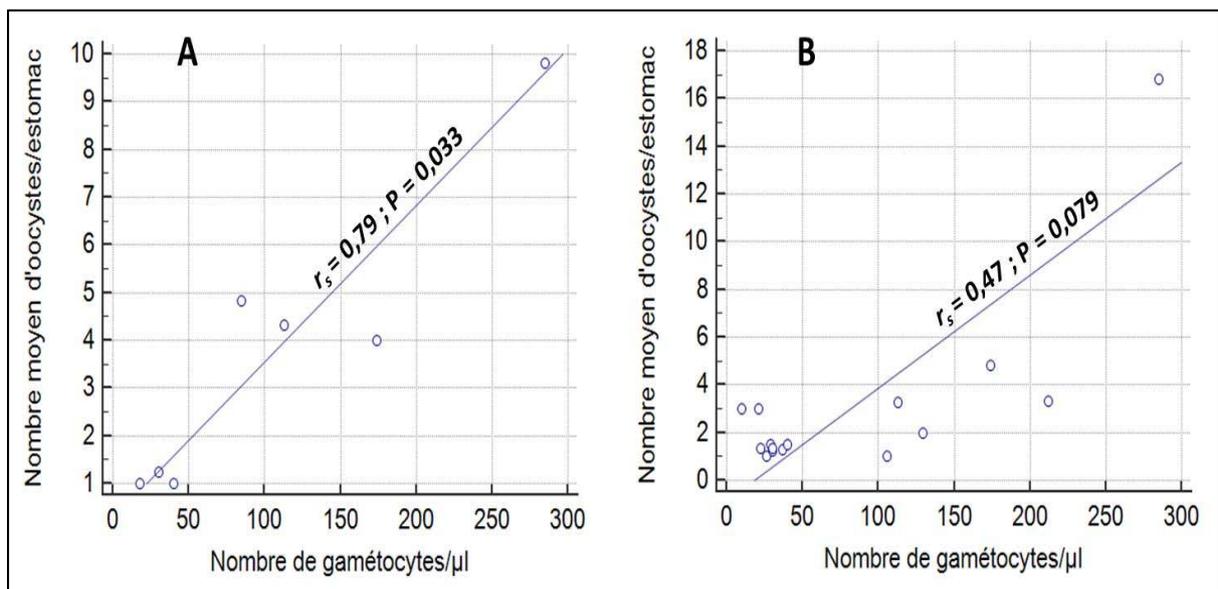


Figure 37: Régression linéaire entre le nombre moyen d'oocystes/estomac et le nombre de gamétocytes/μl de sang chez *Anopheles coluzzii* résistants (A) et témoins (B).

III.1.8.2 Paramètres de l'infection en fonction des génotypes d'*Anopheles coluzzii* au locus *kdr*

III.1.8.2.1 Fréquences génotypiques et alléliques au locus L1014F-*kdr* chez *Anopheles coluzzii*

La mutation L1014F-*kdr* (ou *kdr*-ouest) a été recherchée chez les moustiques infectés et non infectés. Elle était représentée par 3 génotypes : les homozygotes résistants RR, les hétérozygotes RS et les homozygotes sensibles SS (figure 38).

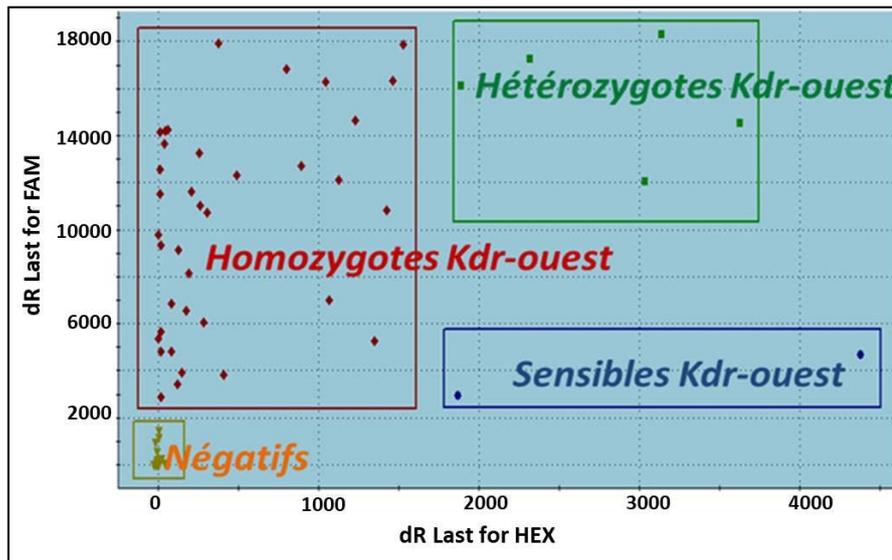


Figure 38: Nuage de points représentant les génotypes au locus L1014F-*kdr* chez *An. coluzzii*.

Les génotypes homozygotes résistants (RR : 64,33%) et hétérozygotes (RS : 28,07%) au locus L1014F-*kdr* ont été plus nombreux dans la ville de Yaoundé, suggérant l'existence d'une forte résistance de cette espèce d'*Anopheles* aux pyréthriinoïdes dans cette localité (figure 39).

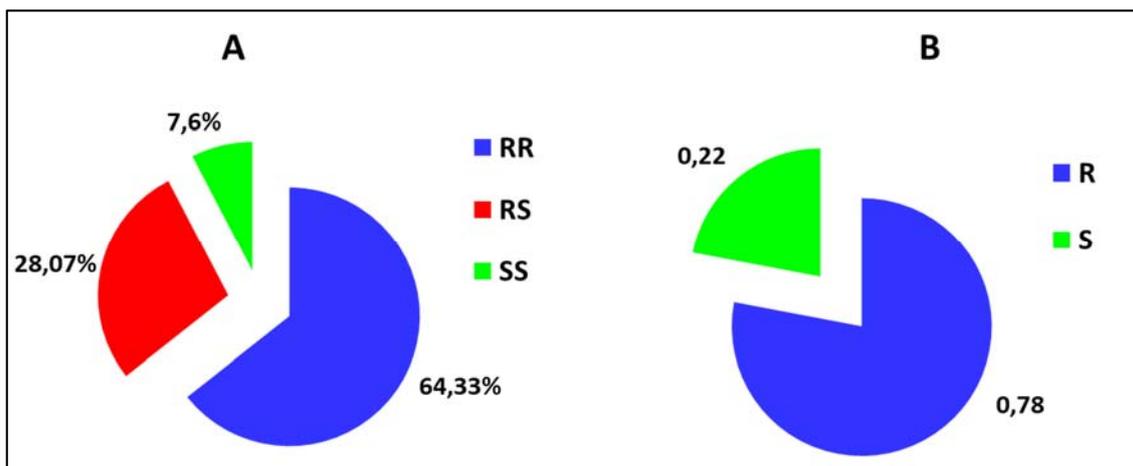


Figure 39: Fréquences génotypiques (A) et alléliques (B) au locus L1014F-*kdr* dans la ville de Yaoundé.

III.1.8.2.2 Relation entre la présence de la mutation L1014F-*kdr* et l'infection par *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles coluzzii*

Une répartition uniforme ($P = 0,86$) de l'allèle résistant L1014F-*kdr* a été observée chez les moustiques non-infectés (78%) et infectés (80%). Aucune association significative entre la présence d'allèles *kdr* et l'infection par *P. falciparum* non plus n'a été détectée ($P = 0,10$). De même, aucune association significative n'a été notée ($P > 0,10$) entre le taux d'infection et un génotype *kdr* quelconque (tableau XIV et figure 40).

Tableau XIV : Comparaison du taux de susceptibilité à *Plasmodium falciparum* entre les moustiques de différents génotypes au locus L1014-*kdr* chez *Anopheles coluzzii*

	Génotypes au locus L1014F- <i>kdr</i>		
	RR vs RS	RR vs SS	RS vs SS
ODDs Ratio (IC _{95%})	0,96 (0,46-1,98)	0,16 (0,02-1,59)	0,117 (0,02-1,73)
P-value	0,91	0,11	0,13

IC : Intervalle de Confiance.

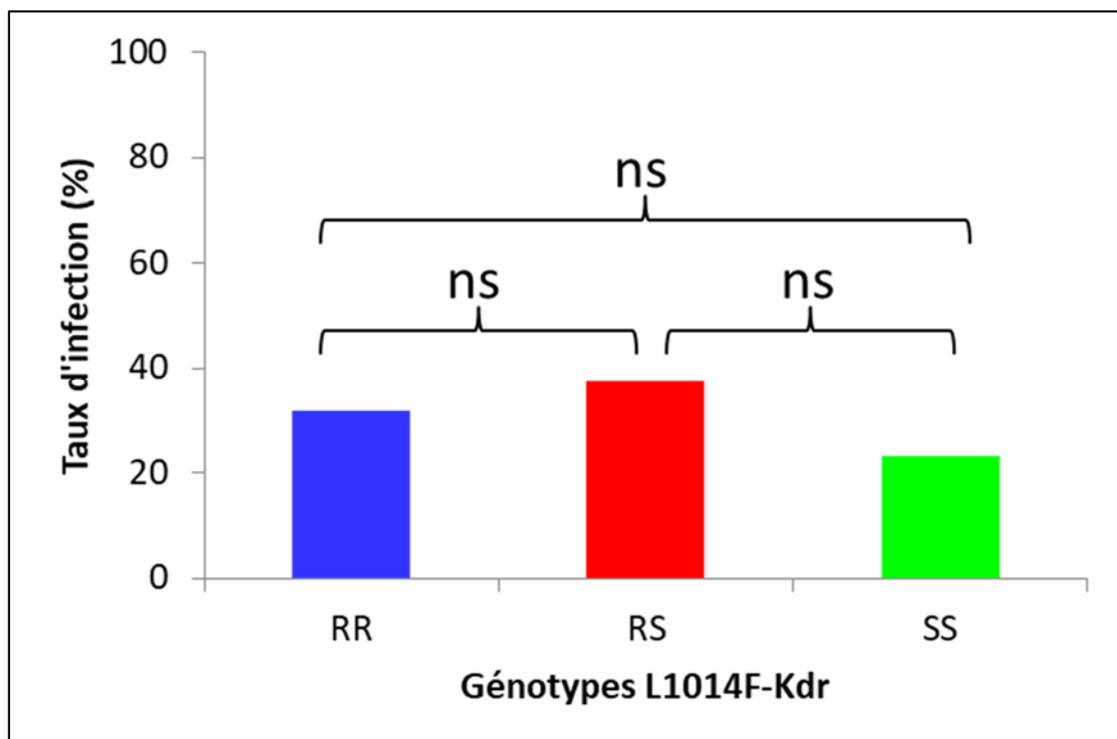


Figure 40: Taux d'infection par *Plasmodium falciparum* en fonction des génotypes L1014F-*kdr* chez *Anopheles coluzzii*.

ns : non significatif.

transmission du paludisme estimée à plus de 100 piqûres infectantes par homme et par an (Cohuet *et al.*, 2004 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006).

En captivité, moins de 10% des femelles d'*An. funestus* s.s. gorgées survivent en l'absence de jus sucré alors que plus de 95% réchappent si elles en ont accès. Ce besoin en énergie pourrait être lié au coût de l'adaptation à un milieu ne présentant pas les conditions optimales à leur vie. D'après Gary et Foster (2001), l'accès au jus sucré réduit considérablement le nombre d'œufs par ponte et la capacité vectorielle comme chez *An. gambiae* s.l. ; ceci a été notamment vérifié chez une autre espèce, *An. moucheti* s.s., au cours des études antérieures dans lesquelles le nombre moyen d'œufs par ponte et par femelle était de 91 ± 4 , valeur qui est largement inférieure aux 200 œufs par ponte et par femelle dans la nature (Wanson *et al.*, 1947).

En élevage, le développement préimaginal d'*An. funestus* s.s. a duré en moyenne 10 ± 1 jours, soit trois fois moins que les observations faites par Coetzee *et al.* (2004) et Dia *et al.* (1996), qui ont signalé une durée de développement larvaire de 30 jours. Ce résultat pourrait s'expliquer par une absence de pollution de l'eau des bacs d'élevage (eau changée tous les deux jours) du laboratoire et par la température (27°C et 30°C) de l'insectarium qui était contrôlée grâce à un radiateur.

III.2.2 Rôle vectoriel d'*Anopheles funestus* s.s. et d'*Anopheles gambiae* s.l. dans la transmission du paludisme

Les résultats entomologiques de notre étude ont montré que la faune anophélienne, tant à Mebelong (Région de l'Adamaoua) et qu'à Obout (Région du Centre), est représentée par le complexe *Anopheles gambiae* et le groupe *Anopheles funestus*. Les taxa du groupe *Anopheles funestus* identifiés à Mebelong étaient : *An. funestus* s.s (98,29%) et *An. leesoni* (1,71%). Ces observations sont en accord avec les études antérieures menées dans le grand nord par Cavalié et Mouchet (1961), Mouchet et Gariou (1961), Cohuet *et al.* (2003) et Antonio-Nkondjio *et al.* (2006). *Anopheles funestus* s.s (96,22%) et *An. leesoni* (3,38%) étaient également les deux taxa du groupe *An. funestus* identifiés à Obout ; ce résultat est conforme aux observations de Le Goff *et al.* (1993), Manga *et al.* (1997) et Antonio-Nkondjio *et al.* (2006) dans certaines zones de forêt du Cameroun. À Mebelong, *An. gambiae* s.s. a été la seule espèce identifiée du complexe *Anopheles gambiae* qui, pourtant, était représenté à Obout par *An. gambiae* s.s. (93,96%) et par *An. coluzzii* (3,45%). Cette observation confirme l'hypothèse selon laquelle *An. gambiae* s.s. prédomine en zone rurale tandis que *An. coluzzii*

est présent en zone urbaine et périurbaine (Kamdem *et al.*, 2012 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011). En effet, Mebelong et Obout sont des zones purement rurale et périurbaine respectivement.

L'étude des préférences trophiques a permis de déterminer l'hôte sur lequel les différentes espèces d'anophèles, notamment *An. funestus* s.s. et *An. gambiae* s.l. échantillonnées se sont nourries. Elle a révélé que les anophèles testés étaient fortement anthropophiles (100%). Nos données sont comparables à celles obtenues dans différentes régions du sud Cameroun (Cohuet *et al.*, 2003 ; Dia *et al.*, 2003 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006 et 2009b ; Awono-Ambene *et al.*, 2009). Il faut toutefois noter que l'analyse des préférences trophiques peut être influencée par la méthode d'échantillonnage utilisée (Garret, 1964 ; Dia *et al.*, 2001). Au cours de notre étude, l'origine du repas de sang a été déterminée pour quelques femelles d'anophèles collectées par aspiration intradomiciliaire. Cette méthode peut présenter un biais car elle ne permet pas la capture de tous les moustiques se reposant dans les maisons. Par ailleurs, nous n'avons pas pu collecter les moustiques se reposant dans les abris à l'extérieur des habitations. Notre méthode d'échantillonnage mérite donc d'être associée à d'autres techniques qui prennent en compte la faune exophage et exophile. Toutefois, puisque seule une fraction de la population de moustiques qui vient au contact de l'homme intervient dans la transmission du *Plasmodium*, nos observations gardent une valeur épidémiologique.

Le degré d'implication d'*An. funestus* s.s. dans la transmission du *Plasmodium* a été étudié et comparé à celui d'*An. gambiae* s.l. dans 2 localités du Cameroun : Mebelong et Obout. L'estimation de la prévalence de l'infection des anophèles a été faite par la technique ELISA qui permet de détecter la présence de la protéine circumsporozoïte chez le moustique. Cette technique est, de nos jours, la plus utilisée parce qu'elle est hautement sensible et spécifique, et permet de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois. Cependant, il a été démontré qu'elle surestime le taux d'infection de 1,1 à 1,9 fois comparativement à la technique classique de dissection des glandes salivaires (Beier *et al.*, 1990 ; Adungo *et al.*, 1991 ; Fontenille *et al.*, 2001). Pour limiter cette surestimation du taux d'infection par la méthode ELISA, la recherche de la protéine circumsporozoïte de *Plasmodium* est souvent faite uniquement dans la tête et le thorax de chaque anophèle. Dans notre étude, seule la présence de *P. falciparum*, l'espèce la plus répandue en Afrique subsaharienne (WHO, 2018 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019) a été recherchée. En effet, cette espèce est présente chez 80 à 95% des sujets parasités (Molez & Baudon, 1984 ; Mouchet *et al.*, 2004) et la protéine

circumsporozoïte a été retrouvée chez plus de 98% des moustiques porteurs de *Plasmodium* au cours des études antérieures menées en Afrique Centrale et de l'Ouest (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2003 ; Dia *et al.*, 2003). Les deux taxa, *An. funestus* s.s. et *An. gambiae* s.l., testés et trouvés infectés ont rendu des prévalences d'infection élevées avec des valeurs globales de 6,86% et 12,66% respectivement. Ces deux taxa sont reconnus comme les vecteurs majeurs de paludisme en Afrique subsaharienne (Fontenille *et al.*, 2003 ; Mouchet *et al.*, 2004). Toutefois, des prévalences d'infection similaires ont déjà été rapportées chez ces espèces au cours des études antérieures (Shililu *et al.*, 1998 ; Dia *et al.*, 2003 ; Cohuet *et al.*, 2004 ; Adja *et al.*, 2006 et 2011 ; Mulamba *et al.*, 2014). Les valeurs de l'indice circumsporozoïtique d'*An. funestus* s.s. ont varié de 4,66% à Mebelong à 10,4% à Obout. Dans l'ensemble, elles sont restées dans la gamme de celles rapportées par Cohuet *et al.* (2004) au Cameroun, Hunt *et al.* (2010) au Malawi, Kloke *et al.* (2011) au sud du Mozambique, Riveron *et al.* (2015) au Malawi. Cependant, ces valeurs de l'indice circumsporozoïtique étaient souvent inférieures à 8% obtenu par Djouaka *et al.* (2016) au sud-ouest du Nigeria et à 12,5% obtenu par Riveron *et al.* (2016) au sud du Ghana. Ces différences peuvent être dues à la technique utilisée pour la détermination de l'infection chez les anophèles. En effet, les auteurs sus-cités ont employé la méthode *TaqMan* qui détecte les antigènes de tous les stades parasitaires chez le moustique ; cette méthode a peut-être surestimé l'infection contrairement à la technique ELISA qui détecte la protéine circumsporozoïtique uniquement dans la tête et thorax de l'anophèle. Les valeurs moyennes de l'indice circumsporozoïtique enregistrées chez *An. gambiae* s.l. dans notre étude (5,2 % à Mebelong et 13,69% à Obout) sont comparables à celles obtenues par Githeko *et al.* (1993) à Miwani (6,0 %) et par Beier *et al.* (1990) à Kisian (5,5%) et à Saradidi (13,1 %) respectivement.

III.2.3 Sensibilité d'*Anopheles funestus* s.s. et d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides

L'évaluation de la sensibilité des populations de moustiques vecteurs de *Plasmodium*, en particulier dans les régions où cette maladie est endémique, comme au Cameroun, est essentielle pour déterminer les stratégies appropriées de gestion de la résistance. Notre étude a révélé une résistance élevée et multiple des populations d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l. d'Obout et de Mebelong aux principaux insecticides utilisés en santé publique. Ceci est très préoccupant en raison du nombre limité des classes d'insecticides disponibles pour les MILD et les PID. Au Cameroun, la plupart des études sur la résistance des moustiques aux insecticides ont été concentrées sur *An. gambiae* s.l. avec moins d'intérêt sur *An. funestus* s.s.

qui est pourtant l'un des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique subsaharienne (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017).

Les populations d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l. d'Obout et de Mebelong ont présenté une résistance élevée au DDT. Avant d'entreprendre cette étude, il n'y avait pas de rapport antérieur sur le statut de la résistance des vecteurs du paludisme à Obout et à Mebelong. Le niveau de résistance au DDT (53%) observé à Obout est similaire à celui notée par Menze *et al.* (2016) à Gounougou au Cameroun et Sangba *et al.* (2016) en République Centrafricaine. Ces niveaux de résistance au DDT sont relativement moins élevés que ceux qui ont été décrits en Ouganda et au Kenya, soit 40 à 42% de mortalité respectivement (Mulamba *et al.*, 2014), et relativement plus élevés que celui trouvé au Malawi, soit 69,9% de mortalité (Riveron *et al.*, 2015). Cependant, bien que le niveau de résistance au DDT a augmenté au fil du temps à Obout, passant de 53% de mortalité en 2014 à 36% en 2016, il est 3 à 5 fois moins élevé que ce qu'ont rapporté Riveron *et al.* (2016) au Ghana soit 17% de mortalité, Djouaka *et al.* (2016) au Nigeria et au Benin soit 10% et 9% de mortalité respectivement. La forte résistance d'*An. funestus* s.s. et de *An. gambiae* s.l. au DDT enregistrée dans ces trois pays et maintenant au Cameroun (Obout) pourrait résulter d'une pression sélective croissante due à l'utilisation des moustiquaires imprégnées et des pesticides en agriculture (Nwane *et al.*, 2009 ; Tene *et al.*, 2013 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011). De plus, cette résistance élevée et probable au DDT notée dans notre étude pourrait dépendre de l'effet résiduel d'un long recours historique à cette famille d'insecticides (organochlorés) dans l'agriculture. L'augmentation des niveaux de résistance chez les populations d'*An. funestus* s.s. couplée à la résistance extrêmement élevée aux pyréthrinoïdes et au DDT décelée chez *An. gambiae* s.l. dans nos localités d'étude, est préoccupante pour l'efficacité des insecticides utilisés dans la lutte antivectorielle au Cameroun (Etang *et al.*, 2007 ; 2009 ; 2013 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Des observations similaires de renforcement de la résistance aux insecticides ont récemment été faites chez des populations d'*An. gambiae* s.l. du Ghana (Riveron *et al.*, 2016) et du Burkina Faso (Edi *et al.*, 2014 ; Ibrahim *et al.*, 2016).

L'origine de la résistance des vecteurs aux insecticides pourrait aussi relever de leur utilisation dans la lutte contre les ravageurs (Reid *et al.*, 2016). Lors de l'échantillonnage des moustiques à Obout, nous avons noté que certains habitants se servaient à domicile des produits agrochimiques contre les ravageurs de tomates pour contrôler les insectes nuisibles tels les cafards, les termites... Cette pratique pourrait contribuer à induire une forte pression

sélective. L'utilisation indiscriminée des produits agrochimiques par les agriculteurs produit également des résidus chimiques et d'autres polluants environnementaux qui sont déversés dans les collections d'eau (sites de reproduction des moustiques). Ce sont des xénobiotiques qui exercent une sélection de la résistance chez les moustiques aux stades larvaires (Akogbéto *et al.*, 2006 ; Philbert *et al.*, 2014 ; Tene *et al.*, 2012 ; Antonio-Nkondjio *et al.* 2014). C'est probablement le cas chez *An. funestus* s.s. qui se développe dans les mares d'eau permanentes. De ce fait, il devient important de déterminer comment cette espèce a développé une résistance à cette famille d'insecticides, et d'autres, en enquêtant sur sa propagation dans différentes régions géographiques du Cameroun.

La résistance d'*An. funestus* s.s. aux pyréthriinoïdes a été souvent probable et absolue à Obout et à Mebelong. L'évaluation de la susceptibilité des moustiques à ces composés est importante parce qu'ils sont les seules molécules homologuées par l'OMS pour l'imprégnation des moustiquaires (WHO, 2016). Les mortalités de ces moustiques au contact de la perméthrine et de la deltaméthrine ont été notamment plus élevées que celles signalées par Menze *et al.* (2016) au Nord du Cameroun, mais 4 à 10 fois plus élevées que celles obtenues par Riveron *et al.* (2016) au Ghana et Sangba *et al.*, (2016) en République Centrafricaine. Des observations similaires aux nôtres ont été signalées au Nigeria et au Bénin (Djouaka *et al.*, 2016) et au Mozambique (Ana *et al.*, 2015) où des populations d'*An. funestus* s.s. ont résisté aux pyréthriinoïdes, suggérant qu'une résistance multiple serait déjà répandue dans les populations de ce vecteur majeur du paludisme en Afrique de l'ouest, australe et centrale. Le niveau de la résistance à cette classe d'insecticides en Afrique de l'ouest diffère de ceux relevés en Afrique de l'est (Mulamba *et al.*, 2014), en Afrique australe (Wondji *et al.*, 2012) et en Afrique centrale ; dans cette dernière région du continent, la résistance à la deltaméthrine est supérieure à celle de la perméthrine (Sangba *et al.*, 2016).

Le degré de résistance aux pyréthriinoïdes enregistré chez les populations d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l. d'Obout et de Mebelong est une grande préoccupation pour les programmes de lutte contre le paludisme. Il suggère que ces deux populations d'anophèles des différentes régions du Cameroun sont aussi résistantes en raison de l'utilisation permanente et intensive des pyréthriinoïdes à la fois en l'agriculture et en santé publique (Chouaibou *et al.*, 2006 et 2008 ; Etang *et al.*, 2009 ; Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Ce résultat relève la nécessité d'étendre nos travaux sur tout le territoire camerounais afin de préciser l'étendue de cette résistance aux pyréthriinoïdes chez ces deux espèces.

Des études antérieures, réalisées en Afrique de l'ouest (Djouaka *et al.*, 2016 ; Riveron *et al.*, 2016) et en Afrique centrale (Menze *et al.*, 2016 ; Samgba *et al.*, 2016), ont décelé une surexpression de la Glutathion-S-Transférase (*GST*) dans les populations sauvages d'*An. funestus* s.s comparativement aux souches résistantes d'*Aedes aegypti* du laboratoire. Ainsi, la résistance au DDT trouvée à Obout et à Mebelong pourrait être liée à une expression élevée de la Glutathion-S-Transférase (*GST*) dans plusieurs populations d'insectes, y compris les vecteurs de paludisme (Hemingway *et al.*, 2000). Récemment, il a été démontré qu'une seule mutation (*GSTe2*) dans la séquence du gène qui code la *GST* dans les populations d'*An. funestus* s.s. du Bénin peut conférer une résistance à la fois au DDT et aux pyréthrinoïdes (Riveron *et al.*, 2014). D'autres travaux réalisés au sud du Mozambique ont également rapporté un haut niveau de résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus* s.s. ; toutefois cette résistance était associée à une haute expression du cytochrome P450 mono-oxygénase (Feyereisen *et al.*, 1999 ; Brooke *et al.*, 2001 ; Amenity *et al.*, 2008 ; Riveron *et al.*, 2014). Ces deux molécules (*GST* et Cytochrome P450) pourraient donc être aussi à l'origine de la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes dans nos sites d'étude. Le mécanisme de résistance *kdr* a été systématiquement associé à la résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT dans les populations d'*An. gambiae* s.l. et d'*An. arabiensis* (Hemingway *et al.*, 2000) ; ce mécanisme n'est pas encore identifié chez *An. funestus* s.s. (Bass *et al.*, 2007) et malheureusement les essais de résistance métabolique n'ont pas été effectués dans la présente étude.

III.2.4 Susceptibilité des femelles d'*Anopheles funestus* s.s. et d'*Anopheles coluzzii* à l'infection par *Plasmodium falciparum*

La susceptibilité d'*An. funestus* s.s. à l'infection par des *Plasmodiums* reste relativement peu caractérisée dans les conditions de laboratoire. Les seules études réalisées jusqu'à présent ont été limitées à l'utilisation de *P. berghei*, parasite des rongeurs (Lo *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2013). Ce parasite plus infectant que *P. falciparum* a joué un rôle déterminant dans les recherches sur le paludisme qui ont mené à des découvertes importantes sur les mécanismes de destruction des parasites chez les anophèles vecteurs (Aguilar *et al.*, 2005 ; Dong *et al.*, 2006 ; Riehle *et al.*, 2008 ; Blandin *et al.*, 2009). Cependant, des analyses parallèles de la réponse immunitaire transcriptionnelle à *P. berghei* et à *P. falciparum* ont révélé des différences substantielles (Dong *et al.*, 2006) et ont montré la nécessité d'effectuer de telles études sur le système de transmission du paludisme humain. Dans notre étude, nous

rapportons les premiers résultats des infections expérimentales d'une souche sauvage d'*An. funestus* s.s. avec son parasite naturel, *P. falciparum*.

L'étude de la susceptibilité des moustiques exige que la technique d'infestation des vecteurs réussisse. Dans notre étude, nous avons testé cette technique en utilisant le système de membrane artificielle verre-Parafilm pour nourrir les femelles d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzii* « souche de laboratoire nommée Ngouso » avec du sang infecté de gamétocytes de *P. falciparum*. Ce système offre la possibilité de remplacer le sérum du donneur par un sérum AB non immunisé pour éviter les interactions entre le parasite et les composants sériques (Bousema *et al.*, 2012a). Néanmoins, les essais de gorgement sur membrane artificielle présentent deux faiblesses importantes qui peuvent influencer le résultat des infestations expérimentales. Premièrement, le traitement inapproprié du sang peut entraîner une réduction ou une perte de l'infectivité des gamétocytes (Hume *et al.*, 2007). Deuxièmement, le nombre de moustiques qui prennent un repas de sang peut être réduit, surtout lorsqu'on utilise des échantillons de moustiques nouvellement récoltés sur le terrain, qui ne sont pas encore adaptés au gorgement artificiel en laboratoire (Graves, 1980 ; Awono-Ambene *et al.*, 2001). Ces arguments peuvent expliquer les différences de taux de gorgement observées dans notre étude entre la souche Ngouso de laboratoire *An. coluzzii*, les spécimens sauvages d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzii*.

Susceptibilité d'*Anopheles funestus* s.s. à l'infection par *Plasmodium falciparum*

Au cours de ce travail, les femelles d'*An. funestus* s.s. ont été infectées lors des expériences ; ceci démontre que le système verre-parafilm et la méthode de traitement du sang utilisés pour réaliser les infections expérimentales chez *An. gambiae* s.l. conviennent également chez *An. funestus* s.s.. Cependant, le taux de gorgement des femelles d'*An. funestus* s.s. sauvages F1 a significativement varié entre les essais sans jamais dépasser 50%. Le taux de gorgement global était inférieur à ceux signalés chez la souche d'*An. funestus* s.s., FUMOS de laboratoire, soit plus de 50%, et chez *An. gambiae* s.s soit 51,9% (Lo & Coetzee, 2013). Cette différence pourrait être due au modèle de gorgement utilisé par ces derniers auteurs. En revanche, nos résultats sont comparables à ceux obtenus au Sénégal par Awono-Ambene *et al.*, (2001), qui se sont également servis du système de gorgement verre-parafilm pour infecter les descendants sauvages F1 d'*An. arabiensis*. Ces auteurs ont rapporté un faible taux de gorgement (32,7%) confirmant que les moustiques nouvellement collectés sur le terrain ne sont pas bien aptes pour se nourrir sur la membrane artificielle.

Les paramètres de l'infection (taux de l'infection : 38,62%, nombre médian d'oocystes : 12,5 et charge moyenne en oocystes : 7,67) enregistrés dans notre étude étaient différents de ceux signalés dans l'étude de Lo *et al.* (2013), qui ont utilisé des souches de laboratoire d'*An. funestus* s.s. (*FUMOZ* : résistant à l'insecticide et *FANG* : sensible) et le parasite *P. berghei* pour obtenir un taux d'infection de 20% et une moyenne de 24 oocystes/estomac. Par contre, des spécimens F1 d'*An. funestus* s.s. sauvages du Mali avaient montré un taux d'infection variant de 62,5% à 95% et une moyenne d'oocystes/estomac variant de 47 à 120, significativement plus élevés lorsqu'ils étaient exposés à *P. berghei* (Xu *et al.*, 2013). Les variations de ces paramètres entre ces trois études pourraient être expliquées par trois principaux facteurs : (i) la différence des densités de gamétocytes dans le sang infectant (Da *et al.*, 2015), (ii) la différence de sex-ratio des gamétocytes dans le sang (Robert *et al.*, 1996), et (iii) plus vraisemblablement la différence des espèces plasmodiales utilisées (Collins *et al.*, 2002). Cependant, il est à noter qu'*An. funestus* s.s. est un vecteur de *P. falciparum* et n'interagit pas naturellement avec le *P. berghei*. Par conséquent, en utilisant un isolat naturel de *P. falciparum*, la présente étude donne une image plus réaliste de la compétence vectorielle de ce moustique.

Dans notre étude, le fait d'avoir observé des oocystes dans les estomacs des moustiques après la dissection au 7^{ème} jour post-infection suggère que ce parasite se développe chez cette espèce à des taux similaires à ceux observés chez *An. gambiae* s.s. (Ndiath *et al.*, 2011). D'autres investigations avec la dissection des moustiques au 14^{ème} jour pour l'observation des sporozoïtes dans les glandes salivaires sont nécessaires.

✚ Susceptibilité d'*Anophèles coluzzii* à l'infection par *Plasmodium falciparum*

Quatorze essais d'infestation expérimentale ont été réalisés avec les femelles d'*An. coluzzii* issues de l'élevage des larves collectées sur le terrain. Globalement, un faible taux de gorgement (18,30%) a été obtenu ; ceci justifie l'hypothèse selon laquelle les moustiques fraîchement échantillonnés sur le terrain ne sont pas bien adaptés pour se nourrir à travers une membrane artificielle (Graves, 1980, Awono-Ambene *et al.*, 2001).

Nos résultats ont mis en évidence une variation des niveaux d'infection en fonction de la densité des gamétocytes dans le sang. Le taux d'infection (22,7%) d'*An. coluzzii* par *P. falciparum* obtenu dans notre étude était plus faible que ceux signalés dans d'autres études similaires réalisées au Cameroun (Boissière *et al.*, 2012), au Sénégal (Ndiath *et al.*, 2011) et au Burkina Faso (Nguyen *et al.*, 2017), où des taux d'infection étaient de 48,25%, 57,81% et

42,96% respectivement. En effet, une étude menée au Cameroun a montré que l'abondance des entérobactéries dans l'intestin moyen peut augmenter la susceptibilité des moustiques à l'infection par *P. falciparum*. Par ailleurs, ce taux d'infection obtenu chez *An. coluzzii* dans notre étude était également inférieur à ceux obtenus chez des spécimens d'*An. gambiae* s.s. du Cameroun (Boissière *et al.*, 2012), du Sénégal (Ndiath *et al.*, 2011) et chez les spécimens d'*An. arabiensis* du Burkina Faso (Nguyen *et al.*, 2017). Ces variations des taux d'infection pourraient s'expliquer par la différence des espèces utilisées ainsi que des études.

En ce qui concerne l'intensité de l'infection (nombre moyen d'oocystes par estomac), notre étude a enregistré un nombre moyen d'oocystes (5,4) inférieur à celui (14,45) obtenu par Nguyen *et al.* (2017) au Burkina Faso. Par contre, des spécimens F3 d'*An. coluzzii* du Sénégal ont montré un nombre moyen (0,64) d'oocystes significativement plus inférieur lorsqu'ils étaient exposés à *P. falciparum* (Ndiath *et al.*, 2011). Ces différentes observations amènent à dire que les paramètres de l'infection à *P. falciparum* peuvent varier d'une espèce d'*Anopheles* à une autre ou d'une étude à l'autre. Au travers de notre travail, les paramètres de l'infection (taux d'infection, nombre moyen d'oocystes/estomac) n'ont pas été corrélés avec la densité des gamétocytes, ce qui est en désaccord avec les études de Gouagna *et al.* (1998) qui ont trouvé une forte relation linéaire et positive entre la densité gamétocytaire et le nombre d'oocystes.

III.2.5 Influence de la résistance aux insecticides sur le développement de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles funestus* s.s.

L'une des principales questions qu'on se pose concernant l'augmentation de la résistance aux insecticides chez les vecteurs de *Plasmodium* est de savoir si cette résistance affecte la susceptibilité de ces moustiques à l'infection par des *Plasmodium*. Pour répondre à cette question nous avons utilisé le système de gorgement artificiel (verre-Parafilm) pour infester expérimentalement les femelles sauvages d'*An. funestus* s.s. Les résultats obtenus montrent que cette technique peut être utilisée chez cette espèce comme chez *An. gambiae* s.l. malgré les faibles taux de gorgement rendus, qui ont été expliqués par le fait que les moustiques fraîchement échantillonnés sur le terrain ne sont pas bien adaptés pour se nourrir à travers la membrane artificielle (Graves, 1980 ; Awono-Ambene *et al.*, 2001). Les deux populations d'*An. funestus* s.s. d'Obout et de Mebelong ont également montré une forte susceptibilité à l'infection par les gamétocytes de *P. falciparum* ; ce résultat confirme que cette espèce est hautement compétente pour développer cet agent du paludisme, d'où son rôle majeur dans la transmission de *Plasmodium* en Afrique subsaharienne.

Pour évaluer l'influence de la résistance aux insecticides chez *An. funestus* s.s., la réponse des moustiques de phénotype résistant à la perméthrine a été comparée à celle des moustiques témoins (non exposés à l'insecticide). Dans l'ensemble, une différence significative des taux de gorgement et des taux d'infection au stade d'oocyste a été notée entre ces deux types d'hôtes. Nos résultats sont contraires à ceux des études récentes qui ont montré que les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes sont plus aptes à développer le *P. falciparum* que les moustiques sensibles (Alout *et al.*, 2013 ; Ndiath *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'influence de l'allèle résistant L119F-*GSTe2* sur la compétence vectorielle d'*An. funestus* s.s. a été étudiée en comparant les taux et les intensités d'infection entre les moustiques de différents génotypes (RR, RS et SS) et en analysant le polymorphisme du gène *GSTe2* chez les moustiques infectés et non-infectés provenant d'Obout et de Mebelong. En général, les résultats obtenus ont été surprenants car les génotypes hétérozygotes (RS) et homozygotes sensibles (SS) aux insecticides ont été significativement plus susceptibles à l'infection par *P. falciparum* que le génotype résistant homozygote (RR). De plus concernant les résultats sur l'intensité de l'infection, il est apparu que les moustiques porteurs de l'allèle résistant L119F-*GSTe2* (génotypes RR et RS) étaient plus chargés en oocytes que ceux (sensible SS) ne possédant pas de cet allèle. Cette dernière observation suggère que la résistance métabolique gouvernée par le *GSTe2* interagirait avec le système immunitaire du moustique, conduisant à un développement significatif du parasite (Rivero *et al.*, 2010 ; Ndiath *et al.*, 2014). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Premièrement on pense que la surproduction des *GSTs* peut protéger les parasites contre les effets d'espèces réactives de l'oxygène « Reactive Oxygen Species (ROS) » et augmenter ainsi la susceptibilité des moustiques par neutralisation de la réponse oxydante de *Plasmodium*. En effet, il a été démontré que les ROS interviennent comme des potentiels agents pathogènes « tuants » dans les réponses immunitaires innées des insectes. Par exemple chez *An. gambiae* s.s., Kumar *et al.* (2003) ont montré qu'une le ROS est impliquée dans l'encapsulation mélanotique de *P. berghei*. Par contre, Bahia *et al.*, (2013) ont rapporté que les interactions entre *An. aquasalis* et *P. vivax* ne suivent pas le modèle ROS-induction de la mort du parasite, ce qui indique que le rôle d'une ROS dans la réponse immunitaire à l'infection par *Plasmodium* pourrait varier selon le modèle « parasite-*Anopheles* ». Des études futures sont donc nécessaires pour révéler le rôle des ROS dans la réponse immunitaire d'*An. funestus* s.s. lors de l'infection par *P. falciparum*. Deuxièmement on estime que les échanges fondés sur les ressources peuvent affecter l'immunité des moustiques. Par exemple, la surproduction d'enzymes de détoxification, telles que les estérases ou les *GSTs*, est susceptible d'épuiser le pool de

ressources et de limiter la capacité du vecteur à monter une réponse immunitaire solide, ce qui favorise ainsi le développement du parasite (Hall *et al.*, 2009 ; Rivero *et al.*, 2010). En considérant cette dernière hypothèse, il est probable que le faible taux d'infection des moustiques de génotype RR au locus L119F-*GSTe2* comparé à ceux des deux autres génotypes (RS et SS) résulte de la mortalité élevée avant le 7^{ème} jour post-infection des individus homozygotes résistants RR, en raison de leur forte charge parasitaire ; ces derniers seraient incapables de maintenir simultanément une résistance à l'insecticide et une grande quantité de parasites. Alout *et al.* (2016) aussi ont rapporté que l'infection à *Plasmodium* réduisait la survie des femelles des souches résistantes d'*An. gambiae* s.s. d'*Acerkis* et de *kdrkis*.

L'effet de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle des moustiques peut varier selon les espèces et/ou les mécanismes impliqués. Chez *An. gambiae* s.s., Ndiath *et al.* (2014) ont également trouvé une intensité d'infection plus élevée chez les génotypes RR et RS comparés au génotype SS, tandis que Alout *et al.* (2013) ont montré que l'allèle résistant *kdr* est associé à une réduction de la charge parasitaire chez les individus infectés au stade d'oocyste comparativement à la souche sensible. Chez *An. funestus* s.s., Lo *et al.* (2013) ont indiqué que la souche *FUMOZ-R* résistante aux pyréthriinoïdes avait de plus faibles nombres d'oocystes et de sporozoïtes que la souche *FUMOZ-BS* sensible qui produisait des valeurs de l'indice sporozoïtique très élevées et jamais enregistrées avec *P. berghei*. En revanche, une étude récente réalisée par Tchouakui *et al.* (2018) a montré qu'*An. funestus* s.s. résistante aux insecticides (possédant la mutation L119F-*GSTe2*) était plus susceptible à *P. falciparum* que les spécimens sensibles. En définitive, les observations des études actuelles et de celles citées ci-dessus indiquent que la résistance aux insecticides, notamment la résistance métabolique médiée par le *GSTe2*, peut affecter le développement de *Plasmodium* chez les moustiques vecteurs.

L'analyse des séquences n'a révélé aucune association entre le polymorphisme du gène *GSTe2* et la susceptibilité d'*An. funestus* s.s à l'infection par *P. falciparum* ; l'étude d'un échantillon plus large permettrait de mieux élucider cette relation. L'effet cumulatif du faible nombre de moustiques nourris sur la membrane artificielle et de la mortalité des moustiques avant le 14^{ème} jour post-infection (lorsque les sporozoïtes se retrouvent dans les glandes salivaires) n'ont pas permis d'investiguer sur ce point. Néanmoins, l'analyse faite au stade des oocystes a déjà souligné que le niveau de susceptibilité des moustiques peut être prédit avec une certitude raisonnable (Stone *et al.*, 2013). Compte tenu de l'importance d'*An. funestus* s.s.

dans la transmission du *Plasmodium* et de la large distribution géographique de la résistance aux insecticides chez cette espèce, ces résultats apparaissent très utiles pour la lutte contre le paludisme en Afrique subsaharienne.

III.2.6 Influence de la résistance aux insecticides sur le développement de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles coluzzii*

Comme chez *An. funestus* s.s., nous avons utilisé le système de gorgement artificiel (verre-Parafilm) pour infester expérimentalement des spécimens sauvages d'*An. coluzzii*. Globalement, de faibles taux de gorgement ont été obtenus qui, une fois de plus, peuvent être expliqués par le fait que les moustiques fraîchement échantillonnés sur le terrain ne sont pas bien adaptés pour se nourrir à travers une membrane artificielle (Graves, 1980, Awono-Ambene *et al.*, 2001). La compétence vectorielle des moustiques de phénotype résistant à la perméthrine a été comparée à celle de moustiques témoins (non exposés à l'insecticide). Contrairement aux observations faites chez *An. funestus* s.s., aucune différence significative des taux de gorgement, des taux d'infection au stade oocyste et des nombres moyens d'oocystes/estomac n'a été notée entre les moustiques des deux phénotypes, ce qui suggère que les paramètres de l'infection à *P. falciparum* peuvent varier d'une espèce à une autre. En ce qui concerne le taux et l'intensité de l'infection, nos résultats sont différents des ceux des études récentes de Alout *et al.* (2013) et de Ndiath *et al.* (2014), qui ont montré que les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes ont été plus aptes à s'infecter avec le *P. falciparum* que les moustiques sensibles. Le taux d'infection dans chaque groupe était faible et pourrait être lié à plusieurs facteurs tels que : la faible infectivité des gamétocytes contenus dans le sang, la maturité de ces cellules, le système immunitaire du moustique, la température, les enzymes digestives (Gouagna *et al.*, 1998 ; Nsango *et al.*, 2012). Tous ces éléments représentent un nombre important de facteurs qui pourraient influencer la compétence et la capacité vectorielle des populations locales de vecteurs. Nos résultats ont mis en évidence une variation des niveaux de l'infection en fonction de la densité des gamétocytes dans le sang. De plus, le fait qu'un nombre considérable de moustiques aient été infectés après avoir ingéré des repas de sang contenant de très faibles densités de gamétocytes résultera probablement d'une agrégation de gamétocytes (Pichon *et al.*, 2000) ou d'une évolution de la compétence vectorielle des moustiques.

Par ailleurs, l'influence de l'allèle résistant L1014F-*kdr* sur la compétence vectorielle d'*An. coluzzii* a été étudiée en comparant les taux et les intensités de l'infection entre les moustiques de différents génotypes (RR, RS et SS). Bien que les taux et les intensités de

l'infection aient été numériquement élevés chez les moustiques porteurs de l'allèle résistant L1014F-*kdr*, aucune différence significative n'a été observée entre les moustiques des trois génotypes. Chez deux souches d'*An. gambiae* s.s. (l'une résistante : *kdrkis* et l'autre sensible : Kisumu), Alout *et al.* (2013) ont récemment montré que la présence de l'allèle résistant L1014F-*kdr* influence les résultats de l'infection à *P. falciparum*. Ils ont trouvé des taux d'infection significativement élevés aux stades d'oocystes et sporozoïtes chez les moustiques résistants comparés aux spécimens sensibles. Des résultats similaires ont été rapportés au Sénégal par Ndiath *et al.* (2014) en utilisant une descendance F3 d'*An. gambiae* s.s. et d'*An. coluzzii*. On ne sait toujours pas par quel mécanisme la mutation *kdr* influence la compétence vectorielle des vecteurs du paludisme. L'analyse de l'expression des gènes chez des spécimens d'*An. gambiae* s.s. résistants aux pyréthrinoïdes a montré une régulation positive des gènes antimicrobiens impliqués dans la réponse immunitaire anti-*Plasmodium*, qui pourra aussi influencer la réponse à l'infection par *P. falciparum* (Dimopoulos *et al.*, 2002). Plusieurs gènes de détoxification, dont le CYP6M2, CYP6M3, CYP6AG1, CYP9J5, CYP49A1, CYP12F4 et CYP6Z1, différemment exprimés chez les moustiques ont également été signalés lors de l'invasion intestinale par *Plasmodium* (Vlachou *et al.*, 2005). Des études menées par Felix *et al.* (2010) ont montré que le nombre de gènes du cytochrome P450 régulés positivement diminue significativement entre le premier jour et le 11^{ème} jour après le repas de sang. Avec une expansion rapide de la résistance aux pyréthrinoïdes, il est urgent de comprendre comment cette dernière peut affecter la capacité vectorielle des moustiques afin d'améliorer la lutte contre les vecteurs du paludisme.

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Conclusion

Ce travail avait pour but principal de fournir des informations sur l'influence de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle des populations d'*An. funestus* s.s. et d'*An. coluzzi* qui sont des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique subsaharienne. Les résultats obtenus soulignent la complexité du système vectoriel dans nos localités d'étude, lequel est composé de 3 vecteurs majeurs : *An. funestus* s.s., *An. gambiae* s.s. et *An. coluzzii*. L'observation des taux d'anthropophilie et d'infection par *P. falciparum* chez *An. funestus* s.s. comparables à ceux d'*An. gambiae* s.l. confirme que cette espèce joue un rôle épidémiologique important. Ainsi, les avancées rapides, actuelles et futures, de la connaissance d'*An. gambiae* s.l. ne doivent pas masquer l'importance des autres vecteurs tels qu'*An. funestus* s.s. En effet, la lutte dirigée uniquement contre ces espèces n'aurait pas d'impact significatif dans toutes les localités. En conséquence, les programmes de lutte antivectorielle doivent prendre en compte tous les vecteurs majeurs qui sont fortement inféodés à l'homme.

Par ailleurs, la présente étude a montré une variation temporelle et spatiale de la résistance au DDT et aux pyréthrinoïdes chez les populations d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l. à Mebelong et à Obout. L'analyse de la sensibilité aux insecticides des vecteurs du paludisme s'avère d'une grande importance pour la mise en œuvre à large échelle de tout moyen de lutte antivectorielle basé sur l'utilisation des insecticides ; elle permet en effet un choix raisonné de celui qui est propice dans chaque zone. Les données issues de ce travail mettent en évidence un profil de résistance croissante d'*An. funestus* s.s. et d'*An. gambiae* s.l. au DDT 4%, à la deltaméthrine 0,05% et à la perméthrine 0,75% dans nos localités d'étude. ceci souligne la nécessité de comprendre l'impact de cette résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle de ces deux vecteurs afin d'améliorer les stratégies de lutte antivectorielle. Si une sélection des individus résistants aux insecticides se poursuit, cela va accroître à coup sûr la densité des vecteurs et leur survie. Un tel phénomène entraînerait une augmentation significative de la transmission du paludisme.

En ce qui concerne les infections expérimentales, notre travail rapporte des niveaux élevés de susceptibilité des spécimens sauvages d'*An. funestus* s.s. et *An. coluzzii* à l'infection par *P. falciparum* ; ces moustiques étant répandus partout en Afrique, la recherche et la mise en œuvre du contrôle de vecteurs de paludisme devrait sérieusement prendre en compte ces espèces vectorielles. L'applicabilité de la technique de gorgement sur membrane artificielle (verre-parafilm) pour infecter expérimentalement *An. funestus* s.s. par son parasite naturel *P.*

falciparum a été confirmée au cours de cette étude. Cette technique ouvre ainsi la voie à d'autres investigations, notamment sur les interactions *An. funestus* s.s.-*Plasmodium* dans un système naturel, en tirant partie des outils génomiques maintenant disponibles.

En outre, la présente étude a révélé que la résistance métabolique médiée par la mutation L119F-*GSTe2* peut affecter le développement du *Plasmodium* chez *An. funestus* s.s. Cependant, aucune influence de la mutation L1014F-*kdr* n'a été observé chez *An. coluzzii*.

Recommandations

En dépit des fortes prévalences d'infection par *P. falciparum* enregistrées chez les vecteurs du paludisme, nous recommandons aux populations de nos localités d'étude l'usage quotidien de moustiquaires. Aux pouvoirs publics, la sensibilisation des populations et la distribution généralisée des moustiquaires et d'envisager d'autres moyens de lutte contre les vecteurs de paludisme notamment, les pulvérisations intradomiciliaires. Par ailleurs, vu le niveau élevé de la résistance des vecteurs aux insecticides et de son éventuel impact négatif sur la capacité de développement de *Plasmodium* chez ces vecteurs, nous recommandons aux pouvoirs publics, une stratégie de gestion de la résistance basée sur la rotation d'insecticides qui pourrait contrecarrer la fixation des gènes de résistance aux insecticides dans les populations de vecteurs.

Perspectives

- Nous nous proposons dans les travaux futures d'étendre cette étude dans d'autres localités afin d'avoir une vue à grande échelle sur le rôle vectoriel et le niveau de résistance des populations d'*An. funestus* s.s. aux insecticides.
- Étant donné que plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques de l'anophèle peuvent influencer les interactions *Anopheles-Plasmodium*, des travaux supplémentaires doivent être envisagés pour évaluer davantage l'influence de la résistance aux insecticides sur la transmission et l'épidémiologie du paludisme.
- Des expériences futures devraient également explorer l'influence des autres gènes de résistance sur le développement de *Plasmodium* chez les vecteurs de paludisme.
- Enfin, des expériences futures devraient également explorer l'influence de ces gènes de résistance sur l'infection à *Plasmodium* au niveau des sporozoïtes, stade du parasite transmis à l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbot W.S. (1925).** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*; 18:265-267.
- Adja A.M., N'goran K.E., Kengne P., Koudou G.B., Toure M., Koffi A.A., Tia E., Fontenille D. & Chandre F. (2006).** Transmission vectorielle du paludisme en savane arborée à Gansé en Côte d'Ivoire. *Medicine Tropicale*; 66:449-455.
- Adja A. M., N'goran K.E., Koudou B.G., Dial I., Kengne P., Fontenille D. & Chandre F., (2011).** Contribution of *Anopheles funestus*, *An. gambiae* and *An. nili* (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Cote d'Ivoire. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; Vol. 105, No. 1, 13-24.
- Adugna N. & Petros B. (1996).** Determination of the human blood index of some anopheline mosquitos by using ELISA. *Ethiopian Medical Journal*; [Research Support, Non-U.S. Gov't]. Jan; 34(1):1-10.
- Adungo N.L., Mahadevan S., Muluya N.L., Situbi A.P. & Githure J.L. (1991).** Comparative determination of *Plasmodium falciparum* sporozoïte rates in Afrotropical *Anopheles form aethiops sabaesus*). *American Journal of Primatology*; 56:237-243.
- Agnandji S.T., Fendel R., Mestre M., Janssens M., Vekemans J., Heid J., Gnansounou F., Haertle S., Glasenapp V. I., Oyakhirome S., Mewono L., Moris P., Lievens M., Demoitie Ma.A., M. Dubois P., Villafana T., Jongert E., Olivier A, Cohen J., Esen M., Kremsner P. G., Lell B., Mordmuller B. (2011).** Introduction of *Plasmodium falciparum*-specific CD4+T cells and memory B cells in Gabonese children vaccinated with RTS,S/AS01(E) and RTS,S/AS02(D). *Plos One*; 6:e18559.
- Aguilar R., Dong Y., Warr E. & Dimopoulos G. (2005).** *Anopheles* infection responses: laboratory models versus field malaria transmission systems. *Acta Tropica*; 95:285-91.
- Aikawa M., Carter R., Ito Y. & Nijhout M.M., (1984).** New observations on gametogenesis, fertilization, and zygote transformation in *Plasmodium gallinaceum*. *The Journal of Protozoology*; 31, 403-413.
- Akogbéto M. (2000).** Le paludisme côtier lagunaire à Cotonou : données entomologiques. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé*.10(4):267-75.
- Akogbéto M.C., Djouaka R.F. & Kindé-Gazard D.A. (2006).** Screening of pesticide residues in soil and water samples from agricultural settings. *Malaria Journal*; 5:22.
- Allan M., Gilbert W. (1977).** A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA*; Feb. 74(2):560-4.
- Alonso P.L. (2007).** *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular Microbiology*; 66:291-302.
- Alout H., Ndam N.T., Sandeu M.M., Djegbe I., Chandre F., Dabire R.K., Djogbenou L.S., Corbel V. & Cohuet A. (2013).** Insecticide resistance alleles affect vector

competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS One*; 8(5):e63849.

Alout H., Dabiré R.K., Djogbénu L.S., Abate L., Corbel V., Chandre F. & Cohuet A. (2016). Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. www.Nature.com/scientificreports.

Alout H., Dabiré R.K., Djogbénu L.S., Abate L., Corbel V., Chandre F. & Cohuet A. (2016). Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. www.Nature.com/scientificreports.

Amenya D.A., Naguran R., Lo T.C., Ranson H., Spillings B.L., Wood O.R., Brooke B.D., Coetzee M. & Koekemoer L.L. (2008). Over expression of a cytochrome P450 (CYP6P9) in major African malaria vector, *Anopheles funestus*, resistant to pyrethroids. *Insect Molecular Biology*; 17:19-25.

Ana P.A.1., Pelágio M., Nilza de Deus, Francisco Mbofana4, Pedro M. & Ayubo K. (2015). Bio-efficacy of new long-lasting insecticide-treated bed nets against *Anopheles funestus* and *Anopheles gambiae* from central and northern Mozambique *Malaria Journal*; 14:352.

Andrianaivolambo L., Domarle O., Randrianarivelosia M., Ratovonjato J., Le Goff G., Talman A., Ariey F. & Vincent Robert (2010). Anthropophilic mosquitoes and malaria transmission in the eastern foothills of the central highlands of Madagascar. *Acta Tropica*; 116(3):240-5.

Antonio-Nkondjio (2003). *Anopheles moucheti* Evans, 1925 au Cameroun: biologie, morphologie, structure génétique et implication dans la transmission du paludisme. *Thèse de doctorat PhD, Université de Yaoundé I.*

Antonio-Nkondjio C., Atangana J., Ndo C., Awono-Ambene P., Fondjo E., Fontenille D., & Simard F. (2008). Malaria transmission and rice cultivation in Lagdo, northern Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 102(4), 352-359.

Antonio-Nkondjio C., Keraf Hinzoumbe C., Simard F., Awono-Ambene P., Tchuinkam T. & Fontenille D. (2006). Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: Contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of Medical Entomology*; 43:1215-1221.

Antonio-Nkondjio C., Meunier J.C., Awono-Ambene P. et Fontenille D. (2009). La présence de bovins comme hôte alternatifs peut-elle modifier le comportement trophique des vecteurs du paludisme en zone de forêt? *Sciences et Médecines d'Afrique* 1:7-12.

Antonio-Nkondjio C., Ndjondo-Sandjo N., Awono-Ambene H., & Wondji C.S. (2018). Implementing a larviciding efficacy or effectiveness control intervention against malaria vectors: key parameters for success. *Parasite & Vectors*; 11:57.

- Antonio-Nkondjio C., Poupardin R., Tene Fossog B., Kopya E., Costantini C. & Awono-Ambene P. (2016).** Investigation of mechanisms of bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malaria Journal*; 15, 424.
- Antonio-Nkondjio C., Simard F., Awono-Ambene P., Ngassam P., Toto J.C., Tchuinkam T. & Fontenille D. (2005).** Malaria vectors and urbanization in the equatorial forest region of south Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(5):347-54.
- Antonio-Nkondjio C., Sonhafouo-Chiana N., Ngadjieu C.S., Doumbe Belisse P., Talipouo A., Djamouko-Djonkam L., Kopya E., Bamou R., Awono-Ambene P.H. & Wondji C.S. (2017).** Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors*; 10:472.
- Antonio-Nkondjio C., Tene Fossog B., Kopya E., Poumachu Y., Menze-Djantio B., Ndo C., Tchuinkam T., Awono-Ambene P.H. & Wondji C.S. (2015).** Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Malaria Journal*; 14:155.
- Antonio-Nkondjio C., Tene-Fossog B., Ndo C., Menze-Djantio B., Zebaze-Togouet S., Awono-Ambene P., Constantini C., Wondji C.S. & Hilary R. (2011).** *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*; 10:154.
- Antonio-Nkondjio C., Youmsi-Goupeyou M., Kopya E., Tene-Fossog B., Njiokou F., Costantini C. & Awono-Ambene P. (2014).** Exposure to disinfectants (soap or hydrogen peroxide) increases tolerance to permethrin in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon *Malaria Journal*; 13:296.
- Apiwathnasorn C., Sucharit S., Surathin K. & Deesin T. (1993).** « Anthropophilic and zoophilic phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Thailand » *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 9, n° 2, p. 135–137 ([PMID 8350067](#)).
- Apiwathnasorn C., Sucharit S., Surathin K. & Deesin T. (1993).** « Anthropophilic and zoophilic phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Thailand » *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 9, n° 2, p. 135–137 ([PMID 8350067](#)).
- Armstrong, I.A., Ramsdale C.D., & Ramalaishna V. (1958).** Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* Giles in western Sokoto, northern Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 52: 247-256.
- Asidi A.N., N'Guessan R., Koffi A.A., Curtis C.F., Hougard J.M., Chandre F., Corbel V., Darriet F., Zaim M. & Rowland M.W. (2005).** Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malaria Journal*; 4:25.

- Assako R., Bley D. & Simard F. (2005).** Apports des sciences sociales et de l'entomologie dans l'analyse de l'endémicité du paludisme à HEVECAM, une agro-industrie du Sud-Cameroun. *International Journal of Tropical Geology, geography and Ecology*; 29: 101-114.
- Atangana J., Fondjo E., Fomena A., Tamesse J.L., Patchoké S., Ndjemai H.N.M. & Ndong P.A.B. (2009).** Seasonal variations of malaria transmission in Western Cameroon highlands: Entomological, parasitological and clinical investigation. *Journal of Cell and Animal Biology*; 3:033-038.
- Awolola T., Oyewole I., Koekemoer L. & Coetzee M. (2005).** Identification of three members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group and their role in malaria transmission in two ecological zones in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 99:525-31.
- Awono-Ambene P., Antonio-Nkondjio C., Toto J., Ndo C., Etang J., Fontenille D., & Simard F. (2009).** Epidemiological importance of the *Anopheles nili* group of malaria vectors in equatorial villages of Cameroon, Central Africa. *African journal of Medicine and Medical Sciences*; 1:13-20.
- Awono-Ambene P., Diawara L. & Robert V. (2001).** Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 64:32-4.
- Awono-Ambene P., Kengne P., Simard F., Antonio-Nkondjio C. & Fontenille D. (2004).** Description and bionomics of *Anopheles* (Cellia) *ovengensis* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *Journal of Medical Entomology*; 41:561-568.
- Ayala D., Costantini C., Ose K., Kamdem G., Antonio-Nkondjio C., Agbor J.P., Awono-Ambene P.H., Fontenille Didier & Simard F. (2009).** Habitat suitability and ecological niche profile of major malaria vectors in Cameroon. *Malaria Journal*; 8(1):307.
- Bahia A.C., Oliveira J.H., Kubota M.S., Araujo H.R., Lima J.B., Rios-Velasquez C.M., Lacerda M.V., Oliveira P.L., Traub-Cseko Y.M. & Pimenta P.F. (2013).** The role of reactive oxygen species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection. *PLoS One*; 8(2):e57014.
- Bamou R., Sonhafouo-Chiana N., Konstantinos M., Tchuinkam T., Wondji C.S., Vontas J., & Antonio-Nkondjio C. (2019).** Status of insecticide resistance and its mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* populations from Forest Settings in South Cameroon. *Genes*; 2019, 10, 741; doi: 10.3390/genes10100741
- Bass C., Nikou D., Donnelly M.J., Williamson M.S., Ranson H., Ball A., Vontas J. & Field L.M. (2007).** Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal*; 6:111.

- Bass C., Schroeder I., Turberg A., Field L.M. (2004).** Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Management Science*; 60, 1157-1162.
- Baudon D. (1987).** Aspects épidémiologiques des paludismes en Afrique sub-saharienne. *Bulletins et Mémoires de la Société de Médecine des hôpitaux de Paris, 1987.*
- Beier J.C., Perkins P., Koros J., Onyango F.K., Gargan T.P., Wirtz R., Koerch D.K. & Boveris C.R. (1990).** Malaria sporozoite detection by dissection and ELISA to assess infectivity to Afrotropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*; 27:377-384.
- Beier J.C., Perkins P.V., Wirtz R.A., Koros J., Diggs D., Gargan T.P. & Koerch D.K. (1988).** Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology*; 25:9-16.
- Bejon P., Lusingu J., Olotu A., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Mshamu S., Lang T., Gould J., Dubois M-C., Demoitié M-A., Stallaert J-F., Vansadia P., Carter T., Njuguna P., Awuondo K.O., Malabeja A., Abdul O., Gesase S., Mturi N., Drakeley C.J., Savarese B., Tonya V., Ripley W. ., Cohen J., Riley E.M., Lemnge M.M., Marsh K., & Seidlein L.V.(2008).** Efficacy of RTS/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *The New England Journal of Medicine*; 359:252-2532.
- Beklemišev V.N. & World Health Organization (1964).** De l'exophilie anophélienne dans l'éradication du paludisme. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65181>.
- Betsi A.N., Tchicaya E.S. & Koudou B.G. (2010).** Forte prolifération de larves d'*An. gambiae* et *An. funestus* en milieux rizicoles irrigués et non irrigués dans la région forestière ouest de la Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*; 105(3):220-9.
- Betsi E.S., Tchicaya E.S. & Koudou B.G. (2012).** High proliferation of *An. gambiae* and *An. funestus* larvae in irrigated and non-irrigated rice fields in the Western forest region of Côte-d'Ivoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*; 105:220-229.
- Bigoga J.D., Manga L., Titanji V.P.K., Coetzee M. & Leke R.G.F. (2007).** Malaria vectors and transmission dynamics in coastal south-western Cameroon. *Malaria Journal*; 6:5.
- Billingsley P.F. & Lehane M.J. (1996).** Structure and Ultrastructure of the insect midgut. *Biology of the insect midgut*: 3-30.
- Blandin S.A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina & Steinmetz L.M. (2009).** Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science*; 326:147-50.

- Boissiere A., Tchioffo M., Bachar D., Abate L., Marie A., Nsango S. Shahbakia H.R., Awono-Ambene H.P., Levashina E.A., Christen R. & Morlais I. (2012).** Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens*; 8(5):e1002742.
- Bonnet J., Pennetier C., Duchon S., Lapied B. & Corbel V. (2009).** Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasit & Vectors*; 2:17.
- Boudin C., Diop A., Gaye A., Gadiaga L., Gouagna C., Safeukui I. & Bonnet S. (2005).** Plasmodium falciparum transmission blocking immunity in three areas with perennial or seasonal endemicity and different levels of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 73: 1090-5.
- Boudin C., Van Der Kolk M., Tchuinkam T., Gouagna C., Bonnet S., Safeukui I., Muldrex B., Meunier J.Y. & Verhave J.P. (2004).** Plasmodium falciparum transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. *Parasite Immunology*; 26: 105-110.
- Bousema T., Dinglasan R.R., Morlais I., Gouagna L.C., Van Warmerdam T., et al., (2012a).** Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PloS One*; 7: e 42821.
- Brooke B.D., Kloke G., Hunt R.H., Koekemoer L.L., Temu E.A., Taylor M.E., Small G., Hemingway J. & Coetzee M. (2001).** Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: culicidae). *Bulletin of Entomological Research*; 91:265-72.
- Brown AWA (1986).** Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 2:123–40.
- Brunhes, J., Le Goff, G. & Geoffroy B. (1997).** Anophèles afro-tropicaux. Description d'espèces nouvelles et changement de statuts taxonomiques (Diptera : Culicidae). *Annales de la Société entomologique de France*; 33 (2) : 173-183.
- Carles P.R., (1985).** Mode d'action et utilisation des Pyréthrinoides. Insectes-Insecticides-Santé, Colloque national d'Angers. *ACTA*; 325-344.
- Carnevale P. & Mouchet J. (1990).** Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Médecine Tropicale*, 50:391-398.
- Carnevale P., Robert V., Manguin S., Corbel V., Fontenille D., Garros C., Rogier C. & Roux J. (2009).** Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. Marseille: IRD, 391 p. (Didactiques). ISBN 978-2-7099-1662-2
- Carter R. & Graves P.M. (1988).** Gametocytes in Malaria. Principles and Practice of Malariology (W.H. Wernsdorfer and Sir I. McGregor, eds), pp. 253-306. Churchill Livingstone, Edinburgh.

- Carter R. & Nijhout M.M. (1977).** Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. *Science*; 195:407-409.
- Casimiro S., Coleman M., Mohloai P., Hemingway J. & Sharp B. (2006).** Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from Mozambique. *Journal of Medical Entomology March*; 43(2):267-75.
- Catteruccia F., Crisanti A. & Wimmer E.A. (2009).** Transgenic technologies to induce sterility. *Malaria Journal*; 8 Supplement 2: S7.
- Cavalié P. & Mouchet J. (1961).** Les vecteurs et l'épidémiologie du paludisme dans le nord Cameroun. *Medicine Tropical*; 6:847-870.
- Cho A. (2012).** Constructing phylogenetic trees using maximum likelihood. Bachelor of Arts, Scripps Women College.
- Chouaibou M.S., Fodjo B.K., Fokou G., Allassane O.F., Koudou B.G., David J.P., Antonio-Nkondjio C., Ranson H. & Bonfoh B. (2016).** Influence of the agrochemicals used for rice and vegetable cultivation on insecticide resistance in malaria vectors in southern Cote d'Ivoire. *Malaria Journal*; 15, 426.
- Chouaibou M., Simard F., Chandre F. Etang J., Darriet F. & Hougard J-M. (2006).** Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against *Anopheles funestus* and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* in North Cameroon. *Malaria Journal*; 5, 77.
- Chouaibou M., Etang J., Brevault T., Nwane P., Hinzoumbe C. & Mimpfoundi R. (2008).** Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in northern Cameroon. *Tropical Medicine & International Health*; 13:476-86.
- Christophides G.K., Vlachou D., & Kafatos F.C. (2004).** Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *An. gambiae*. *Immunological Reviews*; 198:127-148.
- Churcher T.S., Mousema T., Walker M., Drakeley C., Schneider P., Ouedraogo A.L. & Basanez M.G., (2013).** Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife* 2: e00626.
- Clement M., Posada D. & Crandall K. (2000).** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*; 9, 1657-1660.
- Coetzee M. & Fontenille D., (2004).** Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 34: 599-605.
- Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., Della Torre, A., Coulibaly, M.B. & Besansky, N.J. (2013).** *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa* 3619 (3): 246-274; <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3619.3.2>.

- Coetzee M. & Koekemoer L.L. (2013).** Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Annual Review of Entomology*; 58: 393-412.
- Coetzee M., Van W.P., Booman M., Koekemoer L.L. & Hunt R.H. (2006).** Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes in a gold mining town in Ghana and implications for malaria control. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*; 99(5):400-3.
- Cohuet A., Simard F., Toto J.C., Kengne P., Coetzee M. & Fontenille D. (2003).** Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(2):200-205.
- Cohuet A., Simard F., Wondji C.S., Atonio-Nkondjio C., Awono-Ambene P. & Fontenille D. (2004).** High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of Savannah-forest transition area in Cameroon. *Journal of medical entomology*, 41 (5): 901-905.
- Collins W.E, Sullivan J.S., Nace D., Williams T., Sullivan J.J., Galland G.G. Grady K.K. & Bounngaseng A. (2002).** Experimental infection of *Anopheles farauti* with different species of *Plasmodium*. *Journal of Parasitology*; 88(2):295-8.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V. & Dideco M.A. (1979).** Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 73(5):483-97.
- Corbel V., Chabi J., Dabiré R.K., Etang J., Nwane P., Pigeon O., Akogbeto M. & Hougard J.M. (2010).** Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (Permanet 3.0) against pyrethroid resistant malaria vectors: a multi-center study in Western and Central Africa. *Malaria Journal*; 9: 113-112.
- Costantini C., Li S.G., Della Torre A., Sagnon N., Coluzzi M., Taylor C.E. (1996).** Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. *Medical and Veterinary Entomology*; 10 (3), 203-219.
- Costantini C., Sagnon N., Iboudo-Sanogo E., Coluzzi and Boccolini D. (1999).** Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*; 41:595-611.
- Cox-Singh J. (2009).** *Plasmodium knowlesi* malaria in Vietnam. *Malaria Journal*; 8: 269.
- Cox-Singh J., Davis T.M., Lee K.S., Shamsul S.S., Matusop A., Ratnam S., Rahman H.A., Conway D.J. & Singh B. (2008).** *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases*; 46: 165-171.

- Coz J., Davidson G., Chauvet G. & Hamon J. (1968).** La résistance des Anophèles aux insecticides en Afrique tropicale et à Madagascar. *Cah. ORSTOM, Série Entomologie Médecine et Parasitologie*; 6: 207-210.
- Cuamba N., Morgan J.C., Irving H., Steven A. & Wondji C.S. (2010).** High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the Chokwe district in Mozambique. *PLoS One*; Jun; 5(6), e11010.
- Da D.F., Churcher T.S., Yerbanga R.S., Yaméogo B., Sangaré I., Ouedraogo J.B., Sinden R.E., Blagborough A.M. & Cohuet A. (2015).** Experimental study of the relationship between *Plasmodium* gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Experimental Parasitology*; 149:74-83.
- Dabire K.R., Baldet T., Diabate A., Dia I., Costantini C., Cohuet A., Guiguemdé T.r. & Fontenille D. (2007).** *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a humid savannah area of western Burkina Faso: bionomics, insecticide resistance status, and role in malaria transmission. *Journal of medical entomology*; Nov, 44(6):990-7.
- David F. & Urlotte T. (2002).** « An Isothermal Amplification Methodes ». comptes-rendu de l'Académie des Sciences. 321 :909-914.
- Davidson G. (1962).** *Anopheles gambiae* complex. *Nature*; 196:907.
- De Meillon B. (1977).** Observations on a species of the *Anopheles funestus* subgroup, a suspected exophilic vector of malaria parasites in north-eastern Transvaal, South Africa. *Mosquito News*; 37:657-61.
- Detinova T.S. (1962).** Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monograph Series World Health Organization*; 47, 13-191.
- Dia L., (1996).** Contribution à l'étude d'*Anopheles funeslus* Giles, 1900 (Diptera: Culicidae) au Sénégal. Mémoire de DEA de Biologie Animale. Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, 84, 80 pages.
- Dia I., Boccolini D., Duchemin J-B., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre M., Ceainu C., Le Goff G. & Simard F. (2003).** Systématique et biologie des anophèles vecteurs de *Plasmodium* en Afrique, données récentes. *Medicine Tropical*; 2003; 63:247-253
- Dia I., Diop T., Rakotoarivony I., Kengne P. & Fontenille D. (2003).** Bionomics of *Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. funestus* Giles and *An. nili* (Theobald) (Diptera: Culicidae) and Transmission of *Plasmodium falciparum* in a Sudano-Guinean Zone (Ngari, Senegal). *Journal of Medical Entomology*; 40:279-283.
- Dia I., Guelbeogo M.W. & Ayala D. (2013).** Advances and Perspectives in the Study of the Malaria Mosquito *Anopheles funestus* In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors: *InTech Publisher*; Pp.197-220.

- Dia I., Lochouarn L., Diatta M., Sokhna C.S. & Fontenille D. (2001).** Préférences trophiques des femelles endophiles d'*Anopheles funestus* au Sénégal. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 94 (2bis):75-98.
- Dia I., Samb B., Konate L. & Fontenille D. (2010).** Population structure of newly established *Anopheles funestus* populations in the Senegal River basin using paracentric chromosomal inversions. *Acta Tropica*; 115:90-4.
- Dimopoulos G., Christophides G., Meister S., Schultz J., White K., Barillas-Mury C. & Kafatos F.C. (2002).** Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge and malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 99:8814-9.
- Dimopoulos G., Richman A., Muller H.M. & Kafatos F.C. (1997).** Molecular Immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 94:11508-11513.
- Dinglasan R.R., Armistead J.S., Nyland J.F., Jiang X. & Mao H.Q. (2013).** Single-dose microparticle delivery of a malaria transmission-blocking vaccine elicits a long-lasting functional antibody response. *Current Molecular Medicine*; 13:479-487.
- Dinglasan R.R. & Jacobs-Lorena M., (2008).** Flipping the paradigm on malaria transmission blocking vaccines. *Trends Parasitology*; 24: 364-370.
- Djouaka, R., Bakare A.A., Coulibaly O.N., Akogbeto M.C., Ranson H., Hemingway J., & Strode C. (2008).** Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*; 9:538.
- Djouaka, R., Riveron J.M., Yessoufou A., Tchigossou G., Akoton R., Irving H., Djegbe I., Moutairou K., Adeoti R., Tamo M., Manyong V. & Wondji C.S. (2016).** Multiple insecticide resistance in an infected population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *Parasites & Vectors*; 9:453.
- Djouaka R., Seun M., Atoyebi Genevieve M.T., Jacob M.R., Helen I., Romaric A., Michael O.K., Adekunle A.B. & Wondji C.S. (2016).** Evidence of a multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in South West Nigeria. *Malaria Journal*; 15:565.
- Dong Y.M., Aguilar R., Xi Z.Y., Warr E., Mongin E. & Dimopoulos G. (2006).** *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathogens*; 2:513-25.
- Dong Y., Manfredini F. & Dimopoulos G. (2009).** Implication of the mosquitomidgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PloS Pathogens*; 5: e1000423.
- Dronamraju K.R. & Arese P. (2005).** *Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects*. Birkhäuser, (ISBN 9780387282947).

- Dye C. (1992).** The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annual Review of Entomology*; **37**, 1-19.
- Edi C.V., Djogbénou L., Jenkins A.M., Regna K., Muskavitch M.A.T., Poupardin R. Jones C.M., Essandoh J., Kétoh G.K., Paine M.J.I., Koudou B.G., Donnelly M.J., Ranson H., Weetman D. (2014).** CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genetics*; 10:e1004236.
- Eisele T.P., Larsen D. & Steketee R.W. (2010).** Protective efficacy of interventions for preventing malaria mortality in children in *Plasmodium falciparum* endemic areas. *International Journal of Epidemiology* 39 supplement; 1: i88-101.
- Elissa N. & Karch S. (2005).** Re-emergence of *Anopheles funestus* and its possible effect on malaria transmission on Mayotte Island, Indian Ocean. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 21(4):472-3.
- Elyse P. & Aain H.** « La PCR en temps réel: principe et application » *Review in Biology and Biotechnology*; 2002; 2 :2-11.
- Esen M., Kremsner P.G., Schleucher R., Gassler M. Imoukhued E.B., Imbault N., Leroy O., Jepsen S., Knudsen B.W., Schumm M., Knobloch J., Theisen M. & Mordmüller B. (2009).** Safety and immunogenicity of GMZ2- a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate; journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine 27: 6862-6868.
- Etang J., Fondjo E., Chandre F., Brengues C., Nwane P., Chouaibou M., Njemai H. & Simard F. (2006).** First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 74:795-7.
- Etang J., Manga L., Toto J.C., Guillet P., Fondjo E. & Chandre F. (2007).** Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l populations from Cameroon. *Journal of Vector Ecology*; **32(1)**:123-133.
- Etang J., Nwane P., Piameu M., Manga B., Souop D. & Awono-Ambene P. (2013).** Evaluation of new tools for malaria vector control in Cameroon: focus on long lasting insecticidal nets. *PLoS One* ; 8:e74929.
- Etang J., Vicente J., Nwane P., Chouaibou M., Morlais I., Do Rosario V., Simard F., Awono-Ambene P.H., Toto J.C. & Pinto J. (2009).** Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* ss populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Molecular Ecology*; 18:3076-86.
- Fanello C., Santolamazza F. & Della Torre A. (2002).** Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*; **16**:461-464.

- Félix R., Muller P., Ribeiro V., Ranson H. & Silveira H. (2010).** *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. *BMC Genomics*; 11:312.
- Felsenstein J. (1985).** Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 125:1-15.
- Ferrandon D., Imler J.L., Hetru C. & Hoffmann J.A. (2007).** The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*; 7:862-874.
- Feyereisen R. (1999).** Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*; 44:507-33.
- Ffrench-Constant R.H., Streichen J.C., Rocheleau T.A., Aronstein K. & Roush R.T. (1993).** A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric subtype a receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 90, p. 1957-1961.
- Fillinger U., Khadija K., George W., Vanek J. M., Dongus S., Nyika D., Geissbühler Y., Chaki P.P., Govella N.J., Mathenge E.M., Singer B., Mshinda H., Lindsa Steven W. Y., Tanner M., Mtasiwa D., Castro M. C. & Killeen G.F. (2008).** A tool box for operational mosquito larval control: preliminary results and early lessons from the urban malaria control programme in Dar es Salam, Tanzania. *Malaria Journal*; 25 p.
- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Kengne P., Dia I., Boccolini D., Duchemin J.B., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre M., Ceainu C., Le Goff G. & Simard F. (2003).** Systématique et biologie des anophèles vecteurs de *plasmodium* en Afrique, données récentes. *Médecine Tropicale*; 63(3):247-53.
- Fontenille D., Lagneau C., Lecollinet S., Lefait R.R., Setbon M., Tirel B. & Yebakima A. (2009).** *La lutte antivectorielle en France=Disease vector control in France*. Marseille: IRD, 533 p. (Expertise Collégiale).
- Fontenille D., Lochouarn L., Diatta M., Sokhna C., Dia I., Diagne N., Lemasson J.J., Ba K., Tall A., Rogier C. & Trape J.F. (1997).** Four years entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 91(6):647-52.
- Fontenille D., Meunier J.Y., Antonio-Nkondjio C. & Tchuinkam T. (2001).** Use of circumsporozoite protein enzyme-linked immunosorbent assay compared with microscopic examination of salivary glands for calculation of malaria infectivity rates in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Cameroon. *Journal of Medical Entomology*; 38(3):451-4.
- Fontenille D. & Rakotoarivony I. (1988).** Reappearance of *Anopheles funestus* as a malaria vector in the Antananarivo region, Madagascar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 82(4):644-5.

- Fontenille D. & Simard F. (2004).** Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*; doi:10.1016/j.cimid.
- Fu Y. & Li W. (1993).** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*; 133,693-709.
- Garret-Jones C. (1964).** The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*; 30:241-261.
- Gary R.E. & Foster W.A. (2001).** Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*; 38 (1):22-28.
- Gass R.F. & Yeates R.A. (1979).** In vitro damage of cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta Tropical*; 36:243-252.
- Gbotosho G.O., Sowunmi A., Happi C.T. & Okuboyejo T.M. (2011).** *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage, sex ratios and asexual parasites rates in Nigerian children before and after a treatment protocol policy change instituting the use of artemisinin-based combination therapies. *Memoras do Instituto Oswaldo Cruz*; 106: 685-690.
- Gentilini M. & Duflo B. (1986).** *Medecine Tropicale*. 4ème edition. Flammarion Medicine-sciences: 81-90.
- Gillies M.T. (1961).** Studies on the dispersion and survival of *Anopheles gambiae* Giles in East Africa, by means of marking and release experiments. *Bulletin of Entomological Research*; 52 (01), 99-127.
- Gillies M.T. & Coetzee M. (1987).** A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Public South African Institute for Medical Research*; 55:63.
- Gillies M.T. & De Meillon B. (1968).** The Anophelinae of Africa south of the Sahara, second ed. *South African Institute of Medical Research, Johannesburg*; 343p.
- Girard M.P., Reed W.H., Friede M. & Kieny M.P. (2007).** A review of human vaccine research and development: *malaria vaccine* 25: 1567-1580.
- Githeko A.K., Service M.W., Mbogo C.M., Atieli F.K. & Juma F. O..** *Plasmodium falciparum* sporozoite and entomological inoculation rates at the Ahero rice irrigation scheme and the Miwani sugar-belt in western Kenya. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; Volume 87, pages 379-391
- Goodman A.L., Epp C., Moss D., Holder A.A., Wilson J.M., Gao G.P., Long C.A., Remarque E.J., Thomas A.W., Ammendola V., Colloca S., Dicks M.D.J., Biswas S., Van Dulvenvoorde L.M., Gilbert S.C., Hill A.V.S. & Draper S.J. (2010).** New candidate vaccines against blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria: prime-boost immunization regimens incorporating human and simian adenoviral vectors and

poxviral vectors expressing an optimized antigen based on merozoite surface protein 1. *Infection Immunology*; 78: 4601-4612.

- Gouagna L., Mulder B., Noubissi E., Tchuinkam T., Verhave J. & Boudin C. (1998).** The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. *Tropical Medicine & International Health*; 3:21-8.
- Graves P.M. (1980).** Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 74:738-42.
- Hackett B.J., Gimnig J., Guelbeogo W., Costantini C., Koekemoer L.L., Coetzee M., Collins F.H. & Besansky N.J. (2000).** Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum* and uncover a cryptic taxon. *Insect Molecular Biology*; 9:369-74.
- Hall S.R., Simonis J.L., Nisbet R.M., Tessier A.J. & Caceres C.E. (2009).** Resource ecology of virulence in a planktonic host-parasite system: an explanation using dynamic energy budgets. *American Naturalist*; 174(2):149-162.
- Hall T. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 41, 95-98.
- Hamon J. (1963).** Les moustiques anthropophiles de la région de Bobo-Dioulasso (République de Haute-Volta) : cycles d'agressivité et variations saisonnières. *Annales de la Société Entomologique de France*, 132, 85-144.
- Hamon J., Sales S., Venard P., Coz J. & Brengues J. (1968).** The presence in southwest Upper Volta of populations of *Anopheles funestus* Giles resistant to dieldrin. *Médecine Tropicale*; 28:221-6.
- Hamon J., Subra, R., Sales S. & Coz J. (1968).** Présence dans le sud-ouest de la Haute Volta d'une population d'*Anopheles gambiae* "A" résistante au DDT. *World Health Organization WHOIVBCI*; 68.75: 10 p.
- Harbach R.E. (2004).** The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*; 94(6):537-53.
- Hargreaves K., Koekemoer L.L., Brooke B.D., Hunt R.H., Mthembu J. & Coetzee M. (2000).** *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*; 14(2) pages 181-189.
- Hemingway J. (2000).** The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry Molecular Biology*; 30:1009-15.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L. & Ranson H. (2004).** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 34: 653-65.

- Hervy J.F., Le Goff G., Geoffroy B., Hervé J.P., Manga L. & Brunhes J. (1998).** Les anophèles de la région afrotropicale. *CD-ROM, ORSTOM éditions*, Paris.
- Hillyer J.F., Barreau C. & Vernck K.D. (2007).** Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *International Journal of Parasitology*; 37:673-681.
- Hoffmann J.A. (1995).** Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*; 7, 4-10.
- Hoffmann J.A. (2003).** The immune response of *Drosophila*. *Nature*; 426, 33-38.
- Holstein M. (1949).** Guide pratique de l'anophéline en A.O.F. *Service General Hygiene Mobile Prophylaxis; Dakar* 55 p.
- Hosie A.M., Aronstein K., Sattelle D.B. & French-Constant R.H. (1997).** Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neurosciences*; 20, 578-583.
- Hume J.C., Tunnicliff M., Ranford-Cartwright L.C. & Day K.P. (2007).** Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensis* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*; 6:139.
- Hunt R.H., Edwards M. & Coetzee M. (2010).** Pyrethroid resistance in southern African *Anopheles funestus* extends to Likoma Island in Lake Malawi. *Parasites & Vectors*; 3:122.
- Ibrahim S.S., Ndula M., Riveron J.M., Irving H. & Wondji C.S. (2016).** The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid cross-resistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Molecular Ecology*; 25:3436-52.
- Kamau L., Munyekenye G.O., Koekemoer L.L., Hunt R.H. & Coetzee M. (2003).** A survey of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group of mosquitoes from 10 sites in Kenya with special emphasis on population genetic structure based on chromosomal inversion karyotypes. *Journal of Medical Entomology*; Sep; 40(5):664-71.
- Kamdem C., Tene-Fossog B., Simard F., Etoua J., Ndo C., Kengne P., Boussès P., Etoa F-X., Awono-Ambene P., Fontenille D., Antonio-Nkondjio C., Besansky N.J. & Costantini C. (2012).** Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Public Library of Science (PLoS One)*; 7(6):39453.
- Kaslow D.C. (1993).** Transmission blocking immunity against malaria and other vector borne diseases. *Current Opinion in Immunology*; 5:557-565.
- Kent R.J., Coetzee M., Mharakurwa S. & Norris D.E. (2006).** Feeding and indoor resting behaviour of the mosquito *Anopheles longipalpis* in an area of hyperendemic malaria transmission in southern Zambia. *Medical and Veterinary Entomology*; [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]; Dec; 20(4): 459-63.

- Kloke R.G., Eduardo N., Richard H.H. & Coetzee M. (2011).** Vectorial status and insecticide resistance of *Anopheles funestus* from a sugar estate in southern Mozambique. *Parasites & Vectors*; 4:16
- Knox B.T., Juma O.E., Ochomo E., Pates J.H., Ndungo L., Chege P., Bayoh N.M., N'Guessan R., Christian N.R., Hunt R.H. & Coetzee M. (2014).** An online tool for mapping insecticide resistance in major *Anopheles* vectors of human malaria parasites and review of resistance status for the Afrotropical region. *Parasites & Vectors*; 7:76.
- Koekemoer L.L., Kamau L., Hunt R.H. & Coetzee M. (2002).** A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 66:804-811.
- Koekemoer L.L., Misiani E.A., Hunt R.H., Kent R.J., Norris D.E. & Coetzee M. (2009).** Cryptic species within *Anopheles longipalpis* from southern Africa and phylogenetic comparison with members of the *An. funestus* group. *Bulletin of entomological research. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. Feb; 99(1):41-9.
- Konate L., Diop A., Sy N., Faye M.N., Dieng Y., Izri A., Faye O., Mouchet J. (2001).** Come back of *A. funestus* in Sahelian Senegal. *The Lancet*; 358:336.
- Kumar S., Christophides G.K., Cantera R., Charles B., Han Y.S., Meister S., Dimopoulos G, Kafatos F.C. & Barillas-Mury C. (2003).** The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*; 100 (24):14139-14144.
- Labbo R., Fouta A., Jeanne I., Ousmane I. & Duchemin J.B. (2004).** *Anopheles funestus* in Sahel: new evidence from Niger. *Lancet*; 363:660-1.
- Le Goff G., Toto J.C., Nzeyimana I., Gouagna L.C., & Robert V. (1993).** Les moustiques et la transmission du paludisme dans un village traditionnel du bloc forestier sud-Cameroun. *Bulletin de Liaison et de Documentaire* ; OCEAC, 26.
- Lee Y., Marsden C.D., Norris L.C., Collier T.C., Main B.J., Fofana A., Cornel A.J. & Lanzaro G.C. (2013).** Spatiotemporal dynamics of gene flow and hybrid fitness between the M and S forms of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proceeding of the National Academy of Science*; 110, 19854-19859.
- Levashina E.A., (2004).** Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*; 34:673-678.
- Librado P. & Rozas J. (2009).** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*; 25, 1451-1452.
- Lo T.M. & Coetzee M. (2013).** Marked biological differences between insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles funestus* infected with the murine parasite *Plasmodium berghei*. *Parasites & Vectors*; 6:184.

- Lyimo E.O. & Koella J.C. (1992).** Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae* s.l and infection with the Malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*; 104:233-237.
- Maheu-Giroux M. & Castro M.C. (2013).** Impact of community-based larviciding on the prevalence of malaria infection in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS One*; 8(8):e71638.
- Mahon, R.J., Green, C.A. & Hunt, R.H. (1976).** Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*; 66: 2531.
- Manga L., Toto J.C., Le Goff G. & Bruhnes J. (1997).**The bionomics of *Anopheles funestus* and its role in malaria transmission in a forested area in southern Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 91(4):387-388.
- Manuila A. (1971).** *Dictionnaire français de Médecine et de Biologie*, tome 2, Masson, p. 52 et 162.
- Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Berge J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N. & Pauron D. (1998).** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*; 7(2):179-184.
- Matambo T.S., Paine M.J., Coetzee M. & Koekemoer L.L. (2010).** Sequence characterization of cytochrome P450 CYP6P9 in pyrethroid resistant and susceptible *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Genetics and Molecular Research*; 9(1):554-64.
- Mathanga D.P., Campbell C.H., Taylor T.E., Barlow R. & Wilson M.L. (2006).** Socially marketed insecticide-treated nets effectively reduce *Plasmodium* infection and anaemia among children in urban Malawi. *Tropical Medicine In health*; 11: 1367-1374.
- McCarroll L. & Hemingway J. (2002).** Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biology Molecular Biology*; 32, 1345-1351.
- Mendes A.M., Awono-Ambene P.H., Nsango S.E., Cohuet A., Fontenille D., Kafatos F.C., Chritophides G.K., Morlais I. & Vlachou D. (2011).** Infection intensity-dependent responses of *Anopheles gambiae* to the African malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*; 79:4708-4715.
- Menze B.D., Riveron J.M., Ibrahim S.S., Irving H., Antonio-Nkondjio C., Awono-Ambene P.H., & Wondji C.S. (2016).** Multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon is mediated by metabolic resistance alongside potential target site insensitivity mutations. *PLoS One*; 11:e163261.
- Miles S.J. (1978).** Enzyme variations in the *Anopheles gambiae* Giles group of species (Diptera, Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*; 68: 85-96.

- Minsanté (2019).** Journée mondiale de lutte contre le paludisme 2019 au Cameroun. <https://cm.ambaf rance .org/Journ ee-mondi ale-de-lutte -contre-le-palud isme-2019-au-Camer oun>. Accessed 24 May 2019.
- Molez J.F. & Baudon D. (1984).** Distribution géographique des paludismes et leurs incidences en Afrique. *Etudes Médicales*; 2:117-119.
- Morgan J.C., Irving H., Okedi L.M., Steven A. & Wondji C.S. (2010).** Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One*; 5:e11872.
- Mouchet J. & Gariou J. (1961).** Répartition géographique et écologie des Anophèles au Cameroun. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques* ; 54:102-107.
- Mouchet, J. (1988).** Agriculture and vector resisance. *Insect Science and its Application*; 9: 297-302.
- Mouchet J. & Carnevale P. (1991).** Les vecteurs de la transmission. In Paludisme Danis M. et Mouchet J. UREF. Marketing/ Ellipse (Ed). Paris. 35-38.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D. & Sircoulon J. (2004).** Biodiversité du paludisme dans le monde. *Editions John Libbey Eurotext*.
- Mouchet J., Faye O., Julvez J. & Manguin S. (1996).** Drought and malaria retreat in the Sahel, West Africa. *Lancet*; 348 (9043):1735-6.
- Mouchet J., Carnevale P. & Manguin S. (2008).** *Biodiversity of Malaria in the World*. John Libbey Eurotext, ([ISBN 9782742006168](https://doi.org/10.1007/978-2-7420-0616-8)).
- Mulamba C., Riveron J.M., Ibrahim S.S., Irving H., Barnes K.G., Mukwaya L.G. Birungi J. & Wondji C.S. (2014).** Widespread pyrethroid and DDT resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in East Africa is driven by metabolic resistance mechanisms. *PLoS One*; 9: e110058.
- Müller P., Chouaibou M., Pignatelli P., Etang J., Walker E.D., Donnelly M.J., Simard F. & Ranson H. (2008).** Pyrethroid tolerance associated with elevated expression of antioxidants and agricultural practice in *Anopheles arabiensis* sampled from an area of cotton fields in Northern Cameroon. *Molecular Ecology*; 17(4):1145-1155.
- Müller P., Donnelly M.J. & Ranson H. (2007).** Transcription profiling of a recently colonized pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics*; 8:36.
- Mutuku F.M., Charles H.K., Mungai P., Mbogo C., Mwangangi J., Muchuri E.M., Walker E.D., & Kitron U. (2011).** Impact of insecticide-treated bed nets on malaria transmission indices on the south coast of Kenya. *Malaria Journal*; 10:356.
- Muturi E.J., Kamau L., Jacob B.G., Muriu S., Mbogo C.M., Shililu J., & Novak R.J. (2009).** Spatial distribution, blood feeding pattern, and role of *Anopheles funestus*

- complex in malaria transmission in central Kenya. *Parasitology Research*; 105(4):1041-6.
- Ndiath M.O., Cohuet A., Ablaye Gaye, Konate L., Mazonot C., Faye O., Boudin C., Cheikh Sokhna1 & Trape J.F. (2011).** Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal*; 10:269.
- Ndiath M.O., Cailleau A., Diedhiou S.M., Gaye A., Boudin C., Richard Vincent & Trape J.F. (2014).** Effects of the kdr resistance mutation on the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* populations to *Plasmodium falciparum*: a hindrance for vector control. *Malaria Journal*; 13:340.
- Ndjemai H., Patchoke S., Atangana J., Etang J., Simard F. & Bilong Bilong C. (2008).** The distribution of insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon: an update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 103:1127–38.
- Ngatchou S.E.Y. (2006).** Les aspects géo climatiques de l'épidémiologie du paludisme en milieu urbain et rural : le cas de la ville de Mfou et du village Nkilzock II. Mémoires de DEA, UYI, 84p.
- Nguyen P. L., Vantaux A., Hien D. F., Dabiré K. R., Yameogo B. K., Gouagna L.C. & Lefèvre T. (2017).** No evidence for manipulation of *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* host preference by *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*, 7(9415). doi:10.1038/s41598-017-09821-x.
- Nkya, T.E., Poupardin, R., Laporte, F., Akhouayri, I., Mosha, F., Magesa, S., Kisinza, W. & David, J.P. (2014).** Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasites & Vectors*; 7, 480.
- Noden B.H., Kent M.D., Beier J.C. (1995).** The impact of variations in temperature on early *Plasmodium falciparum* development in *Anopheles stephensi*. *Parasitology*; 111 (Pt 5):539-545.
- Nsango S., Abate L., Thoma M., Pompon J., Fraiture M., Rademacher A., Berry A., Awono-Ambene P.H., Levashina E.A. & Morlais I. (2012).** Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *International Journal of Parasitology*; 42:589-95.
- Nwane P., Etang J., Chouaibou M., Toto J., KeraH-Hinzoumbe C., Mimpfoundi R., Awono-Ambene P.H. & Simard F. (2009).** Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. Populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infectious Diseases*; 9:163.
- Nwane P., Etang J., Chouaibou M., Toto J., KeraH-Hinzoumbe C. & Mimpfoundi R. (2009).** Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. Populations

- from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infectious Diseases*; 9:163.
- O'reilly A.O., Khambay B.P.S., Williamson M.S., Field L.M., Wallace B.A. & Davies T.G.E. (2006).** Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemistry Journal*; 396, 255-263.
- Okara R.M., Sinka M.E., Minakawa N., Mbogo C.M., Hay S.I. & Snow R.W. (2010).** Distribution of the main malaria vectors in Kenya. *Malaria Journal*; 9:69.
- Okech B.A., Gouagna L.C., Kabiru E.W., Beier J.C., Yan G. & Githure J.I. (2004a).** Influence of age and previous diet of *Anopheles gambiae* on the infectivity of natural *plasmodium falciparum* gametocytes from human volunteers. *Journal of Insect Science*; 4:33.
- Okoye P.N., Brooke B.D., Koekemoer L.L., Hunt R.H. & Coetzee M. (2008).** Characterisation of DDT, pyrethroid and carbamate resistance in *Anopheles funestus* from Obuasi, Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 102 (6):591-8.
- Oliveira Gde A., Lieberman J. & Barillas-Mury C. (2012).** Epithelial nitration by a peroxidase/NOX5 system mediates mosquito antiplasmodial immunity. *Science*; 335:856-859.
- Olivry J.C. (1986).** Fleuves et Rivières du Cameroun. 9: *Collection Monographies Hydrologiques ORSTOM*. Paris.
- Olotu A., Fegan G., Wambua J., Nyangweso G., Awuondo K.O., Leach A., Lievens M., Leboulleux M.D., Njuguna P., Peshu N., Marsh K. & Bejon P. (2013).** Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *The New England Journal of Medicine*; 368: 1111-1120.
- OMS (1992).** Résistance des vecteurs aux pesticides. Quinzième rapport du comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle. *Technical Report Series*; 818: 68 p.
- OMS (2013).** World malaria report Geneva: World Health Organization; 2013:195.
- Oppenoorth F.J. (1985).** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. *In* Kerkut GA., Gilbert LI. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Oxford, UK: Pergamon 12, p. 731-733.
- Ouédraogo A.L., Bousema T., de Vlas S.J., Cuzin-Ouattara, Verhave J.P., Drakeley C., Luty A.J.F. & Sauerwein R (2010).** The plasticity of *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in relation to age in Burkina Fasso. *Malaria Journal*; 12:9:281.
- Oyewole I., Awolola T., Ibidapo C., Oduola A., Okwa O. & Obansa J. (2007).** Behaviour and population dynamics of the major anopheline vectors in a malaria endemic area in southern Nigeria. *Journal of Vector Borne Diseases*; 44: 56-64.

- Padley D., Moody A.H., Chiodini P.L. & Saldanha J. (2003).** Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Annal of Tropical Medicine and Parasitology*; 97:131-137.
- Pages F., Orlandi-Pradines E. & Corbel V. (2007).** Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et maladies infectieuses*; 37(3):153-161.
- REL P., Bonnet S., Boudin C., Tchuinkam T. & Vincent Robert. (2007).** Aggregation in malaria parasites places limits on mosquito infection rates. *Infection Genetics and Evolution*; 7:577-586.
- REL P., Coulson T.N., Raibaud A. & Brey P.T. (2000).** Sex determination in malaria parasites. *Science Journal*; 7, 287 (5450): 128-31.
- PCD (2011).** Plan Communal de Développement d'OKOLA.
- Peterson T.M., Gow A.J. & Luckhart S. (2007).** Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radical Biology Medicine*; 42: 132-142.
- Philbert A., Lyantagaye S.L. & Nkwengulila G.A. (2014).** Review of agricultural pesticides use and the selection for resistance to insecticides in malaria vectors. *Advanced Entomology*; 120-8.
- Pichon G., Awono-Ambene H., Vincent Robert (2000).** High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the blood meal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology*; 121:115-20.
- PNLP (2015).** Rapport d'activités du programme national contre le paludisme. Yaoundé: Ministère de la Santé Publique du Cameroun.
- PNLP (2019).** Rapport d'activités du programme national contre le paludisme. Yaoundé: Ministère de la Santé Publique du Cameroun.
- Poiré M., Raymond M. & Pasteur N. (1992).** Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L) mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochemical Genetics*; 30, 13-26.
- Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Germert G.J.A., Bensink M.G., Bolmer M. & Meuwissen J.H.E.Th. (1991).** Feeding behaviour and sporozoite injection by infected *Anopheles stephensi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 85:175-180.
- Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Germert G.J.A., Bensink M.P.E., Bolmer M. & Meuwissen J.H.E.Th. (1989).** Infectivity cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology*; 98:165-173.

- Pumpuni C.B., Demaio J., Kent M., Davis J.R. & Beier J.C. (1996).** Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 54:214-218?
- Ranson H. & Hemingway (2005).** Mosquito glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 22-241.
- Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J. & Collins F.H. (2000).** Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*; 9(5):491-497
- Ranson H. & Lissenden N. (2016).** Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitology*; 32(3):187-196.
- Reece S.E., Drew D.R. & Gardner A. (2008).** Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature*; May 29; 453 (7195): 609-14.
- Reid M.C. & McKenzie F.E. (2016).** The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. *Malaria Journal*; 15:107.
- Richman A.M., Dimopoulos G., Seeley D. & Kafatos F.C. (1997).** *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Embo J ournal*; 16, 6114-6119.
- Riehle M.M., Xu J., Lazzaro B.P., Rottschaefer S.M., Coulibaly B., Sacko M. Niare O., Morlais L., Traore S.F. & Vernik K.D. (2008).** *Anopheles gambiae* APL1 is a family of variable LRR proteins required for Rel1-mediated protection from the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLoS One*; 3:e3672.
- Rivero A., Vezilier J., Weill M., Read A.F. & Gandon S. (2010).** Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathology*; 6(8):e1001000.
- Riveron J.M., Chiumia M., Menze B.D., Barnes K.G., Irving H., Ibrahim S.S., Weedall G.D., Mzilahowa T., & Wondji C.S. (2015).** Rise of multiple insecticide resistance in *Anopheles funestus* in Malawi: a major concern for malaria vector control. *Malaria Journal*; 14:344.
- Riveron J.M., Osaе M., Egyir-Yawson A., Irving H., Ibrahim S.S. & Wondji C.S. (2016).** Multiple insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in southern Ghana: implications for malaria control. *Parasites & Vectors*; 9:50.
- Riveron J.M., Yunta C., Ibrahim S.S., Djouaka R., Irving H., Menze B.D., Hanafy M.I., Hemingway J., Ranson H., Albert A. & Wondji C.S. (2014).** A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biology*; 15:R27.

- Robert Vincent, Le Goff G., Andrianaivolambo L., Randimby F., Domarle O., Randrianarivelojosia M., Raharimanga V., Raveloson A., Ravaonjanahary C. & Ariey F. (2006).** Moderate transmission but high prevalence of malaria in Madagascar. *International Journal of Parasitology*; 36:1273-81.
- Robert Vincent, Read A.F., Essong J., Tchuinkam T., Mulder B., Verhave J.P. & Carnevale P. (1996).** Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 90(6):621-4.
- Robert Vincent, Petrarca V., Camevale P., Ovazza L. & Coluzzi M. (1989).** Analyse cytogénétique du complexe *Anopheles gambiae* dans la région de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Annals Parasitology Hum Composition*; 64: 290-311.
- Rodhain F. & Pérez C. (1985).** *Precis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Rue de l'école-de-Médecine, 75006 Paris.
- Rutledge L.C., Xard R.A. & Gould D.J. (1964).** Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News*; 24:407-419.
- Russell P.F., West L.S., Manwell R.D., Macdonald G. (1963).** *Practical Malariology*. No.Edn 2 pp. xiv + 750 pp.
- Sangba M.L., Olé, T.D., Solange P.W., Mirdad K., Martin A. & Mamadou O.N. (2016).** Insecticide resistance status of the *Anopheles funestus* population in Central African Republic: a challenge in the war. *Parasites & Vectors*; 9:230; 1510-9.
- Santolamazza F., Mancini E., Simard F., Qi Y., Tu Z. & della Torre A., (2008).** Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malaria Journal*; 7:163.
- Santos A., Cabezas M., Tavares A., Xavier R. & Branco M. (2015).** tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, Volume 32, Issue 4, 15 February 2016, Pages 627-628.
- Schneider P., Bousema J.T., Gouagna L.C., Otieno S., Vegte-Bolmer M., Omar S.A. & Sauwein R.W. (2007).** Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 76: 470-474.
- Scott J.A., W.G. Brogdon & F.H. Collins. (1993).** Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 49:520-529.
- Service M.W. (1960).** A taxonomic study of *Anopheles funestus funestus* Giles (Diptera: Culicidae) from southern and northern Nigeria, with notes on its varieties and synonyms. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*; 29:77-84.

- Service, M.W. (1993).** Mosquito ecology: field sampling methods. *Vector Biology and Control. Liverpool of Tropical Medicine*. Second edition, 988p.
- Shahabuddin M., Toyoshima T., Aikawa M., Kaslow D.C. (1993).** Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malaria parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Science USA*; 90:4266-4270.
- Sheehy S.H., Duncan C.J., Elias S.C., Biswas S., Choudhary P., Halstead F.D., Collins A.K., O'hara G.A., Ewer K.J., Mahungu T., Spender A.J., Miura K., Poulton I.D., Dicks M.J.D. Nick J.E., Berrie E., Moyle S., Colloca S., Cortese R., Gantlett K., Long C.A., L. A. M., Sarah C. Gilbert, Doherty T., Nicosia A., Hill A.V.S. & Draper S.J. (2012).** Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *PloS One*; 7: e31208.
- Shiff C.J.M.J., Hall T., Hunt R.H., Lyimo S. & Davis J.R. (2005).** Malaria infection potential of anopheline mosquitoes sampled by light trapping indoors in coastal Tanzanian villages. *Medical and Veterinary Entomology*; 9:256-62.
- Sinden R.E. (1975).** The sporogonic cycle of *Plasmodium yoelii nigeriensis*: a scanning electron microscope study-*Protistologica*; 11:31-39.
- Sinden R.E. (1983).** The cell biology of sexual development in *plasmodium*. *Parasitology*; 86 (Pt4):7-28.
- Smith A. (1961).** Observations on the man-biting habits of some mosquitoes in the South Pare area of Tanganyika. *East Africa Medical Journal*; 38:246.
- Sowunmi A., Gbotosho G.O., Happi C.T., Folarin O.A. & Balogun S.T. (2009).** Population structure of *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratios in malarious children in an endemic area. *Parasitology International*; 58: 438-443.
- Spillings B.L., Brooke B.D., Koekemoer L.L., Chiphwanya J., Coetzee M. & Hunt R.H. (2009).** A new species concealed by *Anopheles funestus* Giles, a major malaria vector in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 81(3):510-5.
- Stone W.J., Eldering M., van Gemert G.J., Lanke K.H., Grignard L., van de Vegte-Bolmer M.G., Siebelink-Stoter R., Graumans W., Roeffen W.F., Drakeley C.J., Saurwein R.W. & Bpousema T. (2013).** The relevance and applicability of oocyst prevalence as a read-out for mosquito feeding assays. *Science Reporting*; 3:3418.
- Suchel J.B., (1987).** Les climats du Cameroun. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Bordeau III, 1186p.
- Tabue R.N., Awono-Ambene P., Etang J., Atangana J., Antonio-Nkondjio C., Toto J.C., Patchocké S., Leke R.G.F., Fondjio E., Mnzava A.P., Knox T.B.K., Tougordi A., Donnelly M.J. & Bigoga J.D. (2017).** Role of *Anopheles* (*Cellia*) *rufipes* (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon: a crosssectional survey. *Parasites & Vectors*; 10:22.

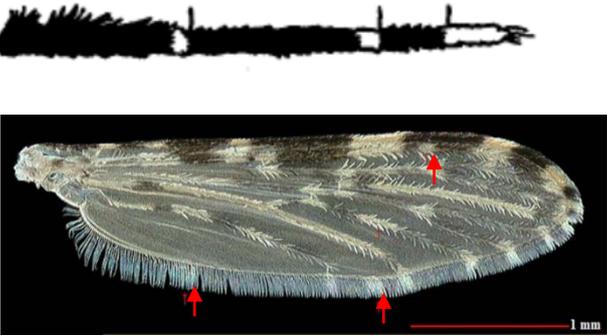
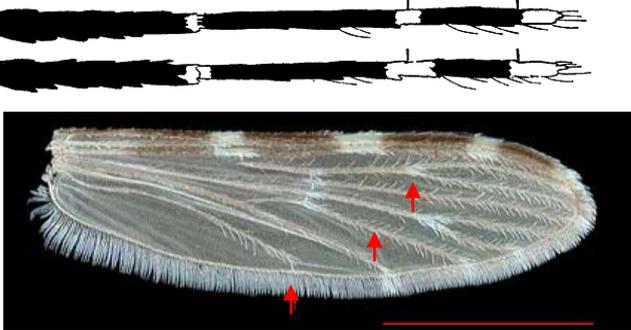
- Tajima F. (1989).** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*; 123,585-595.
- Tanga M.C., Ngundu W.I., Judith N., Mbuh J., Tendongfor N., Simard F., Wanji S. (2010).** Climate change and altitudinal structuring of malaria vectors in south-western Cameroon: their relation to malaria transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 104(7):453-60.
- Tchouakui M., Riveron J.M., Djonabaye D., Tchappa W., Hirving H., Takam S.P., Njiokou F. & Wondji C.S. (2018).** Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) mediated metabolic resistance to insecticides in the major African malaria Vector *Anopheles funestus*. *Genes (Basel)*; 9(12): pii: E645.
- Tchuinkam T., Simard F., Lele-Defo E., Tene-Fossog B., Tateng-Ngouateu A., Antonio-Nkondjio C., Mpoame M., Toto J.C., Njiné T., Fontenille D. & Awono-Ambene P.H. (2010).** Bionomics of Anopheline species and malaria transmission dynamics along an altitudinal transect in Western Cameroon. *BMC Infectious Diseases*; May; 10.
- Temu E.A., Minjas J.N., Tuno N., Kawada H. & Takagi M. (2007).** Identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group and their role in *Plasmodium falciparum* transmission in Bagamoyo coastal Tanzania. *Acta Tropical* May; 102(2): 119-25.
- Tene, F.B., Poupardin R., Costantini C., Awono-Ambene P., Wondji C.S., Ranson H., & Antonio-Nkondjio C. (2013).** Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *PLoS One*; 8(4):e61408.
- Tene F.B., Kopya E., Ndo C., Menze-Djantio B., Costantini C., Njiokou F., Awono-Ambene P.H. & Antonio-Nkondjio C. (2012).** Water quality and *Anopheles gambiae* larval tolerance to pyrethroids in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *Journal of Tropical Medicine*; 1-10.
- Thompson J., Higgins D. & Gibson T. (1994).** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*; 22, 4673-80.
- Thomson M.C., Connor S.J., Quinones M.L., Jawara M., Todd J. & Greenwood B.M. (1995).** Movement of *Anopheles gambiae* s.l. malaria vectors between villages in The Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*; 9 (4), 413-9.
- Touré Y., T. (1982).** Etude de la sensibilité d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. Cahiers ORSTOM, *Série Entomologie Médicale et Parasitologie*; 20(2):125-31.
- Touré, Y.T. (1984).** Sensibilité d'*Anopheles gambiae* s.l. aux insecticides dans la zone du barrage de Sélingué. *Parasitologia*; 26: 311-318.

- Tungu P., Magesa S., Maxwell C., Malima R., Masue D., Sudi W., Myamba J., Pigeon O. & Rowland M. (2010).** Evaluation of PermaNet 3.0 a deltamethrin-PBO combination net against *Anopheles gambiae* and pyrethroid resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes: an experimental huts trial in Tanzania. *Malaria Journal*; 9:21.
- Van den Eede, P., Vythilingam I., Ngo D.T., Nguyen V.H., Le X.H., D'Alessandro U. & Erhart A. (2010).** *Plasmodium knowlesi* malaria in Vietnam: some classifications. *Malaria Journal*; 9: 20.
- Van der Kolk M., Etti Tebo A., Nimpaye H., Ngo Ndongbol D., Sauerwein R. & Eling W. (2003).** Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaoundé Cameroon is seasonal and age-dependent. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 97:375-379.
- Vlachou D., Schlegelmilch T., Christophides G. & Kafatos F.C. (2005).** Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. *Current Biology*; 15:1185-95.
- Wanson (1949).** Une technique simple d'élevage des moustiques Taeniorhynchus. *Revue Zoologique*.
- Wanson M., Wolfs J. & Lebied B. (1947).** Comportement de l'*Anopheles* (*Myzomyia*) *moucheti* Evans. *Recueil de Travaux de Sciences Médicales*; au Congo Belge, 6:39-62.
- Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M. & Raymond M. (2004).** The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*; 13(1):1-7.
- Wéry M. (1995).** Protozoologie médicale. De Boeck Université. Issue Date: 1995. Pages: 273. URI: <http://hdl.handle.net/10390/5152>. ISBN: 2-8041-2048-1.
- WHO (2015).** World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2016).** World malaria report Geneva: World Health Organization.
- WHO (2017).** World Malaria Report 2017. WHO Global Malaria Programme. *World Health Organization* [http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report/en/Accessed 5 January 2018](http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report/en/Accessed%205%20January%202018).
- WHO (2018).** World malaria report 2018. [http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report/en/Accessed 5 January 2019](http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report/en/Accessed%205%20January%202019).
- WHO (2019).** World malaria report 2019. [http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report/en/Accessed 4 december 2019](http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report/en/Accessed%204%20december%202019)
- WHO (2020).** World malaria report Geneva: World Health Organization.
- Wilkes T.J., Matola Y.G. & Charlwood J.D. (1996).** *Anopheles rivulorum*, a vector of human malaria in Africa. *Medical and Veterinary Entomology*; 10:108-110.

- Williams J. & Joao P. (2012).** *Training manual on malaria entomology*. RTI Edition. USAID. Washington, DC, 2012.
- Wondji C.S., Coleman M., Kleinschmidt I., Mzilahowa T., Irving H., Ndula M., Rehman A., Morgan J., Barnes K.G. & Janet Hemingway (2012).** Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 109:19063-70.
- Wondji C.S., Dabire R.K., Tukur Z., Irving H., Djouaka R. & Morgan J.C. (2011).** Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochemistry Molecular Biology*; 41(7):484-91.
- Wondji C.S., Irving H., Morgan J., Lobo N.F., Collins F.H., Hunt R.H., Coetzee M., Hemingway J. & Ranson H. (2009).** Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Research*; 19 (3), 452-9.
- Xu J., Hillyer J.F., Coulibaly B., Sacko M., Dao A., Niare O., Riehle M.M., Traoré S. F. & Vernick K.D. (2013).** Wild *Anopheles funestus* mosquito genotypes are permissive for infection with the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *PLoS One*; 8(4):e61181.
- Zaim M., Aitio A. & Nakashima N. (2000).** Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*; 14 (1), 1-5.

ANNEXES

Annexe 1: Quelques caractères morphologiques d'identification des femelles d'*An. gambiae* s.l. et *An. funestus* s.l.

	Palpes et Ailes	Pattes
<i>An. gambiae</i> s.l.		 <p>Pattes mouchetées</p>
<i>An. funestus</i> s.l.		 <p>Pattes entièrement noires</p>

Annexe 2 : Dispositif de collecte des moustiques adultes à l'aide d'un aspirateur électrique.



Annexe 3 : Réactifs et quantités pour ELISA repas de sang et ELISA-CSP

1- Préparation du Tampon "Repas de sang" (à garder à + 4°C, 1 à 2 semaines)

Pour 1/2 L :

- 2,5 g de caséine dans 50 ml de NaOH 0,1N :
- faire bouillir jusqu'à totale dissolution
- ajouter 450 ml de PBS
- ajouter 0,025 % Tween 20 (soit 125 µl/1/2 L)
- ajouter 0,05 g Thiomerosal
- ajouter 0,01 g Phénol rouge
- Agiter 2 h

2- Préparation du Tampon Citrate pH4 :

Pour 1 L :

- Acide citrique: 11,77g ;
 - Hydroxyde de Sodium : 4,48g ;
 - Dissoudre la soude dans 200 ml d'eau bidistillée, puis l'acide citrique dans cette solution ;
- Ajouter 400 ml d'eau bidistillée. Ajuster le pH à 4 avec de l'acide Chlorhydrique 1N ;
Compléter à 1 L avec de l'eau bidistillée.

3- Préparation des témoins positifs pour ELISA repas de sang

- Ajouter 10 µl de sérum d'espèce dans 1 ml de PBS (homme (1/100), poulet (1/200), bœuf (1/100), mouton (1/30), chèvre (1/30), porc (1/100), cheval (1/100)).

4- Préparer les anticorps spécifiques d'espèces marqués à la peroxydase

Pour une plaque il faut:

- 50 µl X 12 = 600 µl (+50 µl) = 650 µl de solution de chaque IgG marquées

Dilutions à faire (dilution à vérifier par un damier, fonction de la marque):

Homme : 1/1000 2 µl IgG + 2 ml Tampon pour 3 plaques

Bœuf : 1/1000 2 µl IgG + 2 ml Tampon

Poule : 1/2000 1 µl IgG + 2 ml Tampon

Mouton : 1/500 4 µl IgG + 2 ml Tampon

Cheval : 1/1000 2 µl IgG + 2 ml Tampon

Porc : 1/1000 2 µl IgG + 2 ml Tampon

- Ajouter dans chaque tube d'IgG marquées les sérums hétérologues au 1/1000ème. Exemple:

Tube anti homme: aux AC marqués anti-homme dans 4 ml tampon

- ajouter 4µl de sérum de bœuf +4µl de sérum de poule + 4µl de sérum de mouton + 4µl de sérum de cheval +4µl de sérum de porc + 4µl de sérum de chèvre etc. (tous les autres sérums sauf Homme)

N : Ne PAS mettre de sérum de mouton avec AC marqués anti-chèvre ne PAS mettre de sérum de chèvre avec AC marqués anti-mouton.

5- Préparation du substrat de la peroxydase

Pour 3 plaques :

- 5 mg d'Ortho-tolidine dans 0,25 ml de N,N-diméthyl formamide
- 30 ml de Tampon citrate
- 12 µl de H₂O₂ à 10% (ou 4 µl à 30%).

6- Préparation du PBS

Reconstituer le PBS en poudre Sigma : 9,7 g dans 1 L d'eau distillée (ex réf. Sigma D 5773)

7- Préparation de la solution NP 40/BB = Nonidet P40 (Sigma n° 3516, 50 ml) pour une plaque

Pour 2 ml :

- 25 µl NP 40
- 2 ml tampon BB
- agiter.

8- Préparation du tampon BB

Dans 1 l PBS, ajouter :

- 5 g de Casein (Sigma C 5890)
- 0,1 g de Thiomérosal (Sigma T 5125)
- 0,04 g de Phenol rouge (Sigma P 4758)
- 10 g de BS (Sigma A 7906)
- agiter pendant 2h.

9- Préparation du PBS/TWEEN 20

- 500 µl de Tween 20
- 1 l de PBS,
- agiter

10- Reconstitution des anticorps monoclonaux lyophilisés (ACm)

- milieu reconstitution = 1/2 volume H₂O + 1/2 volume Glycérol (Sigma G.9012)
- 1,0 mg ACm + 2 ml milieu reconstitution (soit 500 µg/ml)
- 0,5 mg ACm + 1 ml milieu reconstitution (soit 500µg /ml)
- 0,25 mg ACm + 0,5 ml milieu reconstitution (soit 500µg/ml)

Annexe 4 : Préparation et composition de quelques réactifs de biologie moléculaire

1-Préparation du tampon d'extraction CTAB 2%

Pour 1 L

- 100 ml de 1M TrisHCl pH 8
- 20 ml de 0,5M EDTA
- 81,8 g de NaCl
- 20 g de CTAB
- H₂O en QSP pour 1 L

*Cetyl trimethyl ammonium bromide. Mélanger sous agitateur magnétique et conserver à TA.

2- Préparation du tampon de stockage 10X Tris-borate-EDTA (TBE 10X ; pH 8,2) pour migration des gels d'agarose

Pour 1 L

- 109 g de Tris base
- 55,6 g d'acide borique
- 40 ml de 0,5 M Na₂EDTA, pH 8
- H₂O en quantité suffisante pour (QSP) 1 L

NB : Bien mélanger et conserver à température ambiante.

**LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DE
LA THESE**

ARTICLE 1

Pyrethroid resistance and susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles coluzzii* populations from Yaoundé (Cameroon)



E-ISSN: 2320-7078
P-ISSN: 2349-6800
JEZS 2015; 3(6): 05-10
© 2015 JEZS
Received: 08-09-2015
Accepted: 10-10-2015

Edmond Kopya

(a) Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroun.
(b) Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, P.O. Box 337, Yaoundé, Cameroun.

Cyrille Ndo

(a) Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroun.
(b) Vector group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK
(c) Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, Douala Cameroun

Billy Tene Fossog

(a) Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroun.
(b) Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, P.O. Box 337, Yaoundé, Cameroun.

Timoléon Tchuinkam

Malaria Research Unit of the Laboratory of Applied Biology and Ecology (MRU-LABEA), Department of Animal Biology, Faculty of Science of the University of Dschang, P. O. Box 067 Dschang, Cameroun.

Parfait Awono-Ambene

Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroun.

Christophe Antonio-Nkondjio

(a) Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroun.
(b) Vector group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK.

Correspondence**Christophe Antonio-Nkondjio**

(a) Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroun.
(b) Vector group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK.

Pyrethroid resistance and susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection of *Anopheles coluzzii* populations from Yaoundé (Cameroun)

Edmond Kopya, Cyrille Ndo, Billy Tene Fossog, Timoléon Tchuinkam, Parfait Awono-Ambene, Christophe Antonio-Nkondjio

Abstract

The current study aims at assessing the influence of pyrethroid resistance on the outcome of *Plasmodium* infection in *Anopheles coluzzii* populations. Mosquito larvae collected in the field were reared in the laboratory, and then separated into two groups. The first group was exposed to permethrin 0.75%, the second acted as control group. Experimental infections were conducted with the two groups with field isolates of *Plasmodium falciparum* by direct membrane feeding assay. Blood fed females were dissected 7 days later to detect oocyst infection. The prevalence of infection between resistant and control was 13.95% and 14.83% respectively. The mean number of oocyst per infected gut in the resistant group was 4.95 whereas it was 3.98 for the control. No significant association between the knock down (*kdr*) allele presence and susceptibility to *Plasmodium* infection was detected. No influence of pyrethroid resistance on the outcome of infection was detected.

Keywords: *Anopheles coluzzii*, Cameroon, Infections, Insecticide resistance, Malaria, *Plasmodium falciparum*.

1. Introduction

Challenges deriving from the rapid evolution of pyrethroid resistance on malaria vectors vectorial capacity still remain not fully understood [1, 2]. Two main mechanisms conferred pyrethroid resistance: target site insensitivity and metabolic resistance. Target site insensitivity or knockdown resistance (*kdr* resistance), is induced by two mutations the first lead to a leucine to phenylalanine substitution (L1014F) West Africa *kdr* allele and the second, lead to a leucine to serine substitution (L1014S) East Africa *kdr* allele [3, 4]. Metabolic resistance is conferred by overexpression of enzymes belonging to three classes, esterases, glutathione S transferase and cytochrome P450 monooxygenases. Although pyrethroid resistance increases the survival capacity and thus the life span of mosquitoes in treated environments, its impact on malaria transmission or *Anopheles* mosquito susceptibility to *Plasmodium* remains unclear. Several factors including the level of mosquito anthropophily, biting rate, mosquito life span and the duration of parasite development in the mosquito influence transmission from mosquito to human and the intensity of malaria transmission [5]. Before being transmitted by the mosquito, *Plasmodium* gametocytes ingested during a blood meal undergoes a complete cycle in the mosquito stomach called the sporogonic cycle which last 12 to 14 days according to the temperature. At the end of this cycle, sporozoites are released in the hemolymph from where, they migrate through to the salivary glands and are inoculated during subsequent blood meals [6]. Several parameters including mosquito immune system and other exogenous factors (antibodies, phagocytosis, temperature) influence the success of this cycle [6]. There are increasing evidences supporting the influence of insecticide resistance genes on *Plasmodium* sporogonic cycle [7]. Gene expression analysis during the sporogonic cycle showed cytochrome P450 genes differentially expressed at different phases of parasite infection and in different tissues [7]. The detoxification enzyme *CYP6M2* and several other detoxifications genes such as *CYP6AG1*, *CYP6M4*, *CYP6M1*, *CYP4G17*, *CYP9J5* and *CYP12F3* were reported to be strongly up regulated in the midgut and the fat body shortly after ingestion of an infected blood meal or during *Plasmodium* infection [7, 8]. Experimental infections assays using three resistant *An. gambiae* strains with field isolates of *Plasmodium falciparum* showed that mosquitoes carrying the *kdr* resistant alleles were more infected than susceptible [9]. Because pyrethroid resistance has increased dramatically over the past decade across Africa, it becomes

urgent to assess the genetic and biological implications of this evolution on mosquito vectorial capacity and malaria transmission.

In Cameroon, the evolution of pyrethroid resistance has been particularly important in major cities where mosquitoes of the *An. gambiae* complex happen to be the main vectors^[10-12]. In the city of Yaoundé, a cross sectional survey reported an annual prevalence of 35% of *Plasmodium falciparum* asexual parasites carriers, 4.4% of gametocyte carriers in the general population and an entomological inoculation rate of 33 infected bites/man/year^[13]. Experimental infections studies analysing the vectorial competency of the main vectors in the area *An. coluzzii* and *An. gambiae* showed infections to be more prevalent in *An. coluzzii* however no difference in the infection intensity was detected between the two species^[14]. Studies conducted so far in the city of Yaoundé reported a good adaptation of both *An. coluzzii* and *An. gambiae* to polluted habitats in urban and periurban settings^[15, 16]. It is still unclear whether the current adaptation of mosquitoes to the urban environment combined to the rapid evolution of pyrethroid resistance is affecting malaria transmission dynamic. In the present study, we assessed if the high prevalence of pyrethroid resistance in *An. coluzzii* has influenced its susceptibility to *Plasmodium falciparum*.

Materials and Methods

Study sites

The study took place in Yaoundé (3° 51'N 11° 30'E) the capital city of Cameroon. The city is situated within the Congo-Guinean phytogeographic zone characterized by a typical equatorial climate with two rainy seasons extending from March to June and from September to November. The annual average rainfall in Yaoundé is 1,700 mm. The city is situated 800 m above sea level and is surrounded by many hills.

Larval collections in Yaoundé were carried out in five districts situated in the city centre: Mokolo, Messa, Olezoa, Ahala and Combattant. Studies conducted in Yaoundé indicated that 75 - 85% of mosquitoes in these districts were susceptible to permethrin (11).

The present study was conducted under the ethical clearance N° 216/CNE/SE/09 delivered by the Cameroon National Ethics Committee Ref N° IORG0006538-IRB00007847-FWA00016054.

Mosquito collection

Mosquitoes were collected in breeding habitats and reared until the adult stage then were separated in two batches. The first batch constituted of mosquitoes aged between 2 - 3 days was exposed for one hour to 0.75% permethrin impregnated papers. Insecticide susceptibility tests were performed according to WHO procedures between 25 and 27 °C^[17]. After exposure, mosquitoes were kept in a room at 25 °C with 70 - 75% humidity and fed with a 10% glucose solution and the number of dead mosquitoes was recorded 24 hours post-exposure. Tests using untreated papers were systematically run as controls. Mosquitoes still alive after 24 hours observation period were considered as resistant and starved for 24 hours before being infected. The second batch considered as control was exposed to untreated papers and then starved for 24 hours before blood feeding with an infected blood meal.

Mosquito identification

Anopheline larvae were collected and reared until the adult stage before being identified morphologically using the Gillies and Coetzee keys^[18]. Mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex were subjected to PCR assays designed for species and molecular forms identifications^[19]. Genomic DNA used for molecular analysis was extracted from the legs of adult mosquitoes according to Cornel & Collins^[20] protocols. To screen for the presence of the *kdr* alleles (1014F and 1014S), DNA extracted from individuals exposed to insecticide was tested using the TaqMan assay^[21].

Experimental infections

Mosquitoes were placed in cups of at least 25 individuals covered with netting. An equivalent number of mosquitoes of the two mosquitoes batches (resistant and control) were used for experimental infections. At least five replicates were conducted. Starved females aged 3 to 6 days were allowed to feed for 35 minutes on a membrane feeder with blood from a gametocyte carrier. Before feeding, the gametocyte carrier serum was replaced by a non-immune AB serum to avoid human transmission blocking factors. At the end of the feeding, unfed females were removed from cups. Blood fed females were kept in the insectary with daily access to a 10% glucose solution. Mosquitoes were dissected 7 days post infection in sterile phosphate buffered saline solution under a binocular microscope. Experimental infections were conducted during two consecutive infection sessions. The first session from April to May 2012 (during the small rainy season) was conducted using nine gametocyte carriers, the second infection session from September to October 2012 (during the long rainy season) used 6 gametocyte carriers.

Statistical analysis

The data generated from infection experiments including the number of mosquitoes tested, the number of mosquitoes found infected, the status of mosquitoes resistant and control, the period of infection and the density of gametocytes per µl of blood were registered in an excel database. The data was grouped into control and resistant before being analyzed. The correlation between gametocyte density and oocyst infection prevalence or oocyst number was assessed using regression analyses. Comparison between means was assessed using ANOVA or Kruskals Wallis test in case of inequality of sample variances. Percentages were compared using the chi square test. The difference was recorded as significant for P<0.05. All analysis were performed using the software MedCalc V13.3.3.

Results

Selection of permethrin resistant specimens and experimental infections

Adult susceptibility tests were conducted to select mosquitoes displaying resistance to permethrin. Of a total of 2367 mosquitoes aged 2 to 3 days old exposed to 0.75% permethrin, 1083 were recorded as dead this giving rise to a mortality rate of 45.76%. Survivors were used for experimental infections. A total of 3157 mosquitoes including survivors to permethrin and unexposed females (control) were used for experimental infections. Gametocyte carriers used for the study had a gametocyte density ranging from 7 to 285 gametocyte/µl. Only

912 females *Anopheles coluzzii* successfully fed on *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers blood. There was no significant difference between the feeding rates of mosquitoes considered as resistant and the control ($P > 0.05$). Mosquitoes used for the study were genotyped and were all *An. coluzzii*. The infection rate varied from 13.95% for

resistant and 14.83% for control and was not significantly different ($P = 0.93$). The mean number of oocysts per infected gut in resistant mosquitoes was 4.95 with a range of 1-28 and in the control group was 3.98 with a range of 1-39 (Table 1). The difference was not significant ($F = 1.8$; $P = 0, 14$).

Table 1: Results of the experimental infections using resistant and unexposed *An. coluzzii* females seven days after blood feeding on *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers blood.

Status	N blood fed	N diss	N positive (oocysts)	% of positive (CI 95%)	Mean oocysts/gut (CI 95%)
Resistant	204	129	18	13.95% (8.3 - 22.05)	4.95 (3.4 - 6.5)
Control	708	344	51	14.83% (11 - 19.5)	3.98 (2.44 - 5.52)
Total	912	473	69	14,59% (11.3 - 18.5)	4.28 (3.17 - 5.39)

N: number; diss: dissected; CI 95% confidence interval, Control: mosquitoes unexposed to permethrin

Variation of oocyst infections according to the gametocytes density

Regression analysis was conducted to assess the correlation between gametocyte densities and the prevalence of infection at the oocyst stage in both the resistant and the control group. A positive and significant correlation was recorded when the prevalence of infection at the oocyst stage was plotted against Log of gametocyte density in the control group ($R^2 = 0.45$; $F = 17.37$; $P = 0.0004$) whereas a positive but not significant correlation was recorded in the resistant group ($R^2 = 0.32$; $F =$

4.74; $P = 0.054$) (Figure 1). Regression analysis assessing the correlation between the number of oocyst against Log of gametocyte density showed a positive and significant correlation in the control group ($R^2 = 0.25$; $F = 15.69$; $P = 0.0003$) whereas a positive but not significant correlation was recorded in the resistant group ($R^2 = 0.19$ $F = 4.7$; $P = 0.04$). As a general picture, it appeared that mosquito displaying high oocyst counts were those who fed on blood with high gametocyte densities (Figure 2).

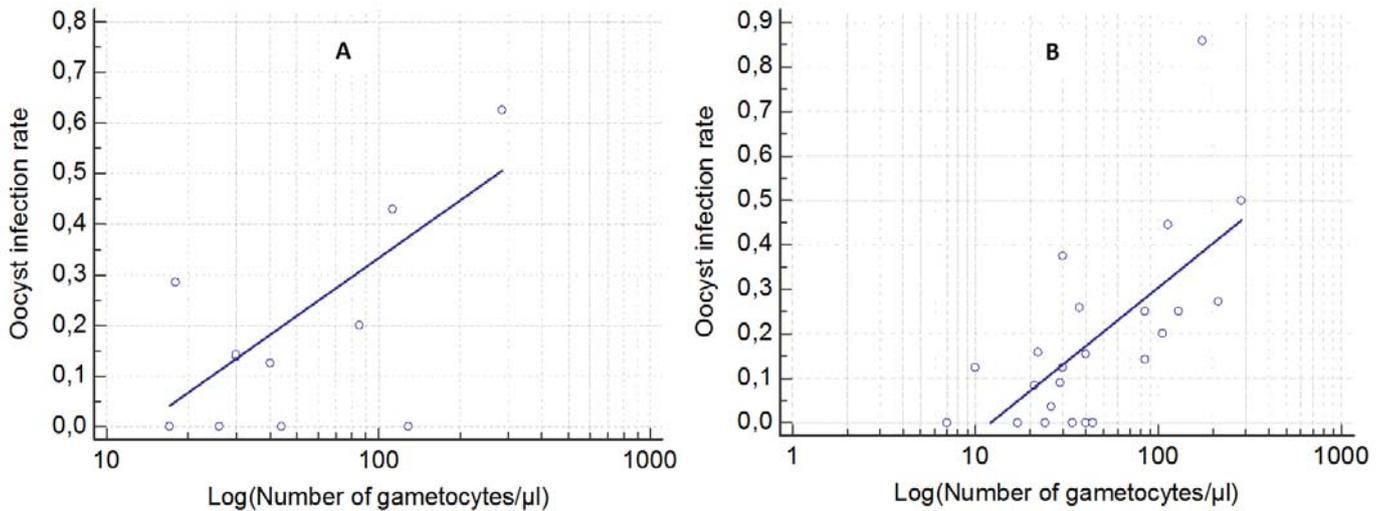


Fig 1: Correlation between oocyst infection rate and Log of gametocyte density in *An. coluzzii* resistant group (A) and control group (B).

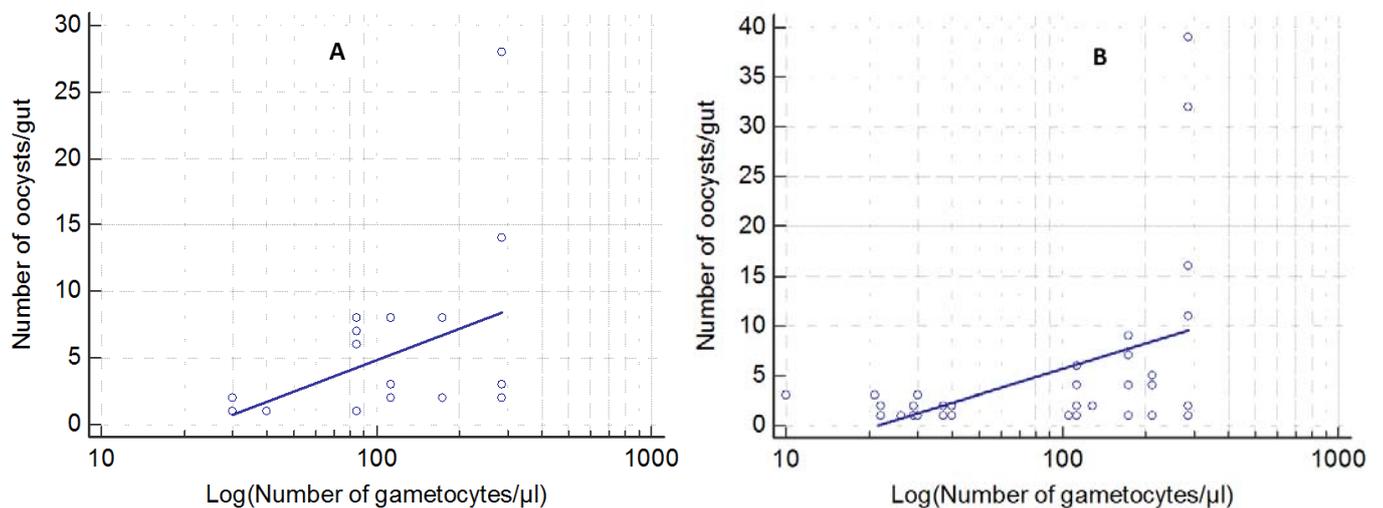


Fig 2: Correlation between oocyst number and Log of gametocyte density in *An. coluzzii* resistant group (A) and control group (B).

Variation of oocyst infection according to the *kdr* genotypes

All dissected mosquitoes including infected specimens and uninfected mosquitoes were genotyped to assess the prevalence of the *kdr* allele. This included 110 specimens genotyped as homozygotes (RR), 48 as heterozygotes (RS) and 13 as susceptible (SS). Over 98% of mosquitoes detected with *kdr* had the West Africa *kdr* allele (1014F). The

prevalence of mosquitoes carrying the *kdr* allele and becoming infected varied greatly between groups (Figure 3). No significant association between *kdr* allele presence and susceptibility to *Plasmodium* infection was detected ($P = 0.10$). Equally, no significant association was recorded when comparing the prevalence of oocyst infection and *kdr* genotypes ($P > 10$) (Table 2).

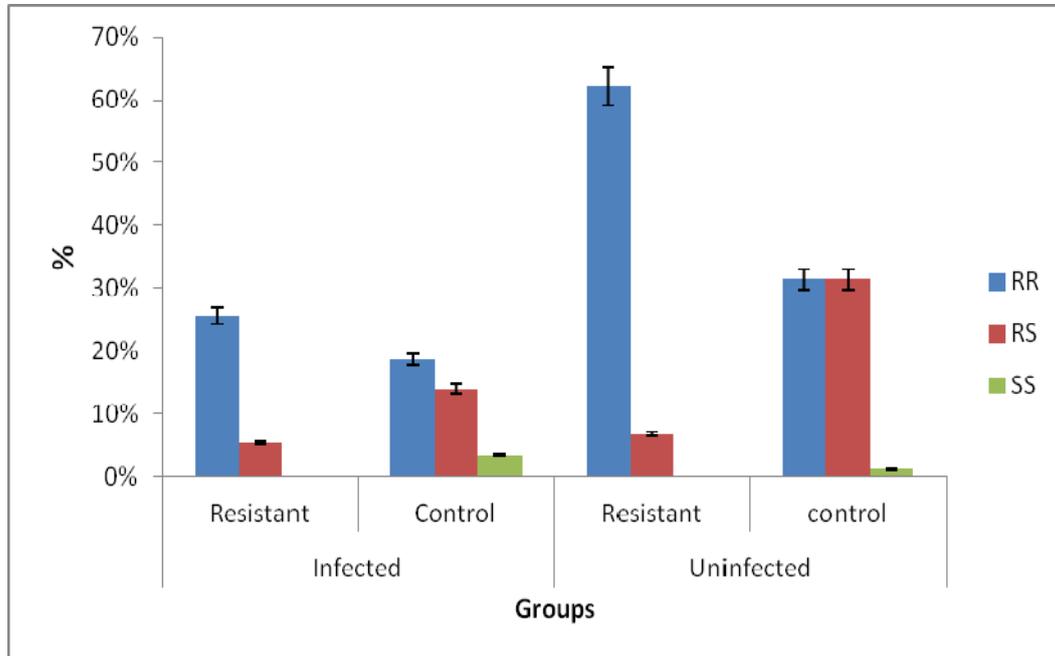


Fig 3: Diagram presenting the prevalence of mosquitoes carrying the *kdr* allele, infected and uninfected in both the control and exposed group (bars with standard errors) (RR: homozygote for *kdr*, RS: heterozygote for *kdr*, SS: susceptible).

Table 2: Comparison of the prevalence of *Plasmodium falciparum* oocyst infection between different *kdr* genotypes.

	<i>kdr</i> genotypes		
	RR vs RS	RR vs SS	RS vs SS
OR (95% CI)	0.96 (0.46 - 1.98)	0.16 (0.02 - 1.59)	0.117 (0.02 - 1.73)
P	0.91	0.11	0.13

OR, odds ratio, RR: homozygote, RS: heterozygote, SS: susceptible, 95% CI: 95% confidence interval.

Discussion

One of the main questions arising from the increasing prevalence of insecticide resistance in malaria vectors is to know if it does affect the outcome of *Plasmodium* infection in mosquito. During the present study, mosquito characterized phenotypically as resistant to permethrin were compared to control to assess their vectorial competency. No significant difference of the infection prevalence at the oocyst stage between resistant and control was recorded. These findings were different from recent studies suggesting pyrethroid resistant mosquitoes more efficient in parasite transmission than susceptible mosquitoes [9, 22]. The low power of assessing any difference of our study could come from the fact that the general population (including both susceptible and resistant) was used as control. Although bioassay analysis suggested a similar prevalence of permethrin resistant and susceptible individuals in the population, the use of the general population as control could have reduced the power of the analysis because of the small difference that could exist between

resistant and susceptible individuals in the field. Thus the use of the general population as control could also have reduced risks of overestimating the real contribution of pyrethroid resistant mosquitoes to malaria transmission. It is rather possible that transmission intensity might be high in resistant compare to control due to the high average number of oocysts recorded per gut in this group. Yet the following still deserve further investigations since infections at the sporozoite stage were not assessed. The prevalence of oocyst infections in each group was low and could likely be the result of the low infectivity of gametocytes carriers blood. Indeed several factors including gametocyte maturity, the mosquito immune system, temperature, digestive enzymes or the presence of monoclonal *Plasmodium falciparum* isolates were reported to influence the outcome of infection in natural mosquito populations [23, 24]. Recent studies in the city of Yaoundé, indicated that the abundance of Enterobacteriaceae in the midgut can also increase mosquito susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection [25]. The following underlying the important number of factors that could contribute in shaping the vectorial competency and vectorial capacity of local vector populations.

Correlation analysis showed on their part that, the outcome of infections from different feeding assay varied according to the density of gametocytes in the blood meal. It also appeared from the study that a considerable number of mosquitoes became infected after ingesting blood meals containing very low gametocyte densities. The following could likely be the

result of gametocyte aggregation as reported earlier ^[26] or an evolution of mosquito vectorial competency. Studies assessing the vectorial competency of *An. gambiae* and *An. coluzzii* in Yaoundé reported different infection prevalence between the two species supporting a high vectorial competency for *An. coluzzii* compare to *An. gambiae* ^[14]. In the city of Yaoundé, *An. coluzzii* is mainly distributed in the city centre while *An. gambiae* is abundant in rural and periurban areas ^[15, 16]. But it is still unknown whether the adaptation of *An. coluzzii* to urban centre could have important influence on the intensity of malaria transmission. The number of oocysts per infected gut also appeared positively correlated to gametocytes density in the blood meal. The following is in agreement with previous studies showing a strong linear and positive relationship between gametocytes or ookinetes densities and oocyst density ^[23].

Although the prevalence of oocyst infections was high in mosquitoes displaying the *kdr* allele, no significant difference was detected between mosquitoes carrying the *kdr* allele in the resistant and the control groups. Recent investigations by Alout *et al.* ^[9] using two *An. gambiae* strains (one resistant the other susceptible) sharing a common genetic background suggested the presence of *kdr* alleles influencing the outcome of *Plasmodium* infection. In their study Alout *et al.* ^[9] detected a high and significant parasite prevalence at both the oocyst and sporozoite stages in resistant compare to control. Similar findings were recorded in Senegal by Ndiath *et al.* ^[22] using F3 progeny of *An. gambiae* and *An. coluzzii*. It is still unknown under which mechanism the presence of the *kdr* mutation influence malaria vector vectorial competency. Gene expression analysis of pyrethroid resistant *An. gambiae* mosquitoes suggested the upregulation in these mosquitoes of antimicrobial genes involved in the anti-*Plasmodium* immune response which might potentially influence the response to malaria infection ^[27]. Several detoxification genes including CYP6M2, CYP6M3, CYP6AG1, CYP9J5, CYP49A1, CYP12F4, CYP6Z1 were also reported differentially expressed during the midgut invasion by *Plasmodium* ^[28]. Studies conducted by Felix *et al.* ^[8] showed that the number of cytochrome P450 genes upregulated decrease significantly between day 1 after blood meal and day 11 post blood meal. With the fast evolution of pyrethroid resistance, understanding how this is affecting mosquitoes vectorial capacity is becoming urgent in order to improve the fight against pyrethroid resistant malaria vectors.

Conclusion

Our study objective was to assess the existence of any relationship between pyrethroid resistance and the outcome of infection in *An. coluzzii*. Although the study did not provide clear evidences of any influence of pyrethroid resistance on the outcome of infection, the rapid evolution of pyrethroid resistance in malaria vector populations requests further attention.

Acknowledgements

This work was supported by a Wellcome Trust Intermediate Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (WTO86423MA) to CAN. We will like to thank Dr Morlais and Dr Nsango for their assistance during experimental infections assays.

References

1. Ranson H, Nguessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? Trends Parasitol 2011; 27:91-8.
2. Wondji C, Coleman M, Kleinschmidt I, Mzilahowa T, Irving H, Ndula M *et al.* Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109:19063-70.
3. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Berge J, Devonshire A *et al.* Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* S.S. Insect Mol Biol 1998; 7:179-84.
4. Ranson H, Jensen B, Vulule J, Wang X, Hemingway J, Collins F. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol 2000; 9:491-7.
5. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector. Trends Parasitol 2010; 26:130-6.
6. Siden-Kiamos I, Louis C. Interactions between malaria parasites and their mosquito hosts in the midgut. Insect Biochem Mol Biol 2004; 34:679-85.
7. Félix R, Silveira H. The role of *Anopheles gambiae* P450 cytochrome in insecticide resistance and infection. Intech, 2012, 503-18.
8. Félix R, Muller P, Ribeiro V, Ranson H, Silveira H. *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. BMC Genomics 2010; 11:312.
9. Alout H, Tuikue Ndam N, Sandeu M, Djégbé I, Chandre F, Dabire K *et al.* Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* ss for *Plasmodium falciparum* field isolates. PLoS One 2013; 8:e63849.
10. Antonio-Nkondjio C, Defo-Talom B, Tagne-Fotso R, Tene-Fossog B, Ndo C, Lehman L *et al.* High mosquito burden and malaria transmission in a district of the city of Douala, Cameroon. BMC Infectious Diseases 2012; 12(1):275.
11. Antonio-Nkondjio C, Fossog B, Ndo C, Djantio B, Togouet S, Awono-Ambene P *et al.* *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. Malar J. 2011; 10:154.
12. Nwane P, Etang J, Chouaibou M, Toto J, Koffi A, Mimpfoundi R *et al.* Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* sl populations from Cameroon, Central Africa. Parasit Vector 2013; 6:41.
13. Van der Kolk M, Etti Tebo A, Nimpaye H, Ngo Ndombol D, Sauerwein R, Eling W. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaoundé Cameroon is seasonal and age-dependent. Trans R Soc Trop Med and Hyg 2003; 97:375-9.
14. Boissiere A, Gimonneau G, Tchioffo M, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambene P *et al.* Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *An. Gambiae* S.S. In Cameroon. PLoS One. 2013; 8:e54820.

15. Kamdem C, Fossog B, Simard F, Etouna J, Ndo C, Kengne P *et al.* Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. PLoS One. 2012; 7:e39453.
16. Tene Fossog B, Kopya E, Ndo C, Menze-Djantio B, Costantini C, Njiokou F *et al.* Water quality and *Anopheles gambiae* larval tolerance to pyrethroids in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon). J Trop Med, 2012, 1-10.
17. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria Vectors. Bio-efficacy and Persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/MAL/98.,12. Report of the WHO Informal Consultation, Geneva, 1998, 43.
18. Gillies M, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). Pub. South Afr. Inst. Med. Res 1987; 55:143.
19. Fanello C, Santolamazza F, Della A. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. Med Vet Entomol 2002; 16:461-4.
20. Cornel A, Collins F. PCR of the ribosomal DNA intergenic spacer regions as a methods for identifying mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. Methods mol Biol 1996; 56:321-32.
21. Bass C, Nikou D, Donnelly M, Williamson M, Ranson H, Ball A *et al.* Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: A comparison of two new high-throughput assays with existing methods. Malar J. 2007; 6:111.
22. Ndiath M, Cailleau A, Diedhiou S, Gaye A, Boudin C, Richard V *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; 13:340.
23. Gouagna L, Mulder B, Noubissi E, Tchuinkam T, Verhave J, Boudin C. The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. Trop Med Int Health 1998; 3:21-8.
24. Nsango S, Abate L, Thoma M, Pompon J, Fraiture M, Rademacher A *et al.* Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. Int J Parasitol 2012; 42:589-95.
25. Boissiere A, Tchioffo M, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango S *et al.* Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. PLoS Pathog. 2012; 8(5):e1002742.
26. Pichon G, Awono-Ambene H, Robert V. High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. Parasitology 2000; 121:115-20.
27. Dimopoulos G, Christophides G, Meister S, Schultz J, White K, Barillas-Mury C *et al.* Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge and malaria infection. Proc Natl Acad Sci 2002; 99:8814 - 9.
28. Vlachou D, Schlegelmilch T, Christophides G, Kafatos FC. Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. Curr Biol 2005; 15:1185-95.

ARTICLE 2

High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays

RESEARCH

Open Access



High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays

Cyrille Ndo^{1,2,3*}, Edmond Kopya^{1,4}, Benjamin Menze-Djantio^{2,5}, Jean Claude Toto¹, Parfait Awono-Ambene¹, Gareth Lycett² and Charles S. Wondji^{2,5}

Abstract

Background: *Anopheles funestus* is a major vector of malaria in sub-Saharan Africa. However, because it is difficult to colonize, research on this mosquito species has lagged behind other vectors, particularly the understanding of its susceptibility and interactions with the *Plasmodium* parasite. The present study reports one of the first experimental infections of progeny from wild-caught *An. funestus* with the *P. falciparum* parasite providing a realistic avenue for the characterisation of immune responses associated with this infection.

Methods: Wild-fed resting *An. funestus* females were collected using electric aspirators and kept in cages for four days until they were fully gravid and ready to oviposit. The resulting eggs were reared to adults F1 mosquitoes under insectary conditions. Three to five day-old *An. funestus* F1 females were fed with infected blood taken from gametocyte carriers using an artificial glass-parafilm feeding system. Feeding rate was recorded and fed mosquitoes were dissected at day 7 to count oocysts in midguts. Parallel experiments were performed with the known *Plasmodium*-susceptible *An. coluzzii* Ngouso laboratory strain, to monitor our blood handling procedures and infectivity of gametocytes.

Results: The results revealed that *An. funestus* displays high and similar level of susceptibility to *Plasmodium* infection compared to *An. coluzzii*, and suggest that our methodology produces robust feeding and infection rates in wild *An. funestus* progeny. The prevalence of infection in *An. funestus* mosquitoes was 38.52 % (range 6.25–100 %) and the median oocyst number was 12.5 (range 1–139). In parallel, the prevalence in *An. coluzzii* was 39.92 % (range 6.85–97.5 %), while the median oocyst number was 32.1 (range 1–351).

Conclusions: Overall, our observations are in line with the fact that both species are readily infected with *P. falciparum*, the most common and dangerous malaria parasite in sub-Saharan Africa, and since *An. funestus* is widespread throughout Africa, malaria vector control research and implementation needs to seriously address this vector species too. Additionally, the present work indicates that it is feasible to generate large number of wild F1 infected *An. funestus* mosquitoes using membrane feeding assays, which can be used for comprehensive study of interactions with the *Plasmodium* parasite.

Keywords: Experimental infection, *Anopheles funestus*, *Plasmodium falciparum*, Membrane feeding

* Correspondence: cyrndo@yahoo.fr

¹Malaria Research Laboratory, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroon

²Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK

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



Background

Despite recent progress in reducing malaria burden, it remains one of the most debilitating diseases in the tropical world with 198 million cases reported in 2013, leading to more than 500,000 deaths [1]. In sub-Saharan Africa, where about 90 % of all malaria deaths occur, mosquitoes from *Anopheles gambiae* complex and *Anopheles funestus* group are the most efficient vectors [2–5], while *P. falciparum* is the most common and dangerous parasite responsible for most cases of severe malaria [1].

Current efforts to control or to eliminate malaria rely heavily on vector control interventions such as large-scale distribution of long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) and in some places through indoor residual house spraying (IRS) [6–8]. In parallel, research on new and innovative malaria control tools that could enhance the efficacy or complement existing approaches is needed. One of the approaches being pursued is the genetic replacement of vector populations with non-vectors in order to disrupt parasite transmission [9–11]. However, this requires first of all a good understanding of the complex and specific interactions between the *Plasmodium* parasites and its *Anopheles* vectors, notably the associated immune response.

Obtaining sufficient *Plasmodium* experimentally infected mosquitoes is the first and one of the most challenging steps of research on *Anopheles-Plasmodium* interactions. In *An. gambiae* which is easier to colonize and adapts well to feed on the artificial parafilm membrane, successful experimental infections are commonly performed using either the rodent *P. berghei* or cultured or recently field collected human *P. falciparum* parasites. This has allowed the identification of important mosquito factors that may prove to be favourable targets for novel interventions towards blocking malaria transmission [12–14].

If such progress has been achieved in *An. gambiae*, little advance has been observed for the other major malaria vector *An. funestus*. It is known that *An. funestus* exhibits important differences to *An. gambiae* in term of its biology, genetics and ecology as shown by the difficulty of rearing and feeding this species in laboratory conditions [3]. Such difficulty has largely slowed the pace of research on this species, particularly its interactions with the *Plasmodium* parasite.

By collecting indoor resting gravid females and force them to lay eggs, it is now possible to generate large F1 colonies of *An. funestus* for controlled experimentation [15, 16]. This method already allowed study of insecticide resistance mechanisms throughout Africa [17–21]. Conversely, only two studies have investigated *An. funestus* susceptibility to the rodent parasite *P. berghei* [22, 23], and none have been performed with the natural human parasite *P. falciparum*. Despite similarities between these two *Plasmodium* species, important

differences in interactions with mosquito vectors have been reported [14, 24]. This observation point out the necessity of following up discoveries in laboratory model systems with studies on natural parasite-mosquito interactions, particularly in the perspective of investigating molecular bases of *An. funestus* immune response to *Plasmodium* infection.

This paper reports the first experiments in which first generation of wild-caught *An. funestus* mosquitoes are infected with natural *P. falciparum* gametocytes using an artificial blood feeding system.

Methods

Mosquito collections

Anopheles funestus mosquitoes were collected in Mebelong (6°46'N, 11°70'E), a village situated in humid savannah region, about 350 km North of Yaoundé, the capital city of Cameroon. This site is characterised by a high density of mosquitoes resting indoors.

Resting mosquitoes were collected using electric aspirators (Rule In-Line Blowers, Model 240). In the field, *An. funestus* mosquitoes were sorted from other *Anopheles* species based on morphological criteria [25, 26] and kept in paper cups for four days or more until they were fully gravid and ready to lay eggs. Once brought back in the insectary, females were allowed to oviposit individually using a forced egg-laying method [15]. After oviposition, all the carcasses were preserved in individual tubes containing desiccant for molecular identification [27, 28] and for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to assess *Plasmodium* infection rate. All other *Anopheles* species collected as well as *An. funestus* specimens that died before reaching the insectary were also preserved for ELISA, to identify blood meal source and assess *Plasmodium* infection rate according to [29, 30] and [31], respectively. Positive samples to ELISA were determined by reading the optical densities at 405 nm using an ELISA plate reader (BioTek ELx800, Swindon, UK).

We used the *An. coluzzii* Ngousso laboratory strain as a control sample to monitor for the effectiveness of blood handling procedure and infectivity of gametocytes during infection experiments. The Ngousso strain, routinely maintained at OCEAC, has been extensively used in experimental infection studies and is known to be well adapted to feed through artificial parafilm membrane and is highly susceptible to *Plasmodium* infection [32]. *Anopheles funestus* and *An. coluzzii* females were fed with blood from same gametocyte carriers to directly compare prevalence of infection.

Identification of gametocyte carriers

Parasitological surveys to detect gametocyte carriers were conducted during a high transmission period from March to June 2015. Children aged between 5 and 11

were recruited at local schools of the locality of Okola (4°01'N, 11°22'E), a rural area situated about 25 km from Yaoundé. Blood samples from each child enrolled in the study were screened by direct microscopic (100×) visualization of *Plasmodium* parasites on thick blood smears stained with 10 % Giemsa. Trophozoite density was determined using semi quantitative count (thick film) method following a semi-quantitative scale [33]. Gametocyte density was estimated by microscopy read against 500 leucocytes, assuming a standard white blood cell concentration of 8,000/μl [34].

Experimental infections

Gametocyte carriers were selected based on parasite density in blood after their haemoglobin content was first measured using Haemocue (HaemoCue® AB, Angelholm, Sweden). Children with abnormally low haemoglobin rate were treated for anaemia and their blood was not used. For selected children, a volume of 3–4 ml of blood was taken by venepuncture into heparinized tubes. The blood was immediately centrifuged at 37°C and the serum was replaced by the same volume of European AB serum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), pre-warmed at the same temperature. The reconstituted blood was offered to mosquitoes immediately.

Groups of 80 to 100, 3–5-day-old F1 female mosquitoes were counted into paper cups covered with mosquito netting and starved 12h before experiments. 450 μl aliquots of reconstituted blood were placed in each glass feeder with a parafilm membrane maintained at 37°C using a circulating heating water bath (Fisher Scientific INC, Isotemp 4500H5P, Pittsburgh USA). Mosquitoes were allowed to feed for 45min, after which unfed and partially fed mosquitoes were removed. Mosquitoes were maintained in separate cups in the insectary at 26 ± 2°C and 70 to 80 % relative humidity, with a constant supply of 10 % sucrose and daily mortality was recorded. Part of fed mosquitoes were preserved in RNAlater for future transcriptomic analysis. The remaining ones were dissected at day 7 post-infection in a drop of 0.4 % mercurochrome and stained midguts were examined for detection and quantification of oocysts under light microscopy (40×) [35].

Data analysis

Parameters recorded included number of mosquitoes fed per batch, mortality to day 7, number of mosquitoes infected at oocyst stage and number of oocysts per midgut. For each experiment, the median oocyst number was determined and mean oocyst number per midgut was calculated by dividing the total number of oocysts counted by the number of mosquitoes found infected after dissection.

Fisher's exact test was used to compare prevalence of infection between species. The median oocyst numbers were compared using the nonparametric Mann–Whitney test. Correlation between the prevalence of infection, the median number of oocyst and the gametocytemia was analysed using Spearman's correlation. All statistical analyses were performed using Graph Pad prism V.5 and *P*-values of 0.05 or less were considered as significant.

Results

Mosquito population and rearing

During eight days, a total of 1,918 mosquitoes belonging to three genera were collected in Mebelong. *Anopheles* mosquitoes were by far the most abundant representing 99.48 % of mosquitoes, while *Culex* and *Mansonia* accounted for less than 1 %. Three *Anopheles* species were identified in the locality: *An. funestus* (*s.l.*) the main vector species ($n = 1,831$; 95.96 %), *An. gambiae* (*s.l.*) ($n = 74$; 3.88 %) and *An. pharoensis* ($n = 3$; 0.16 %). According to the molecular identification of a subsample of 890 mosquitoes, *An. funestus* (*s.s.*) (99.43 %) and *An. lesoni* (0.57 %) were the two members of the *An. funestus* group present in the locality.

Anopheles funestus (*s.s.*) (hereafter *An. funestus*) survival rate was high with 73.73 % ($n = 1,350$) of mosquitoes reaching the insectary alive (after a 350 km journey in cooling box) and used for egg production. Similarly, high oviposition (80.81 %) and egg hatch (85.43 %) rates were recorded, indicating that large majority of mosquitoes were already inseminated at the time they were collected.

Preliminary ELISA analysis revealed that *An. funestus* actively transmits malaria in Mebelong, with anthropophilic and infection rates of 100 % ($n = 100$) and 3.7 % ($n = 656$), respectively.

Parasitological survey

In total 1,091 children aged between five and 11 years were examined and the prevalence of detected asexual malaria was 40 % in the survey population. Among the infected children, the result of blood smears ranged from 1+ to 4+, with the majority of them failing in the 1+ (53.35 %) and 2+ (35.10 %) groups [34] (Table 1). According to this prevalence rate, our survey area could be classified as mesoendemic for malaria, although few children above ten years were included in the study [36, 37]. The prevalence of gametocyte carriers identified by blood smear in the total survey population examined was approximately 10 %.

Plasmodium falciparum infection in *An. funestus*

Fourteen infection experiments were carried out using blood from different gametocyte carriers. In total, 9,728

Table 1 Summary of parasitological surveys. Data in parentheses represent prevalences. Gametocyte carriers were detected among children aged between 5 and 11 after screening of their blood samples by direct microscopic visualisation of *Plasmodium* parasites on thick blood smears stained with 10 % Giemsa. *Plasmodium* trophozoite density was determined using semi quantitative count (thick film) method

School	Number examined	TPF+	TPF++	TPF+++	TPF++++	Total trophozoite carriers	Gametocyte carriers
Nkolyada	74	22	15	1	0	38 (51.35)	4 (5.41)
Elig-Onana	102	30	23	13	0	66 (64.71)	9 (8.82)
Okola G2	111	25	11	5	0	41 (36.94)	7 (6.31)
Zamengoé	210	58	22	11	1	92 (43.81)	24 (11.43)
Nkolngock	110	25	22	2	0	49 (44.54)	12 (10.91)
Ndangueng	105	18	9	5	3	35 (33.33)	8 (7.62)
Mvoua	140	28	27	4	1	60 (42.86)	23 (16.43)
Levalombédé	239	25	23	3	1	52 (21.76)	18 (7.53)
Total	1,091	231	152	44	6	433 (39.69)	101 (9.26)

TPF levels: +, 1–10 trophozoites/100 microscopic thick film fields; ++, 1–10 trophozoites/10 microscopic thick film fields; +++, 1–10 trophozoites/single microscopic thick film field; +++++, > 10 trophozoites/single microscopic thick film field
Abbreviation: TPF trophozoite of *P. falciparum*

An. funestus females were given access to infected blood through an artificial parafilm membrane and 2,518 successfully fed, corresponding to a global feeding rate of 26 % (Table 2). However, feeding rate significantly varied across experiments ranging from 18 to 47 %. Monitoring of the mortality to day 7 for nine batches of infected

mosquitoes revealed a mortality rate between 0 and 69.23 % (mean 38.05 %).

Plasmodium falciparum gametocytes were infective for mosquitoes in 11 (78.57 %) of 14 experiments with prevalence of infection ranging from 3.7 to 100 % (mean 25.70 %). A total of 1,165 oocysts were counted in all

Table 2 Summary of experimental infection parameters in *An. funestus*. Mosquitoes aged between 3 to 5 days were given infected blood through artificial parafilm membrane and midgut were dissected at day 7 post-infection for oocyst detection under light microscopy. Feeding rate was calculated by dividing the number of mosquitoes alive in cups after blood feeding by the number successfully fed. Prevalence of infection was calculated by dividing the number of mosquitoes infected at oocyst stage by the total number of mosquito dissected

Experiment	Gametocyte density	Feeding rate (%)	Dissected	Infected	Prevalence of infection (%)	Total oocyst count	Oocyst range (Min-Max)	Median oocyst load
N°1	–	24.52	32	11	34.37	45	1–15	2.5
N°2	–	19.10	36	22	61.11	162	1–18	7
N°3	–	28.89	21	0	0	0	–	–
N°4	–	25.25	32	2	6.25	4	1–3	1
N°5	–	23.78	39	6	15.38	9	1–4	1
N°6	–	46.53	24	3	12.50	4	1–2	1
N°7	–	26.03	84	0	0	0	–	–
N°8	–	33.80	30	0	0	0	–	–
N°9	96	31.38	59	42	71.19	241	1–16	8
N°10	32	19.19	43	14	32.56	20	1–2	1
N°11	368	18.81	52	17	32.69	40	1–6	2.5
N°12	880	18.37	9	9	100	539	1–139	60
N°13	80	31.92	105	37	35.24	96	1–8	4
N°14	16	27.61	81	3	3.7	5	1–2	1
All	–	25.89	647	166	25.66	1165	1–139	12.5

infected midguts and the global median oocyst number was 12.5 (mean 7.02) (Table 2). Taking each experiment individually, the number of oocysts observed in a midgut ranged from 0 to 139 and median oocyst number varied from 1 to 60 (range for means 1.43–59.88).

The gametocyte density was determined for 6 successful experiments and ranged from 16 to 880 gametocytes/ μ l of blood. There was a general trend showing that prevalence of infection and oocyst number in midguts increased with gametocyte density in blood samples (Fig. 1). However, the correlation was statistically significant only for oocyst number ($r_s = 0.849$, $P = 0.009$) and prevalence of infection ($r_s = 0.557$, $P = 0.088$).

Comparative analysis of the susceptibility of *An. funestus* and *An. coluzzii* to *P. falciparum* infection

The same infected blood was given to *An. funestus* and *An. coluzzii* mosquitoes simultaneously in 12 parallel experiments for comparison. The feeding rate was two to three-fold higher in *An. coluzzii* lab strain compared to the wild *An. funestus* (Additional file 1: Table S1). Among the 11 experiments in which more than five mosquitoes were dissected for both species, ten (90.91 %) resulted in

at least one infected mosquito in *An. funestus* compared to nine (81.82 %) in *An. coluzzii*.

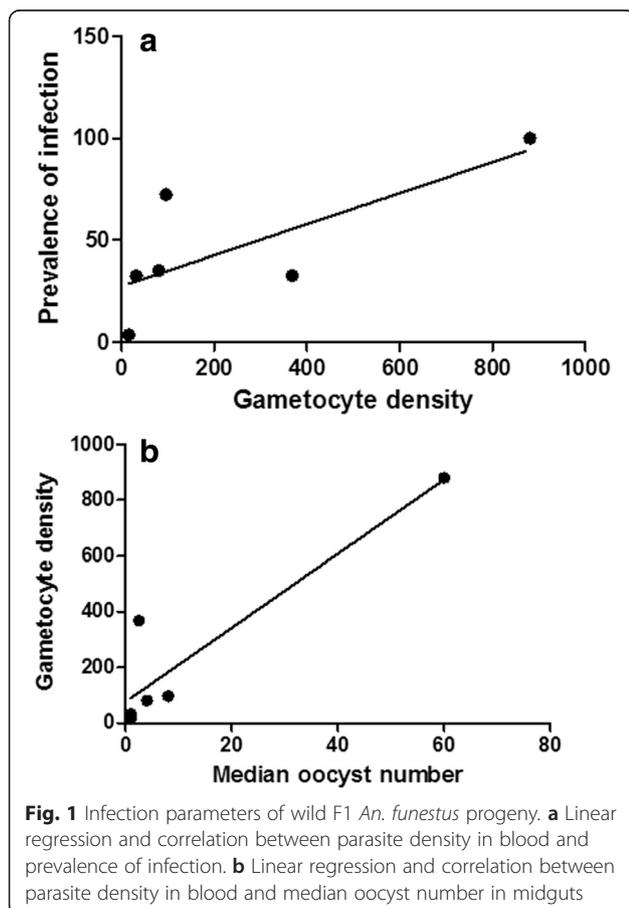
Overall, the two species showed high and comparable susceptibility to *P. falciparum* infection. Based on the nine experiments which were successful in both species, the prevalence of infection in *An. funestus* was 38.52 % (range 6.25–100 %) and the median oocyst number was 12.5 (mean 7.68; range 1–139). In parallel, the prevalence of infection in *An. coluzzii* was 39.92 % (range 6.85–97.5 %), while the median oocyst number was 32.1 (mean 20.33; range 1–351) (Fig. 2). These two parameters did not vary significantly between the two species across experiments, with 2 exceptions (Additional file 1: Table S1).

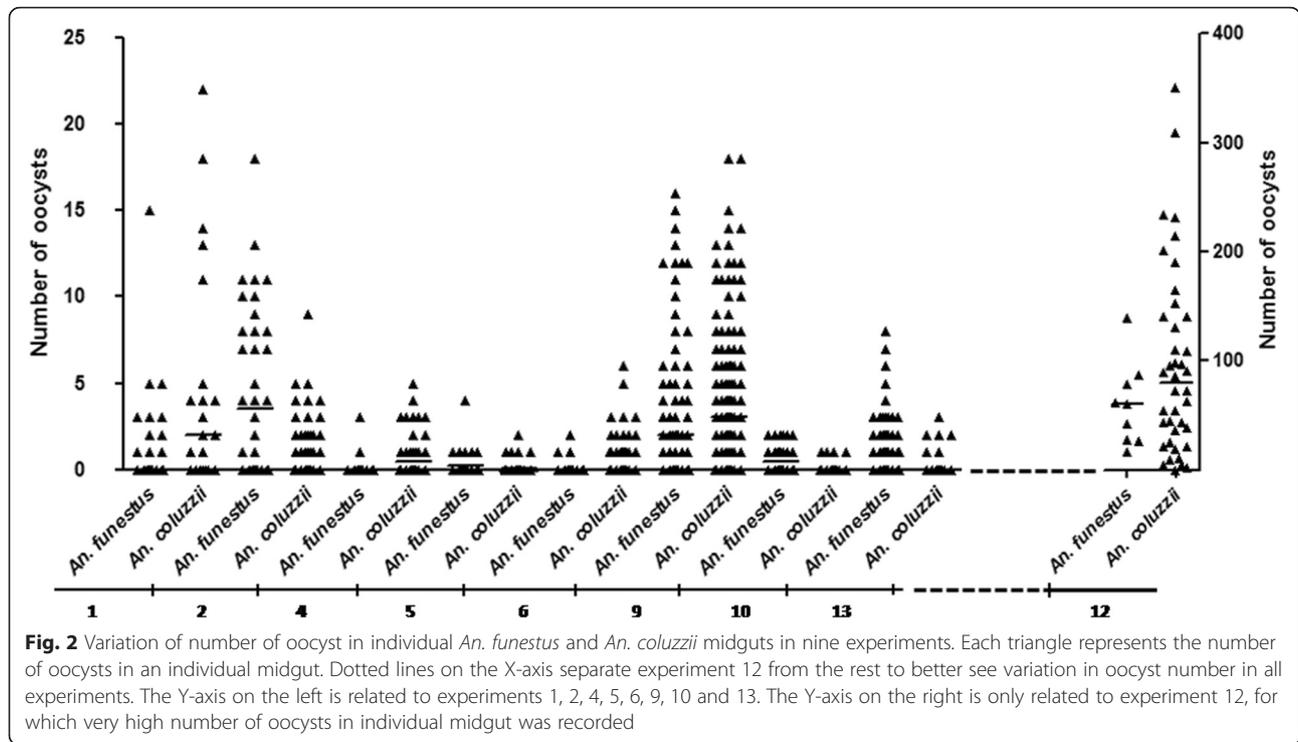
Discussion

The susceptibility of *An. funestus* to *Plasmodium* infection remains relatively uncharacterised in laboratory conditions. The only two studies carried out to date were limited to the use of the rodent parasite *P. berghei* [22, 23]. This model organism is more amenable than *P. falciparum* and has been instrumental in malaria research studies leading to important discoveries on mechanisms of parasite killing in *Anopheles* vectors [12–14, 24, 38]. However, parallel analyses of *An. gambiae* transcriptional immune responses to *P. berghei* and *P. falciparum* has revealed substantial differences [14] pointing out the necessity to carry out such studies on the human malarial transmission system. Here, we report the first experimental infections of F1 progeny of field caught *An. funestus* with its natural human parasite *P. falciparum*.

The study of mosquito susceptibility requires that the technique of infection be able to produce efficient and robust infections in mosquito vectors. In the current study, we tested the use of artificial glass-parafilm membrane system to feed *An. funestus* mosquitoes with infected blood from gametocyte carriers. This method is clearly preferable to direct feeding assays for ethical reasons, including avoiding the risk of infection of study participants with cryptic pathogens that may be transmitted when using wild-collected mosquitoes. Besides it also offers the possibility to replace the donor's serum with a non-immune AB one to avoid transmission reducing activity of serum components [39].

Nonetheless, the membrane feeding assays present two important weaknesses which could impact the outcome of infection experiments. First, an inappropriate blood handling procedure can result in decline or loss of gametocyte infectivity [40]. Secondly, the number of mosquitoes taking a blood meal could be reduced, especially when using newly collected field mosquito samples, which are not yet adapted to artificial feeding in laboratory conditions [41, 42]. This would explain





the differences in feeding rate observed in this study between the *An. coluzzii* Nguosso lab strain and the first generation wild *An. funestus*.

In this study, mosquitoes became infected in the majority (over 75 %) of experiments demonstrating that the parafilm/glass feeders system and the blood handling procedure used for *An. gambiae* (*s.l.*) are also suitable for *An. funestus* experimental infections. However, the feeding rate of F1 females from wild *An. funestus* mosquitoes varied significantly across experiments and did not exceed 50 % in all cases. This was lower than those previously reported in *An. funestus* Fumoz laboratory strain (over 50 %) and in *An. gambiae* (51.9 %) [22]. The difference could more likely be due to the use of mice feeding system in the study of Lo & Coetzee [22] which better mimics the natural feeding condition of *Anopheles* mosquitoes and/or to a better adaptation of the Fumoz lab strain to feed in lab conditions. By contrast, our results are comparable to those of a similar study conducted in Senegal [42] in which the authors also used the parafilm/glass feeder system to infect wild *An. arabiensis* F1 progeny and reported low feeding rate (32.7 %) further confirming that freshly field collected mosquitoes are not well adapted to feed on artificial membrane as stated above. Nonetheless, low feeding rate of wild *Anopheles* strains could be compensated by increasing the number of mosquitoes for infection experiments and this can now be easily achieved for *An.*

funestus, since collection and rearing of this mosquito species have been significantly improved [15].

The infection parameters (mean prevalence of infection 25.66; median oocyst number 12.5, mean oocyst load 7.02) recorded in this study were higher than that reported in a similar one using the *An. funestus* insecticide resistant (FUMOZ) and susceptible (FANG) lab strains and *P. berghei* parasite (mean prevalence of infection 20 %) [22]. Conversely, wild *An. funestus* genotypes from Mali (West Africa) exhibited significantly higher prevalence of infection (62–97 %) when infected with *P. berghei* [23]. The variations in prevalence of infection between the three studies could be explained by three main factors which have been shown to significantly predict the proportion of mosquitoes that become infected after taking an infectious blood meal: (i) the difference in gametocyte densities in blood used for experimental infections [43]; (ii) the difference in gametocyte sex ratio in blood [44]; and more likely (iii) the difference of infectivity of *Plasmodium* species used [45]. However, it is noteworthy that *An. funestus* is a vector of *P. falciparum* and do not naturally interact with *P. berghei*. Therefore, by using natural isolate of the human malaria parasite *P. falciparum*, the present study gives the more realistic picture of its vector competence.

Anopheles funestus displayed high and comparable levels of susceptibility to *P. falciparum* infection in comparison to *An. coluzzii* as measured by the percentage of

experiments showing infected mosquitoes, prevalence of infection and oocyst number in midguts. Our observations reinforce the view that both species are readily infected with *P. falciparum*, the most common and dangerous malaria parasite in sub-Saharan Africa, which may have had a greater ability to develop defense strategies against the mosquito immune system due to their long period of co-evolution [40].

Although our primary objective was not to investigate the kinetics of *P. falciparum* development in *An. funestus*, the fact that oocysts were observed in midguts after dissection of mosquitoes at day 7 gives preliminary indication that the parasite develops at similar rates to those in *An. gambiae* [46]. Further investigations with dissection of mosquitoes at later time points at which sporozoites should be observed in salivary glands are needed.

Conclusion

This study reported high levels of susceptibility of wild *An. funestus* progeny to *P. falciparum* and since this mosquito is widespread throughout Africa, malaria vector control research and implementation need to seriously address this vector species too. Our results also demonstrate the applicability of the parafilm/glass feeding assays for *An. funestus* experimental infections with its natural parasite *P. falciparum*. This open new avenues toward further investigations of *An. funestus-Plasmodium* interactions in natural system, taking advantage of genomic tools now available.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Infection parameters in *An. funestus* and *An. coluzzii* in nine parallel experiments. For each experiment, median oocyst number followed by the same letter are not significantly different; gametocyte densities correspond to the number of gametocytes per microliter of blood. (DOCX 16 kb)

Abbreviations

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IRS, indoor residual house spraying; LLINs, long-lasting insecticide-treated nets; OCEAC, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale

Acknowledgements

We are grateful to the volunteers from Okola and the district hospital of Okola for their participation in this study.

Funding

This work was supported by a Wellcome Trust Training Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (102543/Z/13/Z) to CN. The Wellcome Trust had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Authors' contributions

Conceived the study: CN, CSW. Designed the study protocol CN, CSW and GL. Participated in field and laboratory analyses: CN, EK, BM, JCT. CN analysed data and drafted the manuscript with contribution from CSW, GL, PAA. All the authors read and approved the final version.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Cameroonian national ethical committee for research on human health (statement N° 2015/01/535/CE/NRERSH/SP). The gametocyte carriers used in this study were enrolled as volunteers. Their parents or legal guardians signed a written informed consent, after the procedures of the study were fully explained to them. All of the children found infected with malaria parasites received free antimalarial treatment.

Author details

¹Malaria Research Laboratory, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroon. ²Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK. ³Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, P.O. Box 2701, Douala, Cameroon. ⁴Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, P.O. Box 337, Yaoundé, Cameroon. ⁵Research Unit Liverpool School of Tropical Medicine, OCEAC, P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroon.

Received: 16 March 2016 Accepted: 7 June 2016

Published online: 14 June 2016

References

1. WHO. World malaria report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. Fontenille D, Lochouart L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, et al. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:247–53.
3. Fontenille D, Simard F. Unraveling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27:357–75.
4. Cohuet A, Simard F, Wondji CS, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene P, Fontenille D. High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of savannah-forest transition area in Cameroon. *J Med Entomol.* 2004;41:901–5.
5. Lwetoijera DW, Harris C, Kiware SS, Dongus S, Devine GJ, McCall PJ, Majambere S. Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malar J.* 2014;13:331.
6. malERA Consultative Group on Vaccines. A research agenda for malaria eradication: vector control. *PLoS Med.* 2011;8:e1000401.
7. Giardina F, Kasasa S, Sié A, Utzinger J, Tanner M, Vounatsou P. Effects of vector-control interventions on changes in risk of malaria parasitaemia in sub-Saharan Africa: a spatial and temporal analysis. *Lancet glob health.* 2014;2:e601–15.
8. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature.* 2015;526:207–11.
9. Cohuet A, Osta MA, Morlais I, Awono-Ambene PH, Michel K, Simard F, et al. *Anopheles* and *Plasmodium*: from laboratory models to natural systems in the field. *EMBO Rep.* 2006;7:1285–9.
10. Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, James AA. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:6736–43. doi:10.1073/pnas.1521077112.
11. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol.* 2016;34(1):78–83.
12. Blandin SA, Wang-Sattler R, Lamacchia M, Gagneur J, Lycett G, Ning Y, et al. Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science.* 2009;326:147–50.
13. Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science.* 2004;303:2030–32.
14. Dong YM, Aguilar R, Xi ZY, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog.* 2006;2:513–25.
15. Morgan JC, Irving H, Okedi LM, Steven A, Wondji CS. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One.* 2010;5:e11872.

16. Hunt RH, Brooke BD, Pillay C, Koekemoer LL, Coetzee M. Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. *Med Vet Entomol*. 2005;9:271–5.
17. Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, Hunt RH, et al. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res*. 2009;19:452–9.
18. Cuamba N, Morgan JC, Irving H, Steven A, Wondji CS. High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the Chokwe District in Mozambique. *PLoS One*. 2010;5(6):e11010.
19. Djuouka R, Irving H, Tukur Z, Wondji CS. Exploring mechanisms of multiple insecticide resistance in a population of the malaria vector *Anopheles funestus* in Benin. *PLoS One*. 2011;6:e27760.
20. Mulamba C, Irving H, Riveron JM, Mukwaya LG, Birungi J, Wondji CS. Contrasting *Plasmodium* infection rates and insecticide susceptibility profiles between the sympatric sibling species *Anopheles parensis* and *Anopheles funestus* s.s.: a potential challenge for malaria vector control in Uganda. *Parasit Vectors*. 2014;7:71.
21. Riveron JM, Ibrahim SS, Chanda E, Mzilahowa T, Cuamba N, Irving H, et al. The highly polymorphic CYP6M7 cytochrome P450 gene partners with the directionally selected CYP6P9a and CYP6P9b genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *BMC Genom*. 2014;15:817.
22. Lo TM, Coetzee M. Marked biological differences between insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles funestus* infected with the murine parasite *Plasmodium berghei*. *Parasit Vectors*. 2013;6:184.
23. Xu J, Hillyer JF, Coulibaly B, Sacko M, Dao A, Niare O, et al. Wild *Anopheles funestus* mosquito genotypes are permissive for infection with the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *PLoS One*. 2013;8(4):e61181.
24. Aguilar R, Dong Y, Warr E, Dimopoulos G. *Anopheles* infection responses: laboratory models versus field malaria transmission systems. *Acta Trop*. 2005;95:285–91.
25. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *Publ Sth Afr Inst Med Res*. 1968;54:1–343.
26. Gillies M, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publ Sth Afr Inst Med Res*. 1987;55:1–143.
27. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:804–11.
28. Cohuet A, Simard F, Toto JC, Kengne P, Coetzee M, Fontenille D. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69:200–5.
29. Beier JC, Perkins P, Koros J, Onyango FK, Gargan TP, Wirtz R, et al. Malaria sporozoite detection by dissection and ELISA to assess infectivity to Afrotropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1990;27:377–84.
30. Burkot TR, Williams JL, Schneider I. Identification of *Plasmodium falciparum* infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*. 1984;33:783–8.
31. Beier J, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP, Koeh DK. Blood-meal identification by direct-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol*. 1988;25:9–16.
32. Boissiere A, Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Bayibeki A, Awono-Ambene PH, et al. Application of a qPCR assay in the investigation of susceptibility to malaria infection of the M and S molecular forms of *A. gambiae* s.s. in Cameroon. *PLoS One*. 2013;8:e54820.
33. Ehiolé SP, Bissagnéné E, Girard PM. Mémento thérapeutique du paludisme en Afrique. *IMEA-Doin*. 2008. p. 99.
34. Bousema JT, Drakeley CJ, Mens PF, Arens T, Houben R, Omar SA, et al. Increased *Plasmodium falciparum* gametocyte production in mixed infections with *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:442–8.
35. Nsango SE, Abate L, Thoma M, Pompon J, Fraiture M, Rademacher A, et al. Genetic clonality of *Plasmodium falciparum* affects the outcome of infection in *Anopheles gambiae*. *Int J Parasitol*. 2012;42(6):589–95.
36. Metselaar D, Van Thiel PH. Classification of malaria. *Trop Geogr Med*. 1959; 11:157–61.
37. Hay SI, Snow RW. The Malaria Atlas Project: developing global maps of malaria risk. *PLoS Med*. 2006;3:e473.
38. Riehle MM, Xu J, Lazzaro BP, Rottschaefer SM, Coulibaly B, Sacko M, et al. *Anopheles gambiae* APL1 is a family of variable LRR proteins required for Rel1-mediated protection from the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLoS One*. 2008;3:e3672.
39. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, Van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One*. 2012;7(8):e42821.
40. Hume JC, Tunnicliff M, Ranford-Cartwright LC, Day KP. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2007;6:139.
41. Graves PM. Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74:738–42.
42. Awono-Ambene HP, Diawara L, Robert V. Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64:32–4.
43. Da DF, Churcher TS, Yerbanga RS, Yaméogo B, Sangaré I, Ouedraogo JB, et al. Experimental study of the relationship between *Plasmodium* gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Exp Parasitol*. 2015;149:74–83.
44. Robert V, Read AF, Essong J, Tchuinkam T, Mulder B, Verhave JP, Carnevale P. Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(6):621–4.
45. Collins WE, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Sullivan JJ, Galland GG, et al. Experimental infection of *Anopheles farauti* with different species of *Plasmodium*. *J Parasitol*. 2002;88(2):295–8.
46. Ndiath MO, Cohuet A, Gaye A, Konate L, Mazenot C, Faye O, et al. Comparative susceptibility to *Plasmodium falciparum* of the molecular forms M and S of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Malar J*. 2011;10:269.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ARTICLE 3

Elevated *Plasmodium* infection rates and high pyrethroid resistance in major malaria vectors in a forested area of Cameroon highlight challenges of malaria control

RESEARCH

Open Access



Elevated *Plasmodium* infection rates and high pyrethroid resistance in major malaria vectors in a forested area of Cameroon highlight challenges of malaria control

Cyrille Ndo^{1,2,3*}, Edmond Kopya^{1,4}, Marie Agathe Donbou^{1,5}, Flobert Njiokou⁴, Parfait Awono-Ambene¹ and Charles Wondji²

Abstract

Background: High coverage of long-lasting insecticidal nets (LLINs) is the cornerstone of the malaria control strategy of the national malaria control program (NMCP) in Cameroon, with a target of reducing malaria transmission to less than 10% by 2035. To this end, more than 20 million LLINs have been distributed to populations countrywide since 2011. The present study evaluated entomological indices and *Anopheles* susceptibility to pyrethroids in a rural forested area of south Cameroon with high coverage of LLINs.

Methods: The study was conducted between July 2014 and May 2016 in Obout, a village located in a rural forested area in south Cameroon. Resting mosquitoes were collected using electric aspirators and were identified to species using morphological criteria and PCR tools. Mosquito feeding preferences and infection status to *Plasmodium falciparum* were determined by ELISA and using TaqMan assays. The susceptibility of wild F1 adults to pyrethroids was monitored using WHO insecticide susceptibility bioassays.

Results: During the study period, 5,993 *Anopheles* mosquitoes were collected indoors both in rooms with and without nets. Two main vector species, namely *An. funestus* and *An. gambiae*, were identified in the locality, with *An. funestus* being by far the most abundant (89.68%). ELISA analysis revealed high percentage of blood meal taken exclusively on human (97.65–98.95%) supporting the high anthropophilic behaviour of both species. *Plasmodium falciparum* infection rate detected by ELISA was high throughout the study period and varied between 3.28–14.04% (mean: 10.40%) in *An. funestus*, and between 5.55–22.22% (mean: 13.87%) in *An. gambiae*. This trend was confirmed by TaqMan assays, with *P. falciparum* infection prevalence of 23.33% in *An. funestus*. Significant decrease of mortality associated with high frequency of *kdr* mutation was observed in *An. gambiae* (deltamethrin: 36.6–56.45%; permethrin: 6–18.65%) indicating high level of resistance to pyrethroids. For *An. funestus*, resistance was marked for deltamethrin (mortality: 70.54–76.24%) than for permethrin (94.12–94.74%).

Conclusions: Our study showed that despite LLINs, the population of Obout remains exposed to bites of highly infected *An. funestus* and *An. gambiae* mosquitoes, highlighting the challenges to controlling malaria in forested areas, especially in the presence of insecticide resistance.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Pyrethroids, LLINs, *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae*, ELISA

* Correspondence: cyrndo@yahoo.fr

¹Malaria Research Laboratory, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroon

²Vector group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK

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



Background

The World Health Organization set the ambitious new target of reducing the global malaria burden by 90% by 2030 [1]. Vector control is the cornerstone of that strategy through the mass distribution of free long-lasting insecticidal nets (LLINs) [2, 3]. In Cameroon, the first national campaign of massive distribution of free LLINs was conducted in 2011 and increased the proportion of households possessing at least one LLIN from 33% to 66%. However, the universal coverage, defined as one LLIN to two people at risk of malaria [4], was achieved only at 32%. Therefore, a second campaign was launched in 2015 with the aim to reach the 80% universal coverage targeted by the national malaria control program (NMCP) in the strategic plan 2011–2015 [5].

The universal coverage of LLINs has proved to be efficient in controlling malaria transmission in several sub-Saharan settings [3, 6]. However, unexpected changes have been observed in *Anopheles* vector populations in some places following mass distribution campaigns of LLINs. For example, in *An. funestus* changes in biting behaviour were observed following massive introduction of LLINs in Benin and Senegal. This vector adopted early diurnal feeding and exophagic behaviour with the proportion of mosquitoes biting outdoor increasing to 26% [7, 8]. Moreover, a change in species composition in the *An. gambiae* complex after the implementation of LLINs was noticed in Dielmo (Senegal) [9]. In *An. gambiae* populations from the same area, Trape et al. [10] reported an increase in pyrethroid resistance characterized by rise of the frequency of Leu1014Phe *kdr* resistance mutation from 8% in 2007 to 48% in 2010, after introduction of LLINs. Such changes could negatively impact malaria control operations by allowing mosquitoes to avoid contact or become resistant to insecticides.

As part of malaria control monitoring operations, it is necessary to regularly assess entomologic indices as well as level and mechanisms of insecticide resistance in vector populations in order to evaluate the effectiveness of control strategies implemented. Among the common indices recorded in vector populations are the species composition and abundance, entomological inoculation rate, blood-feeding preferences (anthropophily/zoophily), biting (exophagy/endophagy) or resting (endophily/exophily) behaviour and *Plasmodium* infection rate [11, 12]. The present study aims to determine *Anopheles* species composition and abundance, anthropophily, *Plasmodium* infection rate and susceptibility profile to pyrethroids in a rural forested area of South Cameroon 3–5 years after mass distribution of LLINs.

Methods

Study site and period

The study started in July 2014, 3 years after the first national campaign of distribution of free LLINs, and ended

in May 2016, two months after the end of the second campaign. It was conducted in Obout (3°7'N, 11°65'N), a village located in a rural forested area close to the city of Mfou, situated about 25 km from Yaoundé, the capital city of Cameroon. The vegetation around the village is constituted by an equatorial forest which is degraded by farming activities. The climate is of equatorial guinean type, characterized by two rainy seasons (August–October and April–June) and two dry seasons (November–April and June–July). The annual average rainfall is 2000 mm while average annual temperatures range between 19–29 °C, and the average humidity varies between 66–80% [13].

Obout is populated by about 200 inhabitants, most of whom are farmers. They live in houses made of mud or cement with tin rooves, presenting many interstices between the roof and the walls through which mosquitoes can enter or leave the houses. The village is also characterized by the presence of several fish ponds bordered with vegetation which could favour the development of immatures of *Anopheles* mosquito species, particularly those of *An. funestus* group. The area is known to be hyperendemic for malaria [13, 14] and the main prevention method is LLINs, with coverage of around 70% in the population.

Mosquito collection and morphological identification

Resting mosquitoes were collected in human dwellings in the morning using electric aspirators (Rule In-Line Blowers, Model 240) and were brought back to the insectary. After species identification using morphological keys [15, 16], non-fed and some of the freshly blood engorged females were directly preserved in tubes containing desiccant for ELISA analysis to detect the presence of circumsporozoite protein (CSP) of *P. falciparum* in the head and thorax [17, 18], and to identify blood meal source [19]. The other blood-fed female mosquitoes were kept in paper cups for four days until eggs became mature. Gravid mosquitoes were allowed to oviposit according to the forced egg-laying [20], and eggs were reared to adult F1 used for insecticide bioassays, as described previously [21]. All the females were later killed and stored in tubes containing desiccant for future analysis.

Laboratory processing of mosquitoes

Dead mosquitoes stored in Eppendorf tubes containing desiccant were divided in several parts. Wings or legs were used for genomic DNA extraction as described previously [22] and morphological identification was confirmed using PCR based assays [23, 24]. The head and thorax were used for ELISA to detect *P. falciparum* CSP [17, 18] while abdomen containing blood was used for ELISA to identify the source of blood meal [25]. Diluted *P. falciparum* sporozoite proteins supplied by the Center

for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) were used as positive controls, while ground male mosquitoes were used as negative controls. For both ELISA analyses, optical densities (OD) were read at 405 nm on an ELISA plate reader (Biotek ELx800, Swindon, UK). Positive samples were determined by OD readings 2-fold greater than the negative controls [17] and were tested a second time for validation.

Pattern of malaria transmission detected by ELISA was validated using TaqMan assay [26]. PCRs were done using the mosquito's whole body DNA extracts and the presence of *P. falciparum* (F+) and/or *P. ovale*, *P. vivax* and *P. malariae* (OVM+) was detected in 30 field-collected *An. funestus* females. These females were randomly chosen and were different from those used for ELISA.

Susceptibility assays to insecticides

The susceptibility of wild F1 *An. funestus* and *An. gambiae* populations to discriminating concentrations of deltamethrin and permethrin was monitored using WHO insecticide susceptibility test-kits and standard procedures [27]. Impregnated papers were obtained from a WHO reference center (Vector Control Research Unit, University Sains Malaysia, Penang, Malaysia) and their quality was first checked on the susceptible Kisumu strain of *An. gambiae*. All tests were done at a temperature of 25–27 °C and 80 ± 10% relative humidity. For each test, four batches of 20–25 unfed F1 females, 2–5 day-old, were exposed to papers impregnated with an insecticide for 1 h. Meanwhile, one batch of 20–25 mosquitoes exposed to untreated paper was used as a control. Percentage of knockdown (KD) mosquitoes was recorded at 60 min, after which mosquitoes were held for 24 h at 27 ± 2 °C and 80 ± 10% relative humidity. The kdt₅₀ and kdt₉₅ which correspond to the time required for knocking 50% and 95% of mosquitoes tested, were estimated using a log-time probit mode [28]. Mortalities were recorded 24 h after exposure and were compared between the two years for each species and insecticide using Fisher's exact test run in Graph Pad prims V.5. P-values of < 0.05 were considered as

significant. Resistance/susceptible status was evaluated based on WHO criteria [27]. According to these criteria, mortality rates less than 90% were indicative of resistance while those greater than 98% were indicative of susceptibility. Mortality rates between 90–98% suggested the possibility of resistance that needs to be confirmed. Finally, 50 F0 wild *An. gambiae* mosquitoes were used for the detection of the L1014F and L1014S mutations by Taqman-kdr assay [29].

Results

Mosquito species composition

A total of 5993 resting *Anopheles* mosquitoes were collected during the study period (Table 1). Repartition of mosquitoes according to the presence/absence or the quality of bednet showed that 71.12% were caught in rooms without mosquito net, 26.37% in rooms with old or perforated nets, while very few (2.51%) were collected in rooms with new nets (no more than one year old). Two species groups/complexes, namely *An. gambiae* (s.l.) and *An. funestus* (s.l.), were identified according to morphological criteria, but the later was by far the most abundant representing 89.68% of the total mosquitoes caught. Molecular identification showed that *An. funestus* (s.s.) (hereafter *An. funestus*) and *An. lesoni* where the two species of the *funestus* group present in Obout, with *An. funestus* (s.s.) (98.16%, n = 213) being the most abundant. In the same manner, *An. gambiae* (93.96%, n = 109) was much more abundant compared to *An. coluzzii* (3.45%, n = 4); only three hybrids (2.59%) between both species were identified.

Blood meal source and Plasmodium circumsporozoite protein rate

Overall, 95.56% of mosquitoes were blood-fed, semi gravid or gravid at the time they were collected indicating that people living in surveyed houses were highly exposed to mosquito bites. ELISA analysis confirmed that *An. funestus* and *An. gambiae* were highly anthropophilic, with

Table 1 Number of *An. funestus* and *An. gambiae* mosquitoes collected in Obout (Cameroon), number tested by ELISA and corresponding circumsporozoite protein rates

		2014			2015	2016			
		July	Oct.	All	Feb.	Feb.	Mar.	May	All
<i>An. funestus</i>	Collected	152	95	247	211	522	349	281	1152
	Tested	152	95	247	211	522	349	281	1152
	Positive	5	5	10	19	71	49	19	139
	ICSP (%)	3.29	5.26	4.04	9	13.6	14.04	6.76	12.07
<i>An. gambiae</i>	Collected	36	9	45	174	160	85	84	329
	Tested	36	9	45	174	160	85	84	329
	Positive	2	2	4	17	28	13	14	55
	ICSP (%)	5.56	22.22	8.89	9.77	17.5	15.29	16.67	16.72

97.65% ($n = 83/85$) and 98.95% ($n = 94/95$) blood meal exclusively taken on human, respectively, while less than 3% of tested samples consisted of mixed blood meals taken simultaneously on human and sheep.

Of the 2,170 head and thorax analyzed by ELISA, 245 were positive, corresponding to a high global circumsporozoite rate of 11.29%. During the study period, this rate varied between 3.28–14.04% (mean: 10.4%) in *An. funestus*, and between 5.55–22.22% (mean: 13.87%) in *An. gambiae* (Table 1). For both species, the lowest infection rates were obtained in 2014, while the highest were obtained in 2016 in mosquitoes collected after the second campaign of distribution of free LLINs.

Using TaqMan assays, 8 mosquitoes of 30 tested were found to be infected by *Plasmodium*. Among these, 7 were infected with only *P. falciparum* [F+; 23.33% (7/30)] and 1 was infected with *P. ovale*, *P. vivax* and/or *P. malariae* [OVM+; 3.33% (1/30)].

Insecticide susceptibility

A total of 1,336 *An. funestus*, 822 *An. gambiae* and 546 females from the *An. gambiae* Kisumu strain were used in WHO susceptibility tests using two pyrethroids (permethrin and deltamethrin) (Table 2).

The *An. gambiae* Kisumu strain displayed fully susceptible phenotype for all insecticides tested with KDT_{50} less than 30 min and 100% mortality, indicating that the impregnated papers were of good quality. By contrast, high level of resistance to permethrin and deltamethrin, characterized by significant decrease of mortality coupled with increase in knockdown time, was observed in *An. gambiae*. This resistance significantly increased one year to another [(Fisher's exact test for permethrin: $P < 0.0001$; OR: 9.141; CI: 4.68–17.86); Fisher's exact test for

deltamethrin: $P < 0.0001$; OR: 5.124; CI: 3.82–8.00] with mortality of 6% and 18.65% to permethrin and deltamethrin, respectively, in 2016 compared to 36.6% and 56.45%, respectively, in 2015. (Table 2, Fig. 1). Using TaqMan-kdr assay, both L1014F and L1014S *kdr* mutations were identified in *An. gambiae* population from Obout. However, the frequency of the L1014F (98.72%) mutation was very high compared to that of the L1014S (7.95%) mutation.

In *An. funestus*, the level of resistance to deltamethrin was moderate, but also increased one year to another, with mortality rates of 76.24% and 70.54% in 2015 and 2016, respectively, but the difference was not significant [(Fisher's exact test: $P = 0.283$; OR: 1.342; CI: 0.82–2.19)]. For permethrin, low mortality rates (94.12–94.74%), suggesting probable resistance were recorded throughout the study period. Contrary to *An. gambiae*, the resistance to pyrethroid in *An. funestus* was not associated with elevation of KDT_{50} , suggesting that *kdr* is probably not involved in the resistance to pyrethroids in this species (Table 2, Fig. 1).

Discussion

The present study highlights important malaria transmission due to *An. funestus* and *An. gambiae* in a rural forested area of South Cameroon. Both species were present in the village throughout the year and were highly infected by *P. falciparum*, with infection rates reaching 22%. However, the densities of *An. funestus* populations were significantly higher over the study period, making this species the major malaria vector in this locality, where it probably breeds in artificial fish ponds situated around the village.

Anopheles infection status was mainly determined by detecting the presence of *P. falciparum* circumsporozoite

Table 2 Mortality and knockdown time of *An. funestus* and *An. gambiae* from Obout (Cameroon) after 1 h exposure to pyrethroids

Year	Species/strain	Insecticide	<i>n</i>	kdt_{50} (min) (IC ₉₅)	kdt_{95} (min) (IC ₉₅)	Mortality (%)	Status
2015	Kisumu	Perm. 0.75%	120	21.2 (16.1–25)	40 (33.88–55.5)	100	S
		Delta. 0.05%	100	18.1 (17.6–18.9)	24.9 (23.4–27.4)	100	S
	<i>An. funestus</i>	Perm. 0.75%	152	17.2 (16.8–17.7)	22.4 (21.4–23.8)	94.74 ^a	PR
		Delta. 0.05%	101	26.6 (18.2–39.9)	55.2 (37.7–214.7)	76.24 ^b	R
	<i>An. gambiae</i>	Perm. 0.75%	153	> 60	>> 60	36.6 ^c	R
		Delta. 0.05%	124	38.3 (35–41)	>> 60	56.45 ^e	R
2016	Kisumu	Perm. 0.75%	167	21.12 (16.1–24.6)	40.3 (33.88–55.5)	100	S
		Delta. 0.05%	159	18 (17.6–18.9)	24.9 (23.4–27.4)	100	S
	<i>An. funestus</i>	Perm. 0.75%	510	29.41 (22.52–38.4)	41.61 (32.15–52.86)	94.12 ^a	PR
		Delta. 0.05%	573	39.62 (20.6–54.19)	55.19 (44.89–90.19)	70.54 ^b	R
	<i>An. gambiae</i>	Perm. 0.75%	202	> 60	>> 60	6.00 ^d	R
		Delta. 0.05%	343	> 60	>> 60	18.65 ^f	R

^{a-f} For *An. funestus* and *An. gambiae* mortality rates for the same insecticide followed by different letters were significantly different between the two years (Fisher's exact test). All significant differences were at $P < 0.0001$.

Abbreviations: kdt, Knockdown time; R, resistant; S, susceptible; PR, probably resistant; Perm., permethrin; Delta., deltamethrin.

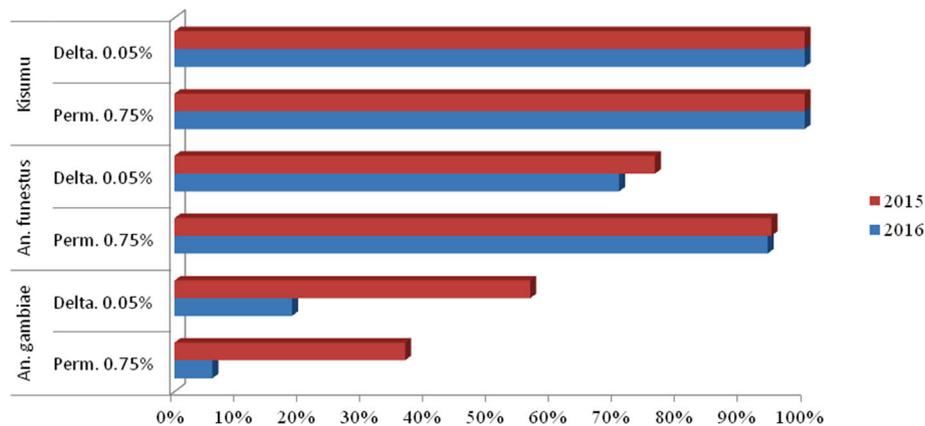


Fig. 1 Trends of mortality to permethrin and deltamethrin in *An. funestus* and *An. gambiae* mosquitoes from Obout (Cameroon) in 2015 and 2016

protein in the head and thorax of mosquitoes by ELISA. Although this technique could overestimate *Plasmodium* sporozoite prevalence by a factor of 1.1–1.9 in mosquitoes [30], the fact that TaqMan assays also detected high *P. falciparum* infection prevalence in *An. funestus* (2-fold than ELISA) reinforces the view that level of malaria transmission in the surveyed locality remains high, despite high coverage of LLINs.

LLIN represents the tool of choice for malaria control. It has significantly contributed to substantial reduction of malaria transmission in sub-Saharan African countries since its vulgarisation in 2000 [3, 6]. LLIN plays a double role by protecting humans from mosquito bites and by killing mosquitoes which come in contact with the net. In this study, new mosquito nets received during the 2015–2016 national campaign of distribution of free LLINs were effective at preventing mosquito bites, since very few and non-fed mosquitoes were collected in rooms with new nets. In contrast, the fact that a non-negligible proportion (26.37%) of blood-fed mosquitoes were collected in rooms with old LLINs received during the first national campaign of distribution of free LLINs in 2011 indicated that they could have lost their efficacy, probably due to several inappropriate washing or net deterioration. This highlights the need to replace LLINs that are torn or show waning efficacy to sustain high level coverage, in order to effectively reduce malaria transmission in sub-Saharan Africa [4, 30]. Regarding this, the WHO recommends that malaria endemic countries should supply LLINs through a combination of mass free distribution campaigns, normally at interval of no more than three years, and continuous distributions particularly during immunisation and antenatal services [31].

In addition, the high level of resistance to pyrethroids observed in malaria vectors in this study could have also contributed to the loss of net efficacy by allowing resistant mosquitoes to enter the nets or to bite through

holes. Although our results showed that the *kdr* L1014F mutation, and to lesser extend the L1014S mutation, were involved in the resistance observed in *An. gambiae*, it could not be biased to assume *kdr* allele alone conferred the ability to survive diagnostic doses of pyrethroids. Thus, metabolic mechanisms [32, 33] must also contribute to the high-level of pyrethroid resistance in this species. This would also be the case for *An. funestus*, which exhibited moderate and probable resistance to deltamethrine and permethrin, respectively, owing to the fact that *kdr* was never reported in this species. Similar to this study, difference in levels of insecticide resistance between sympatric populations of the two vector species was already reported elsewhere [34] and could be explained by difference in their biological characteristics. *Anopheles gambiae* breeds in temporary stagnant waters, which are more polluted by agricultural pesticides, but less for *An. funestus* for which larvae develop in large semi-permanent water. Another main difference among the species could come from the fact that *An. funestus* probably recently colonized the surveyed locality, as fish ponds were less than three years old, and thus has not yet receive enough insecticide pressure selection. Further investigations are necessary to fully elucidate key insecticide resistance mechanisms for *An. gambiae* and *An. funestus* in our study area. Nevertheless, such a high level of resistance to the two pyrethroids used for net impregnation for major malaria vectors is a concern for the continued effectiveness of this key malaria control tool, and this call for an urgent development of new insecticide compounds with different mode of action [35].

Beside issues of insecticide resistance, partial coverage LLINs could also seriously limit the efficacy of malaria control operations in highly endemic settings such as forested areas of Cameroon. In fact, non-covered areas or houses without nets could represent hot spots of malaria transmission while people living in these places

could serve as reservoir of *Plasmodium* parasites [36]. This hypothesis could also explain why a drop in malaria transmission (*Anopheles* infection) was not observed in the present study, even after the second campaign of distribution of LLINs. Our analysis therefore points out the necessity to increase LLINs coverage across Cameroon, and other control measures should be combined to LLINs in order to achieve the goal of reducing malaria cases to less than 10% by 2030. These include indoor residual spraying (IRS), symptomatic diagnosis and treatment of malaria cases using artemisinin-based combination therapy (ACT) especially for children under 5 years, and prevention and control of malaria during pregnancy by administration of intermittent preventive treatment (IPTp) using Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP). Moreover, since fish ponds represented major larval breeding sites in our studied area, perhaps combining larval control with LLINs should be considered.

Conclusions

The results of this study showed that the population of Obout sleeping in rooms without net or rooms with only old nets were highly exposed to bites of highly infected and pyrethroid resistant *An. funestus* and *An. gambiae* mosquitoes. In the context where malaria elimination is back again on the agenda of WHO and various stakeholders, the present study highlights the importance of achieving universal coverage of LLINs, the need to replace used LLINs two to three years after their distribution, and the necessity to implement additional malaria control measures in our study site. Meanwhile, more attention must be paid on the evolution of insecticide resistance in *Anopheles* vector species, which could seriously impede malaria control operations based on the use of insecticide or insecticide-treated tools including LLINs. Further studies are also necessary in order to investigate all factors which could explain such high level of malaria transmission despite large coverage of LLINs, by assessing human behaviour and use of LLINs, resting and biting behaviour of malaria vectors in the locality as well as mechanisms involved in insecticide resistance.

Abbreviations

CSP: circumsporozoite protein; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; ELISA: enzyme-linked-immunosorbent assay; IPTp: intermittent preventive treatment; IRS: indoor residual spraying; KD: knockdown; KDT: knockdown time; LLINs: long-lasting insecticidal nets; OD: optical density; PR: probably resistant; R: resistant; S: susceptible; SP: sulfadoxine-pyrimethamine; WHO: World Health Organization

Acknowledgements

We are grateful to all the populations of Obout who allowed us to enter their houses for mosquito collection.

Funding

This work was supported by a Wellcome Trust Training Fellowship in Public Health and Tropical Medicine (102543/Z/13/Z) to CN. The Wellcome Trust

had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during the current study are included in this published article.

Authors' contributions

Conceived the study and designed the study protocol: CN, CSW. Participated in field and laboratory analyses: CN, EK and MAD. CN analysed data and drafted the manuscript with contribution from CSW, PAA and FN. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study received the approval of the Cameroonian National Ethical Committee for Research on Human Health (statement No. 2015/01/535/CE/NRERSH/SP). Non-written consent of household heads was sought prior to enter the house for mosquito collection.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Malaria Research Laboratory, Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), P.O. Box 288, Yaoundé, Cameroon. ²Vector group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK. ³Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, P.O. Box 24157, Douala, Cameroon. ⁴Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, P.O. Box 337, Yaoundé, Cameroon. ⁵School of Health Sciences, Catholic University of Central Africa, P.O. Box 11628, Yaoundé, Cameroon.

Received: 5 December 2017 Accepted: 28 February 2018

Published online: 08 March 2018

References

- World Health Organization. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030. Geneva: World Health Organization; 2015.
- Karunamoorthi K. Vector control: a cornerstone in the malaria elimination campaign. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1608–16.
- World Health Organization. World Malaria Report 2017. WHO Global Malaria Programme. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>. Accessed 5 Jan 2018.
- Zhou G, Li JS, Ototo EN, Atieli HE, Githeko AK, Yan G. Evaluation of universal coverage of insecticide-treated nets in western Kenya: field surveys. *Malar J.* 2014;13:351.
- Ministry of Health of Cameroon. <http://www.minsante.cm>. Accessed 28 Apr 2017.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature.* 2015;526:207–11.
- Moiroux N, Gomez MB, Pennetier C, Elanga E, Djenontin A, Chandre F, et al. Changes in *Anopheles funestus* biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in Benin. *J Infect Dis.* 2012;206:1622–9.
- Sougoufara S, Diedhiou SM, Doucoure S, Diagne N, Sembene PM, Harry M, et al. Biting by *Anopheles funestus* in broad daylight after use of long-lasting insecticidal nets: a new challenge to malaria elimination. *Malar J.* 2014;13:125.
- Sougoufara S, Harry M, Doucoure S, Sembene PM, Sokhna C. Shift in species composition in the *Anopheles gambiae* complex after implementation of long-lasting insecticidal nets in Dielmo, Senegal. *Med Vet Entomol.* 2016;30:365–8.
- Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, Faye J, et al. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets

- and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:925–32.
11. Gimnig JE, Vulule JM, Lo TQ, Kamau L, Kolczak MS, Phillips-Howard PA, et al. Impact of permethrin-treated bed nets on entomologic indices in an area of intense year-round malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:16–22.
 12. Mutuku FM, King CH, Mungai P, Mbogo C, Mwangangi J, Muchiri EM, et al. Impact of insecticide-treated bed nets on malaria transmission indices on the south coast of Kenya. *Malar J.* 2011;10:356.
 13. Zeukeng F, Tchinda VH, Bigoga JD, Seumen CH, Ndzi ES, Abonweh G, et al. Co-infections of malaria and geohelminthiasis in two rural communities of Nkassomo and Vian in the Mfou health district, Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3236.
 14. Tchinda VHM, Ponka R, Ndzi ES, Madocgne AK, Amédée M, Tchinda MG, et al. Prevalence of malaria and soil-transmitted helminth infections and their association with undernutrition in schoolchildren residing in Mfou health district in Cameroon. *J Public Health Epidemiol.* 2012;4:253–60.
 15. Gillies MT, De Meillon B. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *Publ Sth Afr Inst Med Res.* 1968;54:1–343.
 16. Gillies M, Coetzee M. A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Pub South Afr Inst Med Res.* 1987;55:1–143.
 17. Burkot TR, Williams JL, Schneider I. Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33:783–8.
 18. Beier JC, Perkins PV, Koros JK, Onyango FK, Gargan TP, Wirtz RA, et al. Malaria sporozoite detection by dissection and ELISA to assess infectivity of afro-tropical *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990;27:377–84.
 19. Beier MS, Schwartz IK, Beier JC, Perkins PV, Onyango F, Koros JK, et al. Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected *Anopheles* from western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;39:323–7.
 20. Morgan JC, Irving H, Okedi LM, Steven A, Wondji CS. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One.* 2010;5:e11872.
 21. Ndo C, Kopya E, Menze-Djantio B, Toto JC, Awono-Ambene P, Lycett G, et al. High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays. *Parasit Vectors.* 2016;9:341.
 22. Morlais I, Poncon N, Simard F, Cohuet A, Fontenille D. Intraspecific nucleotide variation in *Anopheles gambiae*: new insights into the biology of malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71:795–802.
 23. Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, Coetzee M. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:804–11.
 24. Santolamazza F, Mancini E, Simard F, Qi Y, Tu Z, della Torre A. Insertion polymorphisms of SINE200 retrotransposons within speciation islands of *Anopheles gambiae* molecular forms. *Malar J.* 2008;7:163.
 25. Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan TP, et al. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J Med Entomol.* 1988;25:9–16.
 26. Bass C, Nikou D, Blagborough AM, Vontas J, Sinden RE, Williamson MS, et al. PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malar J.* 2008;7:177.
 27. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: WHO; 2013.
 28. Finney DJ. Probit analysis. 3. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1971.
 29. Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, Williamson MS, Ranson H, Ball A, et al. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar J.* 2007;6:111.
 30. Fontenille D, Meunier JY, Nkondjio CA, Tchuinkam T. Use of circumsporozoite protein enzyme-linked immunosorbent assay compared with microscopic examination of salivary glands for calculation of malaria infectivity rates in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Cameroon. *J Med Entomol.* 2001;38:451–4.
 31. World Health Organization. Achieving universal coverage with long-lasting insecticidal nets in malaria control. In: Global Malaria Programme. Geneva: WHO; 2014.
 32. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop.* 2007;101:207–16.
 33. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 2011;27:91–8.
 34. Kawada H, Dida GO, Ohashi K, Komagata O, Kasai S, Tomita T, et al. Multimodal pyrethroid resistance in malaria vectors, *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* s.s. in western Kenya. *PLoS One.* 2011;6:e22574.
 35. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol.* 2002;18:161–3.
 36. Bousema T, Griffin JT, Sauerwein RW, Smith DL, Churcher TS, Takken W, et al. Hitting hotspots: spatial targeting of malaria for control and elimination. *PLoS Med.* 2012;9:e1001165.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ARTICLE 4

**Exploring the impact of glutathione
S-transferase (GST)-based
metabolic resistance to insecticide on vector
competence of
Anopheles funestus for *Plasmodium
falciparum***



RESEARCH ARTICLE

Exploring the impact of glutathione S-transferase (GST)-based metabolic resistance to insecticide on vector competence of *Anopheles funestus* for *Plasmodium falciparum* [version 1; referees: awaiting peer review]

Cyrille Ndo ¹⁻⁴, Edmond Kopya^{4,5}, Helen Irving³, Charles Wondji ^{1,3}

¹Department of parasitology, Centre for Research in Infectious Disease (CRID), P.O. Box 13591, Yaoundé, Cameroon, Yaoundé, P.O. Box 13591, Cameroon

²Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, Douala, P.O. Box 24157, Cameroon

³Vector Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, L3 5QA, UK

⁴Institut de recherche de Yaoundé (IRY), Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC), Yaoundé, P.O. Box 288, Cameroon

⁵Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, P.O. Box 337, Cameroon

v1 First published: 19 Mar 2019, 4:52 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15061.1>)

Latest published: 19 Mar 2019, 4:52 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15061.1>)

Abstract

Background: Malaria control heavily relies on insecticide-based interventions against mosquito vectors. However, the increasing spread of insecticide resistance is a major threat. The extent to which such resistance, notably metabolic resistance, interferes with the development of the *Plasmodium* parasite and its impact on overall malaria transmission remains poorly characterized. Here, we investigated whether glutathione S-transferase-based resistance could influence *Plasmodium falciparum* development in *Anopheles funestus*.

Methods: *Anopheles funestus* females were infected with *P. falciparum* gametocytes and midguts were dissected at day 7 post infection for detection/quantification of oocysts. Infection parameters were compared between individual with different L119F-GSTe2 genotypes, and the polymorphism of the GSTe2 gene was analyzed in infected and uninfected mosquito groups.

Results: Overall, 403 mosquitoes were dissected and genotyped. The frequency of the L119F-GSTe2 resistance allele was significantly higher in non-infected (55.88%) compared to infected (40.99%) mosquitoes (Fisher's exact test, $P < 0.0001$). Prevalence of infection was significantly higher in heterozygous and homozygous susceptible genotypes ($P < 0.001$). However, homozygous resistant and heterozygous mosquitoes exhibited significantly higher infection intensity ($P < 0.01$). No association was observed between the GSTe2 polymorphism and the infection status of mosquitoes.

Conclusion: Altogether, these results suggest that GSTe2-based metabolic resistance may affect the vectorial competence of resistant *An. funestus* mosquitoes to *P. falciparum* infection, by increasing its permissiveness to *Plasmodium* infection.

Open Peer Review

Referee Status: AWAITING PEER

REVIEW

Any reports and responses or comments on the article can be found at the end of the article.

Keywords

Malaria, Insecticide resistance, *Anopheles funestus*, *Plasmodium falciparum*, metabolic resistance, GSTe2

Corresponding author: Cyrille Ndo (cyrndo@yahoo.fr)

Author roles: **Ndo C:** Conceptualization, Data Curation, Formal Analysis, Funding Acquisition, Investigation, Methodology, Project Administration, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing; **Kopya E:** Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing – Review & Editing; **Irving H:** Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing – Review & Editing; **Wondji C:** Conceptualization, Supervision, Writing – Review & Editing

Competing interests: No competing interests were disclosed.

Grant information: This research was funded by Wellcome Trust, through a Wellcome Trust Training fellowship in public health and tropical medicine to C.N [102543].

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Copyright: © 2019 Ndo C *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution Licence](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: Ndo C, Kopya E, Irving H and Wondji C. **Exploring the impact of glutathione S-transferase (GST)-based metabolic resistance to insecticide on vector competence of *Anopheles funestus* for *Plasmodium falciparum* [version 1; referees: awaiting peer review]** Wellcome Open Research 2019, 4:52 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15061.1>)

First published: 19 Mar 2019, 4:52 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15061.1>)

Introduction

Intense control efforts have been deployed since 2000 to reduce the burden of malaria in Africa, relying heavily on insecticide-based interventions, including the scale-up of long-lasting insecticide nets (LLINs) and indoor residual spraying (IRS). The proportion of households possessing at least one LLIN has increased from less than 50% in 2010 to an estimated 80% in 2016. Similarly, the proportion of populations at risk of malaria sleeping under LLINs has increased from 24% to 54% in the same time frame (WHO, 2017). The implementation of these vector control measures led to significant reduction of malaria incidence and mortality by 21% and 31%, respectively on the African continent, between 2011 and 2015 (WHO, 2017). Unfortunately, the heavy use of insecticides in the public health and agriculture sectors has in turn selected resistance in major vector mosquitoes *An. gambiae sl* and *An. funestus* across the continent, and this is considered as a serious threat to sustainable malaria control (Ndo *et al.*, 2018; Ranson & Lissenden, 2016). There is a fear that such resistance could impact malaria vector competence and increase malaria transmission. However, little is known on the interactions between resistance and mosquito's ability to harbour and transmit malaria parasites, preventing us from anticipating the epidemiological impact of insecticide resistance.

In *Anopheles* mosquitoes, insecticide resistance is driven mainly by two mechanisms: alteration of target sites of insecticides and metabolic resistance through an over-expression of detoxification genes (Corbel *et al.*, 2007; Liu, 2015; Menze *et al.*, 2016). The target-site insensitivity resistance is the best characterized and can be easily monitored using various diagnostics (Bass *et al.*, 2007; Martinez-Torres *et al.*, 1998). Point mutations in the gene coding for the voltage-gated sodium channel confer cross resistance to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and pyrethroids insecticides named for knockdown resistance (*kdr*) (Ranson *et al.*, 2000), while mutations in the *ace-1* gene, which encodes the acetylcholinesterase enzyme, confer cross-resistance to carbamate and organophosphate insecticides (Alout & Weill, 2008; Weill *et al.*, 2004). Contrary to the target site mechanism, monitoring of metabolic resistance is more complex and requires advanced genomic analysis methods such as qPCR, microarrays or RNA sequencing. Metabolic mechanisms are the result of over-expression, either by amplification and/or upregulation of detoxification genes (Cytochrome P450s, glutathione S-transferases and esterases) (Hemingway & Ranson, 2000).

The successful management of insecticide resistance will require a good understanding of the mechanisms involved, but more importantly, its impact on vector capacity/competence and malaria transmission. The selection of insecticide resistance in mosquitoes is thought to interfere with the pathogens they transmit during one of the main steps of development, including parasite differentiation, proliferation, and migration to the specialised tissues. For example, enzymatic modifications involved in metabolic resistance could render mosquito environment toxic for the parasite or may influence one or many steps of the immune response, from the recognition of the parasite as foreign, to the deployment of the killing mechanism (Rivero *et al.*, 2010).

In *An. gambiae*, Alout *et al.* (Alout *et al.*, 2014), demonstrated that the target-site mutations, *ace-1* G119S and *kdr* L1014F conferring resistance to carbamates, DDT and pyrethroids respectively, are associated with increased *P. falciparum* infection prevalence and high sporozoite burden, probably enhancing mosquito vector competence and malaria transmission. Conversely, the lack of DNA-based markers for metabolic resistance has long prevented the assessment of the impact of this resistance mechanism on mosquito populations, including their ability to transmit *Plasmodium* parasites (vector competence). Progress made recently has led to the detection of a DNA-based marker for the glutathione S-transferase epsilon 2 gene (*GSTe2*) consisting of one single amino acid change (L119F) in an upregulated *GSTe2* (Riveron *et al.*, 2014). Geographical distribution of this point mutation strongly correlated with insecticide resistance patterns across Africa and functional characterization of recombinant *GSTe2* further supported the resistant allele as being more efficient at metabolizing insecticide, notably DDT, by enlarging the *GSTe2* DDT-binding cavity, leading to increased access and metabolism of the insecticide (Riveron *et al.*, 2014). Taking advantage of this new DNA-based *GSTe2* marker, we investigated the impact of a GST-mediated metabolic resistance on the vector competence of the major malaria vector *An. funestus* showing that the L119F-*GSTe2* mutation conferring pyrethroid/DDT resistance could influence *P. falciparum* infection in field populations of this vector.

Methods

Study sites

Mosquitoes originated from Mibellon (6 ° 46'N, 11 ° 70'E) and About (3 ° 7'N, 11 ° 65'N) situated 350 km and 25 km, respectively, from Yaoundé the capital city of Cameroon. Mibellon is situated in the Adamaoua region in the humid savannah zone constituted of woodlands with carpets of grass. The climate is Sudano-Guinean characterized by an eight-months rainy season from March to October, and a dry season of four months extending from November to February (Olivry, 1986). Two main malaria vector species namely *An. gambiae sl* and *An. funestus* are routinely found in the village, with the latter being the most abundant throughout the year. *Anopheles funestus* was found to actively transmit malaria in the locality, with an infection rate of up to 3.7% (Menze *et al.*, 2018; Ndo *et al.*, 2016).

About is located within the dense rainforest area of the Centre region (Southern Cameroon). The climate is alike to that of Equatorial Guinea, characterized by two rainy seasons extending from August to October, and from April to June. There are also two dry seasons running from November to April, and from June to July (Olivry, 1986). *Anopheles gambiae sl* and *An. funestus* are the main vector species found in the village. High *Plasmodium* infection rates reaching 23.33% were reported in these species which have also developed resistance to DDT and pyrethroids, notably deltamethrin and permethrin (Ndo *et al.*, 2018).

Mosquito sampling and identification

Mosquitoes were collected between 8-11am inside human dwellings using electric aspirators (Rule In-Line Blowers, Model 240). They were brought back to the insectary where initial

species identification was performed based on morphological criteria (Gillies & Coetzee, 1987). They were later confirmed as *An. funestus* using a PCR assay (Koekemoer *et al.*, 2002). All blood-engorged *An. funestus* mosquitoes were kept four days in cages until eggs were mature. Gravid females were allowed to oviposit individually using a forced egg-laying method (Morgan *et al.*, 2010). Progenies were pooled and reared to adulthood under standardised conditions.

Experimental infections

A total of 20 infection experiments were conducted, each using blood from different gametocyte carriers, with different parasite density. Gametocytes of *P. falciparum* were collected from the blood of infected children at local primary schools of the locality of Okola (Centre, Cameroon) as previously described (Ndo *et al.*, 2016). Briefly, presence of different parasite stages in the blood was detected by examining thick blood smears stained with 10% Giemsa under light microscope (Leica DM 300). The number of gametocytes was counted against 500 leucocytes, and an estimation of its density in the blood was done based on an average of 8000 white blood cells / μ l.

Blood was collected from selected gametocyte carriers by venepuncture into heparinized tubes. It was immediately centrifuged for 5 minutes at 2000 RPM using a centrifuge (Model EBA 20, Hettich Lab Technology) placed inside an incubator (Jouan EB115) set at 37°C, and the donor's plasma was replaced by the same volume of European AB malaria-naïve plasma (Catalogue number H4522, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Three to five day old F1 female mosquitoes were allowed to feed through an artificial parafilm membrane maintained at 37°C using a circulating heating water bath (Fisher Scientific INC, Isotemp 4500H5P, Pittsburgh USA). After 45 min, fed mosquitoes were sorted and placed in separated cups until dissection of midguts at day 7 (D7) post-infection. Dissected midguts were stained with 0.4% mercurochrome before they were examined under light microscopy (Leica, Model DM 300) at objective 40X for detection and quantification of oocysts. All carcasses were preserved at -20°C until DNA extraction was performed.

Throughout the experiments, we used the *An. coluzzii* Ngousso strain as control sample to monitor for the effectiveness of blood handling procedure and infectivity of gametocytes, since this strain is well adapted to feed on artificial parafilm membrane and is known to be highly susceptible to *P. falciparum* infection

(Ndo *et al.*, 2016). The *An. coluzzii* Ngousso strain originated from Yaoundé (Cameroon) and is routinely maintained at the insectary of the Organisation de Coordination pour la lutte Contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC, Cameroon) since 2006.

L119F-GSTe2 mutation genotyping

Genomic DNA was extracted using Livak's method (Livak, 1984) from carcasses of infected and non-infected mosquitoes after dissection of midguts. Genotypes of L119F-GSTe2 mutation were determined after DNA amplification using allele specific PCR diagnostic assays using two outer and two inner primers (Tchouakui *et al.*, 2018). Details of the sequences of primer used are presented in Table 1. PCR was performed in Gene Touch thermalcycler (Model TC-E-48DA), in a reaction volume of 15 μ l out using 10 μ M of each primer, 10X Kapa Taq buffer A, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1U Kapa Taq (Kapa biosystems 5U/ μ l, Cat: 07958471001) and 1 μ l of genomic DNA as template. The initial denaturation step at 95°C for 2 min was followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were separated on 2% agarose gel allowing detection of homozygous resistant (RR) at 523 bp, homozygous susceptible (RS) at 312 bp, and heterozygous (SS) with the presence of both bands.

GSTe2 gene sequencing

A total of 30 DNA samples including 15 of infected and 15 of non-infected mosquitoes were randomly selected for sequencing of the *GSTe2* gene using the following primers: Gste2F, 5'GGA ATT CCA TAT GAC CAA GCT AGT TCT GTA CAC GCT 3' and Gste2R, 5' TCT AGA TCA AGC TTT AGC ATT TTC CTC CTT 3' (Eurogentec, Liège Science Park, Belgium). DNA was amplified in a total volume of 15 μ l containing 10 μ M of each primer (forward and reverse), 10 mM dNTPs, ddH₂O, 10X buffer A, 1.5 mM MgCl₂ and 1ul of Kapa Taq polymerase (KapaBiosystems, Cat: 07958471001). PCR conditions were an initial denaturation step of 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec and 72°C for 1 min, with final extension at 72°C for 10 min. The size of amplicons was checked after visualization of DNA bands on a 2% agarose gel stained with GelRed nucleic acid dye (Biotium, Cat: 41003) (see Underlying data (Ndo, 2019)). PCR products were purified using ExoSap PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat:78201.1.ML) following manufacturer's instructions, and was sequenced using the forward and reverse primers.

Table 1. Details of primer sequences used to genotype L119F GSTe2 mutation in *Anopheles funestus*.

Primers	Sequence (5' to 3')
NdeI_Gste2F	GGAATTCATATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT
XbaI_Gste2 R	TCTACATCAAGCTTTAGCATTTCCTCCTT
L119F-Res	CGGGAATGTCCGATTTCCGTAGAAtAA
L119-F-Sus	CATTTCTATTCTCATTACAGGAGCGTAaTC

Data analysis

Parameters analyzed for each infection experiment were the prevalence of infection, as the proportion of mosquitoes infected after midgut dissection, and the infection intensity by calculation of mean and median number of oocysts in the midguts.

The geographical distribution of L119F-GSTe2 mutation was assessed by determining allelic and genotypic frequencies in each study sites. The impact of L119F-GSTe2 mutation on vector competence was investigated by comparing the frequency of the L119F-GSTe2 resistant allele in infected and non-infected mosquitoes, and by comparing infection parameters between mosquitoes of different genotypes (RR, RS and SS). Prevalence of infection, mean, and median intensity of infection were computed and compared using the Fisher's exact test and Mann-Whitney test, respectively. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant. The software [GraphPad Prism v 7.05](#) was used for all statistical analysis.

Genomic sequence analysis started with systematic detection and correction of base-calling and/or sequencing errors using [Bioedit V.7.2.5](#), after visual inspection of DNA sequence chromatograms. A consensus sequence for each single mosquito was generated using both forward and reverse sequences which were used for analysis of polymorphisms and phylogenetics. Sequences were aligned using [MEGA V.6.06](#) and DNA polymorphism parameters were generated in [dnaSP V.5.10](#). Haplotype networks and maximum likelihood phylogenetic tree were constructed using [TCS V.1.21](#).

Ethical statements

The study was approved by the Cameroonian Ethical Committee for Research in Human Health (Statement N°2016/10/817/CE/CNERSH). The gametocyte carriers used in this study were enrolled as volunteers. Their parents or legal guardians signed a written informed consent form after the procedures of the study were fully explained to them. All children found infected with the malaria parasites received free antimalarial treatment.

Results

Mosquito species identification

In Obout, 615 *Anopheles* mosquitoes were collected during the study period. According to morphological identification, 91.38% belonged to the *An. funestus* group while the remaining mosquitoes were all from the *An. gambiae* complex (8.62%). In Mibellon, *An. funestus* was also the main vector species representing 94.92% of the 670 *Anopheles* mosquitoes collected while *An. gambiae* *sl.* represented the rest (5.08%). The molecular species identification of the *An. funestus* group showed presence of *An. funestus* *s.s.* (97.38%) and *An. lesoni* (2.62%) in Obout, while only *An. funestus* *s.s.* (hereafter called *An. funestus*) were present in Mibellon.

Anopheles funestus infection

Overall, the blood feeding rate of *An. funestus* through the artificial parafilm membrane was low compared to that of the

An. coluzzii Ngouso strain used as control (80.42% - 100%) and didn't exceed 40% in all the cases (min - max: 1% - 38%). *Anopheles funestus* of both sites showed high susceptibility to natural *P. falciparum* isolates with 72.73% (8/11) and 77.78% (7/9) experiments yielding at least one infected mosquito in Obout and Mibellon, respectively. However, the global infection rate was significantly higher in Mibellon (69.73%) compared to Obout (42.74%) (Fisher's test, P:0.0037). By contrast, infection intensity represented by mean and median oocyst load in midgut showed high values in Obout (mean: 7.44±1.20; median: 4) compared to Mibellon (mean: 2.88±0.18; median: 2) (Mann-Whitney U: 4992, P:0.0003). When the data was analyzed separately, these two parameters showed important variations across experiments, but the differences were no longer significant ([Table 2](#)).

Distribution of L119F-GSTe2 resistance allele and *P. falciparum* infection

A non-uniform geographical distribution of L119F-GSTe2 resistance allele was observed with a higher frequency in Obout (65.93%) compared to Mibellon (25.95%). Distribution of *GSTe2* genotypes showed that homozygous resistant (RR: 50.40%) and heterozygous (RS:31.04%) were the most frequent in Obout suggesting high insecticide resistance in this site, while SS (60%) was predominant in Mibellon ([Figure 1](#)). For analysis of impact of *GSTe2* resistant allele on *An. funestus* vector competence, only experiments for which at least 20% of prevalence of infection was observed were considered ([Table 2](#)). The frequency of the L119F-GSTe2 resistance allele was significantly higher in non-infected (55.88%) compared to infected (40.99%) mosquitoes (Fisher's exact test, P<0.0001). Heterozygous (RS:58.14%) and susceptible (SS:64.33%) mosquitoes were significantly more infected than their homozygous resistant (RR:40.14%) counterparts (Fisher's exact test, P: 0.0037 for RR vs SS; P<0.001 for RR vs SS; P:0.0329 for RS vs SS) ([Figure 2](#)). As such, the odds ratio of being infected were significantly greater in RS and SS than in RR (OR: 2.07; 95%CI: 1.28-3.35 for RS vs RR; OR: 2.69, 95%CI:1.69-4.28 for SS vs RR; OR: 0.77, 95%CI: 0.48-1.24 for RS vs SS). The results of infection intensity were conflicting since mosquitoes bearing the resistant allele appeared to be much more permissive to oocyst infection ([Figure 3](#)). Overall the number of oocyst found in a single midgut was significantly higher in heterozygous (Mean ± SEM: 5.80±0.77; Median: 3) and homozygous resistant genotypes (Mean ± SEM: 7.30±1.94; Median: 3) compared to susceptible mosquitoes (Mean ± SEM: 2.92±0.26; Median: 2) (Mann-Whitney test, P:0.0323 for RR vs SS; P:0.0007 for RS vs SS; P:0.5011 for RR vs RS).

GSTe2 gene polymorphism and *Plasmodium* infection

A total of 34 sequences belonging to infected (N=18) and non-infected (N=16) mosquitoes were analyzed. The fragment length was 787 bp, spanning 3 exons and 2 introns and covering 92.6% of the full *An. funestus GSTe2* sequence ([AFUN015809-RA](#)). Performing a BLASTn search in [Vectorbase](#) using the *An. funestus* sequence generated in this study revealed a very

Table 2. Infection parameters in *An. funestus* from Obout and Mibellon.

Sites	Exp	Dissected	Infected	Infection rate (%)	Total oocyst	Mean oocyst	Median oocyst	Oocyst range
Obout	N°1	58	38	65.52	177	4.66±0.55	4	1 – 16
	N°2	61	17	27.87	39	2.29±0.41	2	1 – 8
	N°3	22	5	22.73	13	2.6±1.03	1	1– 6
	N°4	27	22	81.48	449	20.41±4.71	13.5	1 – 92
	N°5	22	10	45.45	64	6.4±1.94	6	1 – 21
	N°6	28	12	42.86	45	3.75±0.74	3	1 – 8
	N°7	24	1	4.17	1	1	1	1
	N°8	6	1	16.67	1	1	1	1
ALL	248	104	41.93	787	7.57±1.22	4	1–92	
Mibellon	N°9	9	4	44.44	13	3.25±0.63	3	2–5
	N°10	31	17	54.84	27	1.59±0.21	1	1–4
	N°11	14	5	42.86	12	2.4±0.4	3	1–3
	N°12	53	32	60.38	73	2.28±0.20	2	1–6
	N°13	7	7	100	31	4.43±0.89	4	1–8
	N°14	58	52	89.65	181	3.48±0.34	3	1–12
	N°15	13	12	100	35	2.92±0.62	2	1–8
ALL	185	129	69.73	372	2.88±0.18	2	1–12	

Gametocyte density is expressed in number of gametocytes per μl of blood assuming an average of 8000 white cells/ μl .

Exp: experiment; N°: number.

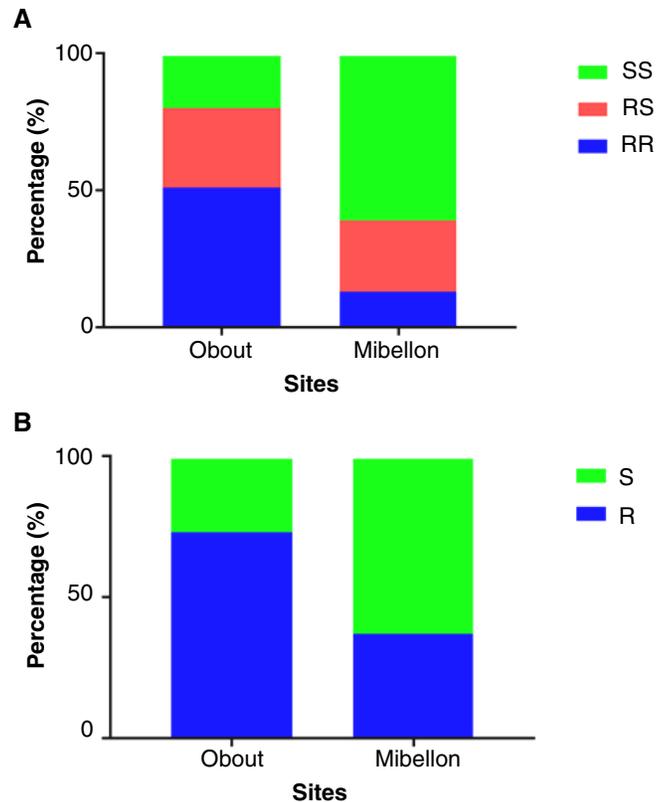


Figure 1. Distribution of L119F-GSTe2 resistance genotypes (A) and alleles (B) in Obout and Mibellon. (SS: homozygous susceptible genotype, RS: heterozygous genotype, RR: homozygous resistant genotype, R: resistant allele, S: susceptible allele).

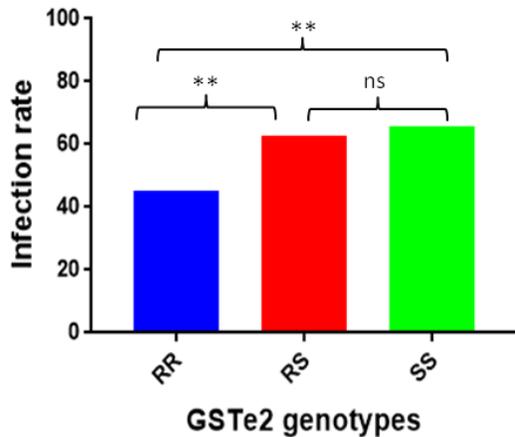


Figure 2. Prevalence of infection according to L119F-GSTe2 genotypes. **: $P < 0.001$; ns: not significant. (SS: homozygous susceptible genotype, RS: heterozygous genotype, RR: homozygous resistant genotype).

high-sequence homology (99.4%) with *An. funestus* full *GSTe2* gene sequence.

Overall the diversity of the *GSTe2* fragment analyzed was low with only 15 (1.91%) polymorphic sites. All the 15 polymorphic sites were present in the non-infected group, while only 11 were found in infected group. This means that, nucleotide diversity was a bit higher in non-infected ($\pi = 0.005$) compared to the infected ($\pi = 0.003$) group. The mean numbers of nucleotide differences of the non-infected and infected groups were 3.667 and 2.510, respectively (Table 3). However, no fixed mutation was observed between sequences of infected and non-infected mosquitoes.

The substitutions defined 14 nucleotide haplotypes. Sequences of haplotypes have been deposited in GenBank under accession numbers MK439920 - MK439933. Haplotype diversity was slightly higher in the non-infected (0.883) compared to the infected group (0.797) (Table 2). Six (42.86%) haplotypes appeared among non-infected specimens (Hap_9 - Hap_14), while 5 (35.71%) haplotypes were present in infected samples (Hap_2 - Hap_3, Hap_6 - Hap_8). Only 3 (21.43%) of the 14 haplotypes were shared between the two groups (Figure 4). The major haplotype grouped 13 of 34 sequences (9 of RR and 4 of RS genotypes) and was shared between non-infected (61.54%) and infected (38.46%) samples. The haplotype network and the maximum likelihood phylogenetic tree didn't reveal a clear segregation of haplotypes or individuals of these groups (Figure 4). Moreover, Tajima's D, although negative were statistically non-significant ($P > 0.05$) in all groups, suggesting no evidence of signature of selection (Table 3).

Discussion

In this study the distribution of the L119F-GSTe2 resistance allele and its impact on *P. falciparum* infection were assessed using mosquitoes originated from Obout and Mibellon (Cameroon). In these sites, *An. funestus* was by far the most abundant

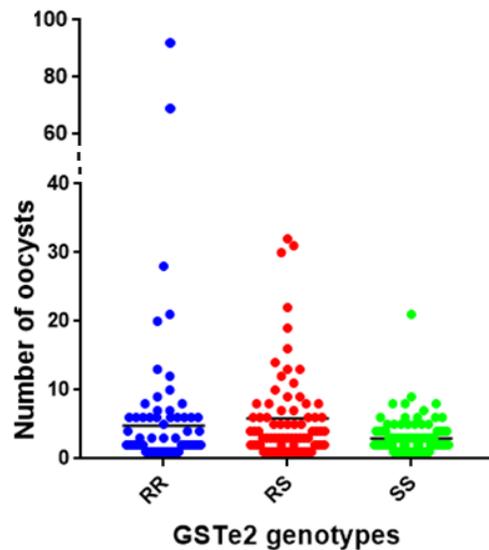


Figure 3. Infection intensity according to L119F-GSTe2 genotypes. Each dot represents a number of oocysts in a single midgut. It is possible that some dots are superposed. (SS: homozygous susceptible genotype, RS: heterozygous genotype, RR: homozygous resistant genotype).

species collected, probably breeding in swamps formed by numerous rivers and lakes that promote the practice of fishing. This observation is in line with results of previous studies conducted in the same localities, during which high densities of resting blood fed *An. funestus* were collected in human dwellings. Using the Taqman technique, elevated *P. falciparum* infection rates reaching 23% were detected in this vector, thus underlying the major role it plays in malaria transmission (Menze *et al.*, 2018; Ndo *et al.*, 2018; Ndo *et al.*, 2016). All together these findings indicate that in these localities *An. funestus* remains an important malaria vector, despite large coverage of insecticide treated nets. It is possible that the high level of insecticide resistance detected in vector populations of the localities surveyed is one of the key factors responsible for the reduced efficacy of these vector control tools (Menze *et al.*, 2018; Ndo *et al.*, 2018; Ndo *et al.*, 2016).

A non-uniform geographical distribution of L119F-GSTe2 resistance allele was observed in the two *An. funestus* populations. The frequency of the allele was very high in Obout (65.93%) while it was in turn low Mibellon (29.95%). This result, particularly in Mibellon, didn't correlate well with the high resistance to permethrin (mortality $48.88 \pm 5.76\%$), deltamethrin (mortality was $38.34 \pm 5.79\%$) and DDT ($55.28 \pm 8.28\%$) reported in this site, indicating that other mechanisms, such as overexpression of cytochrome P450s, could be involved (Menze *et al.*, 2018). Furthermore, this non-uniform distribution of the L119F-GSTe2 resistance allele also highlights that restriction of gene flow may exist between *An. funestus* populations in Cameroon, and/or that different selection pressures could have selected the resistance to insecticides in this species in both localities.

Table 3. Summary of *GSTe2* sequence polymorphisms in infected and non infected mosquitoes.

		Coding region				Non-coding region			Whole sequence
		Exon1	Exon2	Exon3	All	Intron1	Intron2	All	
Infected	N seq	18	18	18	18	18	18	18	18
	N indiv	9	9	9	9	9	9	9	9
	Size	107	202	309	643	72	72	144	787
	Poly sites	2	1	2	6	4	1	5	11
	H	3	2	3	7	5	2	6	8
	Hd	0.307	0.209	0.529	0.791	0.484	0.336	0.562	0.797
	pi	0.003	0.001	0.002	0.002	0.009	0.005	0.007	0.003
	K	0.320	0.209	0.765	1.503	0.641	0.366	1.007	2.510
	Fu Li D	-0.552	0.667	0.885	0.577	-0.070	0.667	-0.359	0.164
	Fu Li F	-0.798	0.405	0.977	0.336	-1.008	0.708	-0.607	-0.121
Non infected	N seq	16	16	16	16	16	16	16	16
	N indiv	8	8	8	8	8	8	8	8
	Size	107	202	309	643	72	72	144	787
	Poly sites	1	2	3	6	3	6	9	15
	H	2	2	4	6	4	4	6	9
	Hd	0.325	0.125	0.692	0.842	0.517	0.442	0.675	0.883
	pi	0.003	0.001	0.003	0.003	0.008	0.021	0.014	0.005
	K	0.325	0.250	1.058	1.633	0.575	1.458	2.033	3.667
	Fu Li D	0.688	-1.915	-0.039	-0.706	-1.122	0.612	-0.051	-0.369
	Fu Li F	0.627	-2.060	0.117	-0.694	-1.262	0.306	-0.333	0.544
Tajima's D	-1.096	-0.529	0.769	-0.331	-1.347	0.488	-0.974	-0.786	
Tajima's D	0.156	-1.498	0.495	-0.331	-1.055	-0.662	-0.919	-0.740	

N seq: number of sequences; N indiv: number of individuals; Poly sites: polymorphic sites; H: haplotypes; Hd: haplotype diversity; Pi: nucleotide diversity; K: average number of nucleotide differences.

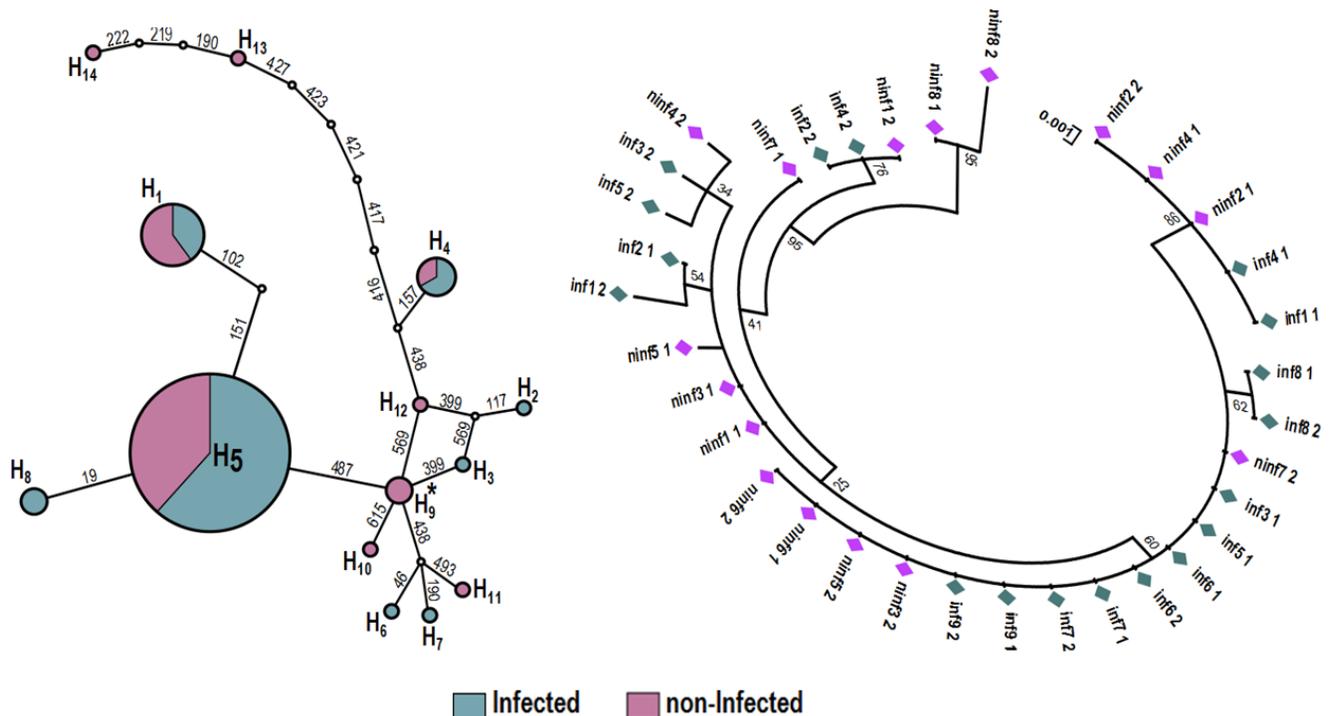


Figure 4. Haplotype network (left) and maximum likelihood phylogenetic tree (right) of *GSTe2* haplotypes in infected and non-infected *Anopheles funestus* mosquitoes.

Whether the L119F-GSTe2 resistance allele impacts vector competence of *An. funestus* was investigated by comparing infection prevalence and intensity between mosquitoes belonging to RR, RS and SS genotypes, and by analyzing the polymorphisms in the *GSTe2* gene in infected and uninfected samples. We used the parafilm-glass feeding system for experimental infection of *An. funestus*, and this shows that this technique can now be routinely used in this mosquito, similarly to *An. gambiae* *sl.*, despite the observation that blood feeding rates remain low, likely because freshly field collected mosquitoes are not well adapted to feed through an artificial membrane (Ndo *et al.*, 2016). Similarly to the study of Ndo *et al.* (Ndo *et al.*, 2016), the two *An. funestus* populations used in this study also showed high susceptibility to natural *P. falciparum* gametocyte, a result that further confirms that this species is highly competent to develop the malaria parasite, hence its major role in the transmission of this disease in sub-Saharan African settings. By detecting higher global infection rate in Mibellon, but higher infection intensity in Obout, our results didn't allow us to clearly establish whether *An. funestus* populations from rainforests (Obout) are more or less competent to develop/transmit the malaria parasite than those from the humid savannah (Mibellon). Further studies using several mosquito populations from both ecoclimatic zones and fed on the same infectious blood are necessary. Sequence analysis did not reveal an association between *GSTe2* polymorphism and infection in field *An. funestus* mosquitoes, although sequencing more samples in the future could help to confirm this. On the other hand, infection prevalence and intensity were compared between mosquitoes of different genotypes, at oocyst level. Though, it could have been also interesting to examine this impact at sporozoite level, which is the parasite stage transmitted to humans, the cumulative effect of the low number of mosquitoes fed on artificial membrane, the number dissected at day 7 and mosquito mortality before day 14, when sporozoites can be found in salivary glands, prevented us from carrying out this analysis. Nonetheless, analyzing such impact at oocyst level is reliable, as it has been shown that mosquito infectivity can be predicted with reasonable certainty from oocyst prevalence including in the cases of low intensity infections (Stone *et al.*, 2013). In general, the results obtained were contrasting. Both insecticide susceptible homozygote (SS) and heterozygote (RS) genotypes were significantly more susceptible to *P. falciparum* infection than the homozygote resistant (RR) genotype. By contrast results on the intensity of infection show that mosquitoes bearing the resistant L119F-GSTe2 allele (RR and RS genotypes) are more permissive to parasite infection than those with the SS genotype. This later observation suggest that GST-based metabolic resistance might interact with the immune system of the mosquito leading to a significant development of the parasite (Ndiath *et al.*, 2014; Rivero *et al.*, 2010). Here, we suggest two possible explanations. The first is that overproduced GSTs might protect the parasites against the effects of reactive oxygen species (ROS), thus increasing the susceptibility of mosquitoes, by neutralising the oxidative response to the *Plasmodium*. ROS have been shown to have a role in insect innate immune responses as a potent pathogen-killing agent. For example, in *An. gambiae* Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2003)

demonstrated that ROS is involved in *P. berghei* melanotic encapsulation. However, Bahia *et al.* (Bahia *et al.*, 2013) reported that the interactions between *An. aquasalis* and *P. vivax* do not follow the model of ROS-induced parasite killing, indicating that the role of ROS in immune response to *Plasmodium* infection could vary according the *Anopheles*-parasite system. Future studies are therefore needed to investigate the role of ROS in *An. funestus* response to *P. falciparum* infection. The second explanation is that resource-based trade-offs could have affected mosquito immune-competency. For instance overproduction of detoxifying enzymes, such as esterases or GSTs, is likely to deplete the resource pool, limiting the vector's ability to mount an immune response, therefore favouring the development of the parasite (Hall *et al.*, 2009; Rivero *et al.*, 2010). Considering this later hypothesis, it could be likely that the low prevalence of infection in the RR genotype compared to the two others could have resulted in higher mortality before day 7 of individuals with a high load of infection, due to their inability to simultaneously maintain insecticide metabolic resistance and support development of a large amount of parasites, because of the limited host's energetic reserves. Likewise, Alout *et al.* (Alout *et al.*, 2016) also reported that *Plasmodium* infection reduced the survivorship of females in both resistant Acerkis and Kdrkis strains of *An. gambiae* *sl.*

The effect of insecticide resistance on mosquito vector competence might differ according to the species and/or the resistance mechanism involved. In *An. gambiae*, Ndiath *et al.* (Ndiath *et al.*, 2014) also reported denser infection in RR and RS than SS genotypes, while Alout *et al.* (Alout *et al.*, 2013) showed that the *kdr* resistant allele is associated with reduced parasite burden in infected individuals at the oocyst stage, when compared to the susceptible strain. In *An. funestus*, Lo *et al.* (Lo & Coetzee, 2013) reported that pyrethroid resistant strain FUMOZ-R supported the lowest numbers of oocysts and sporozoites while the insecticide susceptible strain FUMOZ-BS produced highest sporozoite indices. By contrast, a recent study carried out by Tchouakui *et al.* (submitted) showed that a GST-mediated metabolic resistance to insecticides is associated with high *Plasmodium* infection in field resistant *An. funestus*. Altogether, observations from the present and previous mentioned studies showed that insecticide resistance, including GSTe2-based metabolic-based resistance, may affect the development of the malaria parasite in mosquito vectors. Considering the importance of *An. funestus* in malaria transmission and the wide distribution of insecticide resistance in this mosquito, these results are of great concern for the epidemiology of malaria in sub-Saharan Africa. However, because several host external and internal factors could influence *Anopheles-Plasmodium* interactions, additional work needs to be done to further assess the impact of insecticide resistance on malaria transmission and epidemiology. To minimize the impact of confounding factors, such work should be carried on mosquitoes sharing similar genetic backgrounds. Finally, future experiments should also explore the impact of *GSTe2* on *Plasmodium* infection at sporozoite level as it is this stage that is transmitted to human through mosquito bites.

Data availability

Underlying data

Open Science Framework: Exploring the impact of glutathione S-transferase (GST)-based metabolic resistance to insecticide on vector competence of *Anopheles funestus* for *Plasmodium falciparum*. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/JMYWF> (Ndo, 2019)

This project contains the following underlying data:

- Gel1.tif (Representative gel image)
- Gel2.tif (Representative gel image)
- Gel3.tif (Representative gel image)
- Gel4.tif (Representative gel image)
- Gste2 gene sequence results.fas (Mosquito sampling and identification data)
- Raw data for infection and GSTe2 genotyping.xlsx (GSTe2 sequencing reads)

Data are available under the terms of the [Creative Commons Zero “No rights reserved” data waiver](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC0 1.0 Public domain dedication).

Grant information

This research was funded by Wellcome Trust, through a Wellcome Trust Training fellowship in public health and tropical medicine to C.N [102543].

The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Acknowledgments

We thank the participating children and their parents, for their involvement in this study; the local authorities, for their support.

References

- Alout H, Dabiré RK, Djogbénou LS, *et al.*: Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci Rep*. 2016; 6: 29755.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- 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(5): e63849.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Alout H, Weill M: Amino-acid substitutions in acetylcholinesterase 1 involved in insecticide resistance in mosquitoes. *Chem Biol Interact*. 2008; 175(1–3): 138–141.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Alout H, Yameogo B, Djogbénou LS, *et al.*: Interplay between *Plasmodium* infection and resistance to insecticides in vector mosquitoes. *J Infect Dis*. 2014; 210(9): 1464–1470.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Bahia AC, Oliveira JH, Kubota MS, *et al.*: The role of reactive oxygen species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection. *PLoS One*. 2013; 8(2): e57014.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, *et al.*: Detection of knockdown resistance (*knr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar J*. 2007; 6: 111.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, *et al.*: Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*. 2007; 101(3): 207–216.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Gillies M, Coetzee M: A supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Pub Sth Afr Inst Med Res*. 1987; 55: 1–143.
[Reference Source](#)
- Hall SR, Simonis JL, Nisbet RM, *et al.*: Resource ecology of virulence in a planktonic host-parasite system: an explanation using dynamic energy budgets. *Am Nat*. 2009; 174(2): 149–162.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Hemingway J, Ranson H: Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45: 371–391.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Koekemoer LL, Kamau L, Hunt RH, *et al.*: A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66(6): 804–811.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Kumar S, Christophides GK, Cantera R, *et al.*: The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(24): 14139–14144.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Liu N: Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol*. 2015; 60: 537–559.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Livak KJ: Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. *Genetics*. 1984; 107(4): 611–634.
[PubMed Abstract](#) | [Free Full Text](#)
- Lo TM, Coetzee M: Marked biological differences between insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles funestus* infected with the murine parasite *Plasmodium berghei*. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 184.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, *et al.*: Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*knr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998; 7(2): 179–184.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Menze BD, Riveron JM, Ibrahim SS, *et al.*: Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations. *PLoS One*. 2016; 11(10): e0163261.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Menze BD, Wondji MJ, Tchappa W, *et al.*: Bionomics and insecticides resistance profiling of malaria vectors at a selected site for experimental hut trials in central Cameroon. *Malar J*. 2018; 17(1): 317.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Morgan JC, Irving H, Okedi LM, *et al.*: Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. *PLoS One*. 2010; 5(7): e11872.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Ndiath MO, Cailleau A, Diedhiou SM, *et al.*: Effects of the *knr* resistance mutation on the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* populations to *Plasmodium falciparum*: a hindrance for vector control. *Malar J*. 2014; 13: 340.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Ndo C: Exploring the impact of glutathione S-transferase (GST)-based metabolic resistance to insecticide on vector competence of *Anopheles funestus* for *Plasmodium falciparum*. 2019.
<http://www.doi.org/10.17605/OSF.IO/JMYWF>
- Ndo C, Kopya E, Donbou MA, *et al.*: Elevated *Plasmodium* infection rates and high pyrethroid resistance in major malaria vectors in a forested area of Cameroon highlight challenges of malaria control. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1): 157.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Ndo C, Kopya E, Menze-Djantio B, *et al.*: High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays. *Parasit Vectors*. 2016; 9(1): 341.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Olivry JC: Fleuves et rivières du Cameroun. MESRES-ORSTOM 9, Collection Monographie Hydrologiques. Editions de l'ORSTOM Paris; 1986.
[Reference Source](#)
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, *et al.*: Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*. 2000; 9(5): 491–497.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Ranson H, Lissenden N: Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain

Malaria Control. *Trends Parasitol.* 2016; **32**(3): 187–196.

[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)

Rivero A, Vézilier J, Weill M, *et al.*: **Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem?** *PLoS Pathog.* 2010; **6**(8): e1001000.

[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, *et al.*: **A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector.** *Genome Biol.* 2014; **15**(2): R27.

[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

Stone WJ, Elderling M, van Gemert GJ, *et al.*: **The relevance and applicability of oocyst prevalence as a read-out for mosquito feeding assays.** *Sci Rep.* 2013; **3**: 3418.

[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

Tchouakui M, Riveron JM, Djonabaye D, *et al.*: **Fitness Costs of the Glutathione S-Transferase Epsilon 2 (L119F-GSTe2) Mediated Metabolic Resistance to Insecticides in the Major African Malaria Vector *Anopheles Funestus*.** *Genes (Basel).* 2018; **9**(12): pii: E645.

[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

Weill M, Malcolm C, Chandre F, *et al.*: **The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect Mol Biol.* 2004; **13**(1): 1–7.

[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)

WHO: **World Malaria Report 2017.** WHO Global Malaria Programme. World Health Organization. 2017; Accessed 5 January 2018.

[Reference Source](#)