

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE
LABORATORY OF ZOOLOGY

**Impact de la résistance aux insecticides sur la
composition des protéines salivaires (sialome) et ses
conséquences sur la capacité vectorielle chez
Anopheles funestus Giles, 1900 (Diptera : Culicidae),
vecteur majeur du paludisme au Cameroun**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de
Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Animaux, option Zoologie
Par

DJOUNKWA NOUAGE Lynda

Matricule : 08Q0197

Master ès-Sciences

et

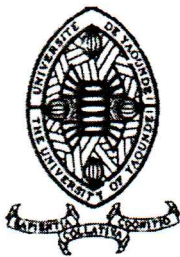


Soutenue publiquement le 13 décembre 2024 devant le jury composé de :

NJIOKOU Flobert, Professeur, Université de Yaoundé IPrésident
KEKEUNOU Sévilor, Professeur, Université de Yaoundé I.....Rapporteur
WONDJI Charles Sinclair, Professeur, Liverpool School of Tropical Medicine.....Rapporteur
TCHUENGUEM FOHOUE Fernand, Professeur, Université de Ngaoundéré.....Membre
DJIETO Lordon Champlain, Professeur, Université de Yaoundé I.....Membre
FOKO DADJI Gisèle, Maître de Conférences, Université de Yaoundé IMembre

Année 2024

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET
PHYSIOLOGIE ANIMALES

BP 812 – Tél : (237) 222-56-59
Fax : (237) 233-46-96
CAMEROUN

ATTESTATION DE CORRECTION

Conformément à l'autorisation de soutenance de la thèse de Doctorat/Ph.D V/L N°0803/UYI/CRFD-SVSE/URFD-SV/Ad du 06 septembre 2024 de Monsieur le Recteur de l'Université de Yaoundé I, la thèse intitulée « **Impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires (sialome) et ses conséquences sur la capacité vectorielle chez *Anopheles funestus* Giles, 1900 (Diptera : Culicidae), vecteur majeur du paludisme au Cameroun** » a été présentée et soutenue publiquement le **vendredi 13 décembre 2024** par l'étudiante **DJOUNKWA NOUAGE Lynda**, Matricule **08Q0197**. Le document final a été corrigé suivant les recommandations du jury.

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

Fait à Yaoundé, le **10 JAN 2025**


Le Président du Jury

L'Examineur

Le Chef de Département



Pr. Sévilor KEKEUNOU
Faculté des Sciences
Université de Yaoundé I

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 2024/2025
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 16 décembre 2024

ADMINISTRATION

1. **DOYEN** : OWONO OWONO Luc Calvin, *Professeur*
2. **VICE-DOYEN / DPSAA**: NDJIGUI Paul-Désiré, *Professeur*
3. **VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*
4. **VICE-DOYEN / DRC** : NOUNDJEU Pierre, *Maître de Conférences*
5. **Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*
6. **Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Scolarité DAARS** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (44)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSICI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	AKINDEH MBUH NJI	Maître de Conférences	En poste
11	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
12	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
13	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
14	DAKOLE DABOY Charles	Maître de Conférences	En poste
15	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Maître de Conférences	En poste
16	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
17	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
18	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
19	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
20	KENGNE NOUEMSI Anne Pascale	Maître de Conférences	En poste
21	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
22	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
23	MANANGA Marlyse Joséphine	Maître de Conférences	En poste
24	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
25	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
26	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
27	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
28	Palmer MASUMBE NETONGO	Maître de Conférences	En poste
29	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Maître de Conférences	En poste
30	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

31.	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
-----	-----------------	------------------	----------

32.	BEBOY EDJENGUELE Sara N.	Chargée de Cours	En poste
33.	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
34.	FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
35.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
36.	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Chargée de Cours	En poste
37.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
38.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste

39.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Assistant	En Poste
40.	ELLA Fils Armand	Assistant	En Poste
41.	EYENGA Eliane Flore	Assistante	En Poste
42.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Assistante	En Poste
43.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Assistante	En Poste
44.	WOGUIA Alice Louise	Assistante	En Poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (50)

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

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

31.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Chargé de Cours	En poste
32.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
33.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
34.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste
35.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargée de Cours	En poste

36.	FOSSI TANKOUA Olivia Epse DJEUTCHOUANG SAYANG	Chargée de Cours	En poste (transfert Uté de Dla)
37.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
38.	KOGA MANG DOBARA	Chargé de Cours	En poste
39.	LEME BANOCK Lucie	Chargée de Cours	En poste
40.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste
41.	METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE GHOUMO	Chargée de Cours	En poste
42.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
43.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Chef Div. Uté Bamenda</i>
44.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
45.	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
46.	YEDE	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste
49.	NDENGUE Jean De Matha	Assistant	En poste
50.	ZEMO GAMO Franklin	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

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

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

17.	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18.	GONMADGE CHRISTELLE	Chargé de Cours	En poste
19.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20.	MANGA NDJAGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
21.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargée de Cours	En poste
22.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargée de Cours	En poste
23.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE	Chargée de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
24.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
25.	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
26.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
27.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
28.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
29.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste

30.	TEMEGNE NONO Carine	Chargée de Cours	En poste
31.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Assistant	En poste
32.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (27)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NENWA Justin	Professeur	En poste
5.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
6.	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Professeur	En poste
7.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste

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

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

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (33)

1.	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>DEPE/Univ. Bertoua</i>
2.	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UYI</i>
3.	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département UDS</i>
4.	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Recteur UBertoua/ Chef de Département</i>
5.	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
6.	MKOUNGA Pierre	Professeur	En poste
7.	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8.	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
9.	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10.	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11.	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12.	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>
14.	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>C.E.A/ MINESUP</i>
15.	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Dir ENS/Uté Bertoua</i>
16.	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
17.	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
18.	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
19.	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Maître de Conférences	En poste
20.	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

21.	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
22.	MUNVERA MFIFEN Aristide	Chargé de Cours	En poste
23.	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
24.	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
25.	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
26.	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
27.	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
28.	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
29.	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
30.	TSAMO TONTSA Armelle	Chargée de Cours	En poste
31.	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste

32.	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste
33.	NGUEMDJO CHIMEZE Valery Wilfried	Assistant	En poste

6- DEPARTEMENT DES ENERGIES RENOUVELABLES (ER) (1)		
BODO Bertrand	Professeur	<i>Chef de Département</i>

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

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

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

5.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	<i>Chef de Cellule MINFOPRA</i>
6.	AMINO HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
7.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargée de Cours	En Poste
8.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
9.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Chargé de Cours	En poste
11.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
12.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
13.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
14.	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
15.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	En poste
16.	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
17.	NZEKON NZEKO'O Armel Jacques	Chargé de Cours	En poste
18.	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur Adjoint ENSET Ebolowa</i>
19.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste

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

8- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (34)

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

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

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	BITYE MVONDO Esther	Chargé de Cours	En poste
13.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17.	KOKOMO AYISSI Eric Brice	Chargé de Cours	En poste(transfert de l'université de Douala)
18.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
19.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
20.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
21.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
22.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
23.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
24.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
25.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
26.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
27.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Chargé de Cours	En poste
28.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste

29	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste
----	----------------------------------	-----------------	----------

30	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
31	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
32	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
33	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
34	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste

9- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>Vice-Doyen / DSSE</i>
3.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Professeur	En poste

4.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
6.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Maître de Conférences	En poste
7.	MUNE MUNE Martin Alain	Maître de Conférences	En poste
8.	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
9.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
10.	TCHIKOUA Roger	Maître de Conférences	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>

11	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
12	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
13	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
14	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargée de Cours	En poste
15	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
16	NKOUÉ TONG Abraham	Chargé de Cours	En poste
17	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
18	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Chargée de Cours	En poste
19	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste

20	EZO'O MENGO Fabrice Téléstor	Assistant	En poste
21	EHETH Jean Samuel	Assistant	En poste

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

10. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (42)

1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	BIYA MOTTO Frédéric	Professeur	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
3.	DJUIDJE KENMOE ép. ALOYEM	Professeur	En poste
4.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
5.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
6.	EYEBE FOU DA Jean sire	Professeur	En poste
7.	HONA Jacques	Professeur	En poste
8.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
9.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	<i>Chef de Département/Uni. Bertoua</i>
10.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
11.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
12.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i>
13.	SIMO Elie	Professeur	En poste
14.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FS/Univ/Bda</i>
15.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
16.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
17.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

18.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	<i>Chef de Division de la formation continue et à distance/ENSPY</i>
19.	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
20.	FOUEJIO David	Maître de Conférences	<i>Chef Cell/ MINADER</i>
21.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
22.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
23.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
24.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
25.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
26.	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste

27.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
28.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>DAAC/UYII</i>
29.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>En stage depuis février 2023</i>
30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
33.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
34.	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste
35.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
36.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
37.	NGA ONGODO Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
38.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	<i>Directeur Unité de production des réactifs/IMPM</i>
39.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste
40.	TOGUEU MOTCHEYO Alain Bertrand	Chargé de Cours	En poste
41.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
42.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

11- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (34)

1.	EKOMANE Emile	Professeur	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
2.	GANNO Sylvestre	Professeur	En poste
3.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Vice-Doyen /DPSAA</i>
4.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
5.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
6.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
7.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>

8.	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
9.	Elisé SABABA	Maitre de Conférences	En poste
10.	EYONG John TAKEM	Maître de Conférences	En poste
11.	FUH Calistus Gentry	Maître de Conférences	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT(ai)</i>
12.	MBIDA YEM	Maitre de Conférences	En poste
13.	MBESSE Cécile Olive	Maitre de Conférences	En poste
14.	METANG Victor	Maître de Conférences	En poste
15.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître de Conférences	En poste
16.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
17.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
18.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef. Cell /MINRESI</i>
19.	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
21.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

22.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
23.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Chargée de Cours	En poste
24.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
25.	NGO'O ZE ARNAUD	Chargé de Cours	En poste
26.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
27.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
28.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
29.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
30.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
31.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	En poste

32.	KOAH NA LEBOGO Serge P.	Assistant	En poste
-----	-------------------------	-----------	----------

33.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Assistante	En poste
-----	--	------------	----------

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

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	08 (01)	22 (13)	08 (03)	06 (04)	44 (20)
BPA	11 (01)	19 (09)	16 (05)	03 (01)	49 (16)
BPV	06 (01)	10 (02)	14 (07)	02 (00)	32 (10)
CI	07 (01)	14 (03)	05 (01)	01 (00)	27 (05)
CO	06 (01)	14 (05)	11 (03)	02 (00)	33 (09)
ER	01 (00)		/	/	01 (0)
IN	02 (00)	02 (00)	15 (01)	03 (00)	22 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	20 (01)	05 (01)	34 (02)
MIB	03 (01)	07 (03)	09 (05)	05 (02)	24 (11)
PHY	17 (01)	12 (04)	12 (01)	01 (00)	42 (06)
ST	07 (00)	14 (03)	11 (03)	02 (01)	34 (07)
Total	69 (07)	122 (42)	121 (30)	30 (09)	342 (88)

Soit un total de **342 (88)** dont :

- Professeurs **69 (07)**
- Maîtres de Conférences **123 (41)**
- Chargés de Cours **120 (30)**
- Assistants **30 (09)**

() = Nombre de Femmes **88**

ENSEIGNANTS SOUS CONTRAT DE COLLABORATION

1.	BELL JOSEPH MARTIN	547019U	17/06/1957	Sakbayeme	M	10/11/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
2.	DJOUFAC WOUFMO EMMANUEL	547069Z	09/01/1957	Ngaoundéré	M	04/05/1990	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
3.	ELIMBI ANOINE.	546958X	30/11/1955		M		RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
4.	FOMENA ABRAHAM	546778X	10/11/1958	Batcham	M	01/12/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
5.	GHOGOMU TIH RAPH	547004-K	23/12/1956	BAMBALANG	M	13/10/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
6.	KAMTCHOUING PIERRES	143299X	13/09/1955	Nkongsamba	M	01/10/1988	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
7.	LAMINSI SAMUEL	143149J	30/12/1953		M		RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
8.	NGADJUI TCHALEU BONAVENTURE	546959-G	15/09/1953	FONTSIGA	M	12/08/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
9.	NGO BILONG ANASTASIE épouse TIH	546164-I	27/12/1955	MBANGA	F	28/07/2000	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	MC
10.	NKENGFAK EPHRAIM AUGUSTIN	546948-F	17/06/1955	YAOUNDE	M	01/09/1983	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
11.	NDIKONTAR MAURICE KOR	169784G	09/05/1958	Mbaa	M	10/01/1991	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION-EN COURS DE SIGNATURE	PR
12.	NJIOKOU FLOBERT	547321H	11/06/1958	Nkongsamba	M	03/05/1993	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION-EN COURS DE SIGNATURE	PR
13.	BENG NEE NINTCHOM PENLAP VERONIQUE	546643B	07/01/1957	Melong I	F	02/10/1992	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION	PR
14.	FOKOU ELIE	546725J	08/06/1957	Fiéla-Bamendjinda	M	01/04/1988	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION EN COURS DE FINALISATION	PR
15.	TCHOUANKEU JEAN CLAUDE	547295-E	06/01/1959	Douala	M	01/12/1989	RETRAITE-CONTRAT DE COLLABORATION EN COURS DE FINALISATION	PR
16.	BOYOMO ONANA						CONTRATS TRAITES LORS DU CONSEIL D'UNIVERSITE DU 12 JUILLET 2024	MC
17.	WANDJI JEAN	162242M	09/06/1958	Bangou	M			UYI
18.	YOUMBI EMMANUEL	547332Z	12/02/1959	Bangou	M	Bangou		PR
19.	NGODO MELINGUI JEAN	500475X	05/09/1958	Endoum		20/10/2005		MC
20.	KOFANE TIMOLEON CREPIN							PR
21.	NGAMENI EMMANUEL	547277-C	24/04/1959	Mbanga	M			PR
22.	BITOM DIEUDONNE	547050X	23/11/1958	Ambam	M			PR

DEDICACE

A :

Maman MAKOUNDOUM Martine de regrettée mémoire ;

Papa NOUAGE Sébastien

REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont débuté à l'Unité de Recherche de la « Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) » basée jadis à l'Organisation de Coopération pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) à Yaoundé et se sont achevés au « Centre for Research in Infectious Diseases » (CRID) à Yaoundé où ladite Unité a été relocalisée. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet financé par la Wellcome Trust Training Fellowship (109930/Z/15/Z) accordé au **Dr. Emmanuel ELANGA N'DILLE**.

Avant de restituer les principaux résultats de ces travaux, qu'il me soit permis d'adresser mes remerciements les plus sincères, particulièrement à/au/aux :

- **Pr. WONDJI Charles**, Professeur à l'Université de Liverpool School of Tropical Medicine et Directeur Exécutif du CRID, pour avoir accepté de codiriger cette thèse et pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans d'excellentes conditions scientifiques. Je suis reconnaissante de cette chance qui m'a été donnée en tant que femme dans le domaine de la recherche. Je lui suis également reconnaissante pour le temps considérable qu'il m'a consacré, ses qualités pédagogiques et scientifiques remarquables, ainsi que sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui exprime ma gratitude pour la confiance qu'il m'a témoignée a de multiples égards ;

- **Pr KEKEUNOU Sévilor**, Professeur à l'Université de Yaoundé 1, pour la confiance qu'il m'a accordé en me prenant dans son équipe de recherche à l'issue de mon Master. En tant qu'enseignant, encadreur et figure paternelle, il a su m'aider à progresser en me prodiguant des critiques constructives, en appliquant une rigueur scientifique et morale, il a su canaliser et orienter le chercheur que je suis devenue aujourd'hui. Il n'a ménagé aucun effort pour m'aider à réussir ce travail. Je tiens à exprimer ici ma profonde reconnaissance envers lui ;

- **Dr ELANGA N'DILLE Emmanuel**, chargé de cours à l'Université de Dschang et chercheur associé au CRID qui m'a choisi pour participer à ce projet et m'a accordé sa confiance tout au long de ces années. Les remarques, l'ouverture d'esprit, la franchise et la gentillesse dont il a fait preuve ont grandement contribué à la réalisation des objectifs de cette thèse. Je le remercie sincèrement pour sa disponibilité, sa bonne humeur, sa patience, son dynamisme et ses précieux conseils. Je suis reconnaissante d'avoir reçu de façon constante des encouragements de celui-là que j'appelle affectueusement "mon père" ;

- **enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales**, en particulier les professeurs **BILONG BILONG Charles Félix** Chef de Département de regretté mémoire, **FOMENA Abraham**, **DJIETO LORDON Champlain**, **MONY Ruth**, **MIMPFOUNDI**

Rémy, MBENOUM MASSE Serge, NGASSAM Pierre, TCHUEM TCHUENTE Louis Albert, NOLA Moïse pour les enseignements reçus depuis ma 1^{ère} année à la Faculté des Sciences ;

- mon tendre époux **BOUSSOUGOU SAMBE Stravensky TERENCE** pour son immense soutien, ses encouragements constants et son affection sincère. Sa présence et son appui inconditionnel ont été d'une importance capitale dans tous les aspects de ma vie. Je le remercie infiniment pour sa bienveillance, sa compréhension et sa tendresse, qui m'ont permis de surmonter les défis et d'atteindre mes objectifs personnels et professionnels. Je suis très reconnaissante d'avoir une personne aussi formidable à mes côtés ;

- **Pr. NDO Cyrille, Drs KAMGANG Basile, AWONO-AMBENE Parfait, NKONDJIO Antonio, TENE Billy, SANDEU Marcel, MELACHIO Trésor, SIMO Huguette, DJUICY Delya**, pour les conseils et les orientations apportés tout au long de ce travail ;

- Mme **WONDJI Murielle**, avec qui j'ai réalisé ma première extraction d'ADN. Merci Madame pour l'initiation aux techniques de biologie moléculaire ; pour les conseils et le soutien à mon égard ;

- techniciens de laboratoire **ONANA Etienne, TCHOUPPO Mi-carême Epse MBOUENDA, TCHAPGA Williams, EBAI TERENCE, et TOTO Jean Claude** pour leurs franches collaborations ;

- M. **TAPOKO Guy Bertrand** et Mme **NGUEMENI Carine** pour leur soutien et l'accompagnement pendant ces années de dur labeur ;

- M. **DAOUDA Robert**, le "pilote de route" comme on l'appelle affectueusement, qui a toujours été disponible à me conduire sur le terrain pour la collecte d'échantillon à chaque fois où il y avait besoin ;

- camarades de laboratoire (CRID) **Drs. TCHOUAKUI Magelan, MUGENZI Léon, NAKEBANG Amen, MENZE DJANTIO Benjamin, MAFFO Claudine, NGUETE Daniel, KOUAMO Mersimine, TEDJOU Armel, Mme SANDEU Ruth, M. YOUNGANG Aurélie, BINYANG Achille, M. WILSON-BAHUN Theodel, M. FOTSO Yvan**, pour leur collaboration ;

- camarades de laboratoire de Zoologie **Dr. WANDJI Alain Christel, KAMENI Marina, FOMEKONG Judicaël, Dr. Richard ZOKO, SIMO Franklin** pour leur collaboration ;

- mon tendre grand frère, papa **FEUGANG NOUAGE Romus** sans qui je n'aurais jamais aspiré à faire cette thèse. Merci papa pour ton soutien indescriptible ;

- **ma famille et ma belle-famille** qui ont été présentes pour me soutenir et m'accompagner tout au long de ces années. Leurs encouragements et leur soutien inconditionnels ont été précieux

pour moi. Malgré mes nombreux déplacements dominicaux et nocturnes, ils ont toujours été là, supportant mes allées et venues rapides, mes incessantes visites au laboratoire et mes nombreux voyages au Cameroun pour faire progresser ma thèse. Je leur suis infiniment reconnaissante pour toute leur patience, leur amour et leur confiance indéfectibles.

Je tiens finalement à souligner que nombreuses autres personnes ont contribué à la réalisation de ces travaux de recherche. Il serait illusoire de prétendre ne pas avoir oublié quelqu'un dans ces remerciements. Par conséquent, je tiens à m'excuser par avance auprès de toutes les personnes qui n'ont pas été mentionnées ici, comme elles le méritent. Leur soutien et leur contribution ont été d'une importance capitale, et je suis profondément reconnaissante envers chacune d'entre elles.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	XXII
LISTE DES ABREVIATIONS	XXVII
LISTE DES FIGURES.....	XXVIII
LISTE DES TABLEAUX	XXX
RESUME.....	XXXI
ABSTRACT	XXXIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PALUDISME.....	6
I.1. Répartition géographique	7
I.2. Agents pathogènes du paludisme	8
I.2.1. <i>Plasmodium</i> humains	8
I.2.2. Cycle de développement de <i>Plasmodium</i>	8
I.3. Vecteurs du paludisme en Afrique	11
I.3.1. Systématique et morphologie des anophèles.....	15
I.3.2. Caractérisation morphologique des espèces du groupe <i>Anopheles funestus</i>	16
I.3.3. Bio-écologie et cycle de développement des Anophèles	16
I.4. Stratégies de lutte contre le paludisme	22
I.4.1. Lutte contre le parasite	22
I.4.2. Vaccins antipaludiques.....	23
I.4.3. La lutte contre les vecteurs.....	24
I.5. Résistance aux insecticides et mécanisme impliqués chez les vecteurs du paludisme	26
I.5.1. Définition de la résistance aux insecticides.....	26
I.5.2. Mécanismes de résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme	27
I.5.3. Impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur les traits de vie du moustique.....	33
I.6. Structure et rôle des glandes salivaires dans la capacité vectorielle des vecteurs du paludisme.....	34
I.6.1. Structure des glandes salivaires des anophèles	34
I.6.2. Rôle des glandes salivaires dans le succès du repas sanguin du moustique.....	36
I.6.3. Rôle des glandes salivaires dans l'invasion par les sporozoïtes des plasmodiums	37

CHAPITRE II : CADRE GEOGRAPHIQUE, MATERIEL ET METHODES	39
II.1. Cadre géographique.....	40
II.1.1. Description des sites de collecte des moustiques adultes	40
II.1.2. Localités et réalisation des enquêtes parasitologiques.....	41
II.2. Matériel et méthodes.....	42
II.2.1. Evaluation de l'impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires (sialome) chez les populations sauvages d' <i>Anopheles funestus</i>	42
II.2.2. Evaluation de l'impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur le déroulement de prise de repas sanguin chez <i>Anopheles funestus</i>	50
II.2.3. Conséquences de la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthriinoïdes sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez <i>Anopheles funestus</i>	57
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	64
III.1. Résultats	65
III.1.1. Impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires (sialome) chez les populations sauvages d' <i>Anopheles funestus</i>	65
III.1.2. Impact de la modulation de la composition du sialome par la résistance aux insecticides sur le déroulement du repas sanguin chez <i>Anopheles funestus</i>	74
III.2.3. Conséquences de la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthriinoïdes sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez <i>An. funestus</i>	88
III.2. Discussion	92
CONCLUSION RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	107
ANNEXES.....	124

LISTE DES ABREVIATIONS

Symbole	Définition
119F/F-GSTe2	Individu de génotype homozygote résistant (mutant) pour la mutation L119F
AA-CYP6P9a/b	Double insertion AA dans la région située en avant du locus CYP6P9a/b et associée à la résistance aux pyréthrinoïdes
AA-CYP6P9a/b-RR	Individu de génotype homozygote résistant (muté) pour la double insertion AA-CYP6P9a/b
AA-CYP6P9a/b-SS	Individu de génotype homozygote sensible (sauvage) pour la double insertion AA-CYP6P9a/b
CRID	Centre for Research in Infectious Diseases
DDT	Dichlorodiphényltrichloéthane
DNTP	Désoxyribonucléotide Triphosphate
DO	Densité Optique
FC	Fold Change
FRD	False discovery rate
GABA	Acide GammaAminoButyrique
GSTe2	Glutathion-S-tranfêrases epsilon 2
GSTs	Glutathion-S-Tranfêrases
HiCN	Cyanure d'hémoglobine
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kdr	Knockdown resistance
L/L119-GSTe2	Individu de génotype homozygote sensible (sauvage) pour la mutation L119F
L119F-GSTe2	Changement de la leucine en phénylalanine à la position 119 du locus <i>GSTe2</i> et associée à la résistance au DDT/pyréthrinoïdes
LAV	Lutte AntiVectorielle
MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
MILDA	Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action
OCEAC	Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Central
OVM	Ovale/Vivax/Malariae
Pb	Paire de bases
PBO	Pipéronyl Butoxide
PID	Pulvérisation intra-domiciliaire
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Situation du paludisme dans le monde.	7
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Plasmodium</i> chez l'homme et chez l'anophèle	11
Figure 3 : Distribution des vecteurs majeurs et vecteurs secondaires du paludisme dans le monde.....	12
Figure 4 : <i>Anopheles gambiae</i> et <i>Anopheles funestus</i> lors d'une prise de repas sanguin	12
Figure 5 : Œuf d'anophèle.....	17
Figure 6: Larves d'anophèle	17
Figure 7 : Nymphes d'anophèle.....	18
Figure 8: Cycle biologique des anophèles.....	20
Figure 9: Gîtes typiques de <i>Anopheles funestus</i> s.s.....	22
Figure 10: Contribution de différentes interventions dans la lutte contre le paludisme de 2000-2015.....	26
Figure 11: Photo des glandes salivaires femelle d' <i>Anopheles funestus</i>	35
Figure 12 : Localisation des sites de l'étude.	42
Figure 13 : Dispositif de collecte des moustiques adultes à l'intérieur des maisons et d'identification des moustiques adultes au laboratoire.	43
Figure 14 : Illustration de la technique de ponte forcée des anophèles.....	44
Figure 15: Procédure de sélection des souches d' <i>Anopheles funestus</i> résistants et de moustiques sensibles aux pyréthrinoïdes.	46
Figure 16 : Dispositif de dissection pour l'extraction des glandes salivaires d' <i>Anopheles funestus</i>	47
Figure 17 : Bioanalyzer Agilent 2100 permettant de visualiser les échantillons d'ARN total.....	48
Figure 18 : Etapes du séquençage des banques d'ADN complémentaires.	50
Figure 19 : Dispositif de pesée et d'engorgement des moustiques.	52
Figure 20 : Dispositif des infections expérimentales des moustiques par les souches sauvages de <i>Plasmodium falciparum</i>	60
Figure 21 : Illustration d'un résultat de la détection des moustiques infectés par les <i>Plasmodium</i> par la technique PCR TaqMan.	61
Figure 22 : Bandes révélées suite à la migration sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du gène ITS2..	65

Figure 23 : Courbes montrant l'intégrité de l'ARN dans les échantillons d' <i>Anopheles funestus</i> après des analyses de contrôle qualité.	66
Figure 24 : Effet de la résistance métabolique sur le poids du moustique <i>Anopheles funestus</i>	76
Figure 25 : Association entre les marqueurs de résistance et la capacité d' <i>Anopheles funestus</i> à prendre un repas de sang.	80
Figure 26 : Taille du repas sanguin en fonction des génotypes de la mutation <i>L119F GSTe2</i> chez le moustique <i>Anopheles funestus</i>	82
Figure 27 : Taille du repas sanguin en fonction des génotypes de la mutation <i>CYP6P9a</i> chez le moustique <i>Anopheles funestus</i>	83
Figure 28: Taille du repas sanguin en fonction des génotypes de la mutation <i>CYP6P9b</i> chez le moustique <i>Anopheles funestus</i>	84
Figure 29 : Profil d'expression des gènes salivaires des familles AAPP et D7 chez <i>Anopheles funestus</i> en fonction du génotype de la mutation <i>CYP6P9a-R</i>	87
Figure 30 : Intensité de l'infection <i>Plasmodium falciparum</i> en fonction du génotype de la mutation <i>L119F-GSTe2</i> chez <i>Anopheles funestus</i>	89
Figure 31 : Niveau d'expression des gènes codant pour les protéines réceptrices des sporozoïtes dans les glandes salivaires en fonction du génotype de la mutation <i>L119F</i> chez <i>Anopheles funestus</i>	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Nombre de séquences générées lors du séquençage de l'ADN Complémentaire des différentes souches de moustiques	67
Tableau II : Nombre de gènes annotés différemment exprimés entre les souches de moustiques Résistants, sensibles, ou témoins	68
Tableau III : Nombre de gènes salivaires annotés différemment exprimés entre souches de moustiques « résistants » et des « sensibles »	70
Tableau IV : Nombre de gènes salivaires annotés différemment exprimés entre souches de moustiques « Témoins » et souches « Sensibles »	72
Tableau V : Nombre de gènes salivaires annotés différemment exprimés entre souches de moustiques « Résistants » et souches « Témoins »	73
Tableau VI : Influence des mutations <i>L119F-GSTe2</i> et <i>CYP6P9a/b-R</i> sur le poids du moustique <i>Anopheles funestus</i>	77
Tableau VII : Influence des mutations <i>L119F-GSTe2</i> et <i>CYP6P9a/b-R</i> sur la capacité du moustique <i>Anopheles funestus</i> à prendre un repas sanguin complet.....	80
Tableau VIII : Tableau représentant les temps de sondage et les durées d'alimentation en fonction des génotypes de la mutation <i>L119F-GSTe2</i> chez <i>Anopheles funestus</i> s.s.	81
Tableau IX : Distribution des génotypes de la mutation <i>L119F-GSTe2</i>	82
Tableau X : Effet combiné des mutations <i>CYP6P9a-R</i> et <i>CYP6P9b-R</i> sur la taille du repas de sang pris par le moustique <i>Anopheles funestus</i>	86
Tableau XI : Répartition des génotypes de la mutation <i>L119F</i> du gène <i>GSTe2</i> chez des individus d' <i>Anopheles funestus</i> après infection expérimentale par <i>Plasmodium falciparum</i>	89

RESUME

Au cours des dernières décennies, la mortalité liée au paludisme a diminué de façon considérable en Afrique subsaharienne. Malheureusement, les efforts visant l'élimination du paludisme sont mis en péril par le développement des formes de résistance aux insecticides chez les principaux vecteurs. En effet, l'utilisation généralisée de Pulvérisations Intra-Domiciliaires (PID) ou de Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'Action (MILDA), constitue le seul moyen de prévention de masse utilisé en Afrique contre le paludisme. Toutefois, bien que la résistance aux insecticides confère un avantage sélectif aux moustiques sous la pression de l'insecticide, elle peut également entraîner des coûts génétiques ayant un impact sur les traits de vie des moustiques. Plus récemment, des études en laboratoire ont révélé que la résistance aux insecticides pourrait également modifier la composition des protéines salivaires chez les moustiques du genre *Anopheles*. Ces protéines salivaires jouent un rôle crucial dans le succès de la prise de repas sanguin par les moustiques et dans la transmission du parasite du paludisme en contrecarrant la réaction de l'hôte. Ainsi, des modifications du contenu des glandes salivaires liées par la résistance aux insecticides, pourraient avoir un impact sur la prise du repas sanguin par le moustique, ainsi que sur sa capacité à transmettre les parasites à l'homme. Cependant, malgré l'importance de ce rôle des protéines salivaires et bien que l'invasion des glandes salivaires constitue une étape essentielle du cycle de vie des *Plasmodium* chez les moustiques, l'impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires et ses conséquences sur la capacité vectorielle, restent très peu explorés chez les populations naturelles d'*Anopheles funestus*.

L'étude de l'impact de la résistance aux pyréthrinoïdes sur la composition des protéines salivaires du moustique *An. funestus*, basée sur une analyse transcriptomique, a révélé l'existence de 13588 gènes, dont 5233 ont pu être annotés. Parmi ces gènes annotés, nous avons observé que 998 étaient différemment exprimés entre les moustiques de souches « Résistantes » et les « Sensibles », avec 377 gènes surexprimés et 621 gènes sous exprimés. De même, 979 gènes présentaient un niveau d'expression différent entre les souches « Témoins » et les souches « Sensibles », avec 472 gènes surexprimés et 507 sous exprimés, tandis que 1040 gènes différaient entre les souches « Résistantes » et les « Témoins », avec 651 gènes surexprimés et 389 sous exprimés. L'analyse de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la prise de repas sanguin du moustique et/ou l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires des souches d'*An. funestus* aussi bien les « Résistantes » que les « Sensibles » a permis d'identifier un total de 07 gènes différemment exprimés entre les souches « Témoins » et les souches « Sensibles » (03 surexprimés et 04 sous-exprimés), 06 gènes étaient

différemment exprimés entre Témoins » et « Sensibles » (03 sous-exprimés et 03 surexprimés) et enfin 06 gènes différemment exprimés entre les souches « Résistants » et «Témoins » (01 sous-exprimé et 05 surexprimés). L'évaluation de l'impact de la résistance aux pyréthriinoïdes sur la capacité du moustique à prendre un repas sanguin n'a montré aucune influence du mécanisme dû à la mutation *L119F-GSTe2*. De même, pour ce mécanisme, aucune influence de la résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. funestus* n'a été observée sur la durée du sondage et de l'alimentation. Cependant, il a été observé que la résistance liée à la mutation *CYP6P9a/b* était associée significativement à une probabilité plus élevée de prendre le repas sanguin pour le moustique résistant que le moustique sensible. L'évaluation des conséquences des mécanismes associée de la résistance aux pyréthriinoïdes sur la taille du repas sanguin pris chez le moustique *An. funestus* a montré que la mutation *L119F-GSTe2* n'impacterait pas la quantité de sang absorbée par un moustique lors d'un repas sur l'homme, alors que pour la surexpression des gènes *CYP6P9a/b* a été observée associée à un repas sanguin de taille plus élevée chez les moustiques portant l'allèle de résistance que le moustique portant l'allèle sensible. L'investigation sur des conséquences éventuelles que la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthriinoïdes pourrait avoir sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez *An. funestus* a montré que les moustiques hétérozygotes *L119F-RS* semblaient plus infectés que les homozygotes sensibles *L119F-SS*. Cette différence n'était cependant pas significative. Toutefois, la taille trop faible de l'échantillon de moustiques portant le génotype homozygote résistant et infecté à la fois par *Plasmodium falciparum* n'a pas permis de tirer une conclusion pertinente et claire sur comment la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux insecticides pourrait influencer l'installation des sporozoïtes du *Plasmodium* dans les glandes salivaires du moustique *An. funestus*. Au terme de notre travail, les différents résultats obtenus, bien qu'ils n'apportent pas de preuves concluantes sur l'impact de la modulation des protéines salivaires sur la capacité vectorielle d'*An. funestus* en présence de résistance aux insecticides, indiquent que les mutations *L119F-GSTe2* et *CYP6P9a/b* pourraient augmenter la probabilité de réussite du repas sanguin et l'intensité de l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires, ce qui pourrait affecter la capacité de ce vecteur à transmettre les parasites du paludisme à l'homme. Par conséquent, la mise en œuvre de stratégies de gestion basées sur l'utilisation de nouveaux insecticides et de MILDA imprégnée d'autres insecticides pourrait contribuer à lutter contre la résistance aux pyréthriinoïdes sur le terrain et maintenir l'efficacité des mesures de lutte contre le paludisme.

ABSTRACT

In recent decades, malaria-related mortality has fallen considerably in sub-Saharan Africa. Unfortunately, efforts to eliminate malaria are jeopardised by insecticide resistance in the main vectors. Indeed, the widespread use of indoor residual spraying (IRS) or long-acting insecticide-treated nets (LLINs) is the only means of mass prevention against malaria. However, although insecticide resistance confers a selective advantage on mosquitoes under insecticide pressure, it can also result in genetic costs that impact on the life traits, reproductive capacity and physiology of mosquitoes. More recently, laboratory studies have revealed that insecticide resistance may also alter the composition of salivary proteins in *Anopheles* mosquitoes. These salivary proteins play a crucial role in the mosquito's success in taking a blood meal and in the transmission of the malaria parasite by counteracting the host's reaction. Thus, changes in salivary gland content caused by resistance to insecticides could have an impact on the mosquito's blood meal intake, as well as on its ability to transmit parasites to humans. However, despite the importance of the role played by salivary proteins and the fact that invasion of the salivary glands is an essential stage in the life cycle of *Plasmodium* in mosquitoes, the impact of insecticide resistance on the composition of salivary proteins (sialome) and its consequences for vectorial capacity remain largely unexplored in natural populations of *Anopheles funestus*.

The study of the impact of pyrethroid resistance on the composition of salivary proteins in the *An. funestus* mosquito, based on transcriptomic analysis, revealed the existence of 13588 genes, of which 5233 could be annotated. Among these annotated genes, we observed that 998 genes were differentially expressed between 'Resistant' and 'Susceptible' mosquitoes, with 377 genes over-expressed and 621 genes under-expressed. Similarly, 979 genes were differentially expressed between 'Control' and 'Susceptible' strains, with 472 genes over-expressed and 507 genes under-expressed, while 1040 genes differed between 'Resistant' and 'Control' strains, with 651 genes over-expressed and 389 genes under-expressed. Analysis of the expression of genes encoding proteins involved in mosquito blood meal intake and/or sporozoite invasion into the salivary glands of both 'Resistant' and 'Susceptible' strains of *An. funestus* strains, both 'Resistant' and 'Susceptible', identified a total of 07 genes differentially expressed between 'Control' and 'Susceptible' strains (03 overexpressed and 04 underexpressed), 06 genes were differentially expressed between 'Control' and 'Susceptible' strains (03 underexpressed and 03 overexpressed) and finally 06 genes were differentially expressed between 'Resistant' and 'Control' strains (01 underexpressed and 05 overexpressed). Evaluation of the impact of pyrethroid resistance on the ability of the mosquito to take a blood meal showed no influence

of the mechanism due to the *L119F-GSTe2* mutation. Similarly, for this mechanism, no influence of pyrethroid resistance in *An. funestus* was observed on the duration of probing and feeding. However, it was observed that resistance linked to the *CYP6P9a/b* mutation was significantly associated with a higher probability of taking the blood meal for the resistant mosquito than for the susceptible mosquito. Evaluation of the consequences of the mechanisms associated with pyrethroid resistance on the size of the blood meal taken in the *An. funestus* mosquito showed that the *L119F-GSTe2* mutation would not impact the quantity of blood absorbed by a mosquito during a meal on humans, whereas overexpression of the *CYP6P9a/b* genes was observed to be associated with a larger blood meal in mosquitoes carrying the resistance allele than mosquitoes carrying the susceptible allele. Investigation into the possible consequences that modulation of salivary protein expression by pyrethroid resistance might have on the invasion of sporozoites into the salivary glands of *An. funestus* showed that mosquitoes heterozygous for *L119F-RS* appeared to be more infected than susceptible homozygotes for *L119F-SS*. However, this difference was not significant. However, the small sample size of mosquitoes carrying the homozygous resistant genotype and infected with *Plasmodium falciparum* did not allow us to draw any relevant and clear conclusion on how the modulation of salivary protein expression by insecticide resistance could influence the establishment of *Plasmodium* sporozoites in the salivary glands of the *An. funestus* mosquito. At the end of our work, the various results obtained, although they do not provide conclusive evidence as to the impact of the modulation of salivary proteins on the vectorial capacity of *An. funestus* vectorial capacity in the presence of insecticide resistance, indicate that the *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a/b* mutations could increase the probability of a successful blood meal and the intensity of sporozoite invasion in the salivary glands, which could affect the capacity of this vector to transmit malaria parasites to humans. Consequently, the implementation of management strategies based on the use of new insecticides and LLINs impregnated with other insecticides could help to combat pyrethroid resistance in the field and maintain the effectiveness of malaria control measures.

Keywords: malaria, insecticide resistance, sialome, *Plasmodium*, *L119F-GSTe2*, *CYP6P9a/b*, *Anopheles funestus*

INTRODUCTION

Malgré la réduction significative du nombre de cas enregistrés au cours des dernières décennies, le paludisme demeure un problème majeur de santé publique en Afrique (WHO, 2022). La lutte contre cette maladie repose principalement sur l'utilisation des stratégies de lutte antivectorielle (WHO, 2022). Le paludisme est une maladie infectieuse, causé par un parasite du genre *Plasmodium* (Laveran, 1880) transmis à l'homme par une piqûre infectée d'un moustique femelle du genre *Anopheles* (Meigen, 1868). Ce moustique appartient à l'embranchement des Arthropoda, la classe des Insecta, la sous-classe des Pterygota, l'ordre des Diptera, le sous-ordre des Nematocera, la famille des Culicidae, sous-famille des Anophelinae (Knight & Stone, 1977). Dans le monde, on dénombre environ 528 espèces d'Anophèles, dont 41 transmettent efficacement le paludisme à l'homme (Harbach, 2011; Sinka *et al.*, 2012). Cependant leur distribution et leurs capacités vectorielles varient selon les régions géographiques. La faune anophélienne d'Afrique est estimée à 160 espèces, mais seules 20 d'entre elles sont de bons vecteurs de *Plasmodium* pour l'homme (Mouchet *et al.*, 2004). Au Cameroun, six espèces, à savoir *Anopheles gambiae* (Giles, 1902), *Anopheles coluzzii* (Coetzee & Wilkerson 2013), *Anopheles arabiensis* (Patton, 1905), *Anopheles funestus* s.s. (Giles, 1900), *Anopheles nili* (Theobald, 1904) et *Anopheles moucheti* (Evans, 1925) sont considérées comme vecteurs majeurs (Coetzee *et al.*, 2012). *Anopheles funestus* s.s. qui fait l'objet de cette étude est une espèce extrêmement anthropophile qui joue un rôle important dans la transmission du paludisme (Lwetoijera *et al.*, 2014).

La transmission par les moustiques anophèles du parasite responsable du paludisme, peut se produire lorsque ces derniers prennent leur repas sanguin sur l'homme infecté. Le repas sanguin sur un vertébré est d'une importance capitale pour les moustiques femelles, car il leur fournit les protéines indispensables pour la maturation de leurs œufs (Ribeiro, 1995). Le succès de ce repas sanguin dépend profondément des propriétés pharmacologiques de la salive du moustique (Ribeiro, 1987). En effet, l'introduction de la trompe dans la peau de l'hôte provoque une réaction de défense chez l'hôte pouvant ainsi compromettre la prise de sang par le moustique. La salive des anophèles comme celle des autres arthropodes hématophages, facilite la prise de sang en neutralisant la réponse de l'hôte grâce aux propriétés pharmacologique et anti-hémostatiques (anti-agrégation plaquettaire, anticoagulantes et/ou vasodilatatrices) de certaines molécules bioactives qu'elle contient (Ribeiro, 2000). De plus, il a été démontré que ces protéines jouent un rôle de récepteurs pour les espèces de *Plasmodium* au stade de sporozoïtes lors de leur invasion dans les glandes salivaires des moustiques (Donovan *et al.*, 2007; Schneider & Higgs, 2008).

La composition des protéines dans la salive des arthropodes et leur niveau d'expression peuvent être influencés par des facteurs, tels que le nombre de repas sanguin pris, l'âge et l'état d'infection des moustiques (Choumet *et al.*, 2007). Des études antérieures ont montré que la résistance aux insecticides pourrait également influencer la composition et l'expression des protéines salivaires chez les moustiques (Cornelie *et al.*, 2014; Djegbe *et al.*, 2011 ; Riveron *et al.*, 2014a). Parmi les protéines dont l'expression est influencée, l'on retrouve celles qui sont impliquées dans le déroulement du repas sanguin et/ou dans l'invasion des sporozoïtes du *Plasmodium* dans les glandes salivaires du moustique (Cornelie *et al.*, 2014).

La résistance des vecteurs aux insecticides est rapportée comme l'une des principales causes de la persistance du paludisme en Afrique subsaharienne (WHO, 2019). Elle résulte notamment de l'utilisation massive d'insecticide en santé publique depuis le début des années 2000 à travers les stratégies telles que les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) et les Pulvérisations Intra-Domiciliaire d'insecticides (PID) (Bhatt *et al.*, 2015a). S'il est vrai que les mécanismes de résistance procurent un avantage sélectif aux vecteurs, sous la pression insecticide, ils peuvent toutefois être associés à un coût génétique important qui affecte significativement la biologie et la physiologie des moustiques (Raymond *et al.*, 2001). En effet, de nombreuses études ont montré que dans les populations d'insectes porteurs d'allèles de résistance aux insecticides, les traits de vie, la capacité de reproduction et la physiologie seraient fortement affectés en comparaison avec les souches non infectés (Djogbenou *et al.*, 2008; Lenormand *et al.*, 1999). Cependant, malgré la forte expansion du phénomène de résistance aux insecticides, son impact sur de nombreux aspects de biologie et la physiologie des anophèles et les conséquences éventuelles sur la transmission du paludisme restent très peu explorés. C'est le cas notamment de l'impact que ce phénomène pourrait avoir sur la composition du contenu des glandes salivaires (sialome). En effet, à ce jour, à l'exception des travaux de Cornelie *et al.* (2012) sur la souche de laboratoire de *Anopheles gambiae* et ceux de Vijay *et al.* (2015) sur le vecteur *Anopheles stephensi*, très peu d'informations sont disponibles sur l'impact de la résistance sur la composition du contenu des glandes salivaires chez les vecteurs du paludisme et plus particulièrement chez les souches sauvages d'anophèles de l'Afrique subsaharienne région la plus touchée par le paludisme. Plus encore, aucune donnée n'est disponible sur les conséquences que la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux insecticides chez les anophèles pourrait avoir sur leur capacité à transmettre les espèces de *Plasmodium* à l'homme. Ceci reste d'autant plus préoccupant au regard du rôle important des protéines salivaires dans le déroulement du repas sanguin du moustique, et lorsqu'on sait que l'invasion des glandes salivaires est une étape importante de

cycle des *Plasmodium* avant qu'ils ne soient transmis à l'homme. C'est dans l'optique d'apporter des informations sur cet important aspect, que la présente thèse a été réalisée.

➤ **Questions de recherche**

Les questions de recherche qui se dégagent sont les suivantes :

- les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides influencent-ils l'expression des protéines salivaires dans les populations naturelles d'*Anopheles funestus*?
- la modulation de l'expression des protéines salivaires par les mécanismes de résistances aux insecticides peut-elle avoir un impact sur la capacité vectorielle du moustique *An. funestus*?

➤ **Hypothèses de recherche**

A la suite de ces questions de recherche, il ressort une hypothèse générale de recherche :

« Il existe une expression différentielle des protéines salivaires entre les individus sensibles et individus résistants aux pyréthrinoïdes au sein des populations naturelles d'*Anopheles funestus* affectant la capacité vectorielle de ces derniers ».

➤ **Objectifs**

L'objectif général de ce travail est d'étudier l'impact qu'auraient les mécanismes de résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires chez le moustique *Anopheles funestus* s.s. et d'en évaluer les conséquences éventuelles sur le déroulement du repas sanguin et la capacité vectorielle chez ce vecteur majeur du paludisme en Afrique.

Plus spécifiquement, il s'agit d'évaluer le (s) :

- l'impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires (sialome) dans les populations sauvages d'*Anopheles funestus*
- l'impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur le déroulement de prise de repas sanguin chez *Anopheles funestus*
- conséquences de la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez *Anopheles funestus*.

Le présent travail s'organise autour de trois chapitres, hormis l'introduction générale, la conclusion et les perspectives de recherche. Le premier chapitre rassemble les informations nécessaires pour situer la problématique du sujet à traiter. Le deuxième chapitre présente les

sites d'étude et les méthodes utilisées. Le troisième chapitre est consacré à une présentation des résultats obtenus suivie de leur discussion.

CHAPITRE I :
GENERALITES SUR LE
PALUDISME

I.1. Répartition géographique

Le paludisme, maladie parasitaire la plus répandue dans le monde (fig. 1) est due à la présence dans le sang de l'homme de protozoaires hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Ces parasites sont transmis par des moustiques femelles infectés, du genre *Anopheles* au cours de leur repas sanguin sur l'homme. La prévalence parasitaire à l'échelle mondiale a été estimée à 249 millions de cas en 2022 contre 247 millions de cas en 2021 et 245 millions de cas recensés en 2020 dans 84 pays endémiques (WHO, 2023). Plus de 94% des cas ont été enregistrés dans la région Afrique selon l'OMS.

Au niveau mondial, le nombre de décès dus au paludisme a légèrement baissé entre les années 2021 et 2022, passant de 619 000 en 2021 à 608 000 en 2022 (WHO, 2022).

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 (PNLP, 2022). Les statistiques sanitaires révèlent que cette maladie représentait en 2021 29,6% de consultations et 70% des hospitalisations. En 2021, Plus de 3 millions de cas de paludisme ont été enregistrés contre 2481 décès dans les formations sanitaires (PNLP, 2023).

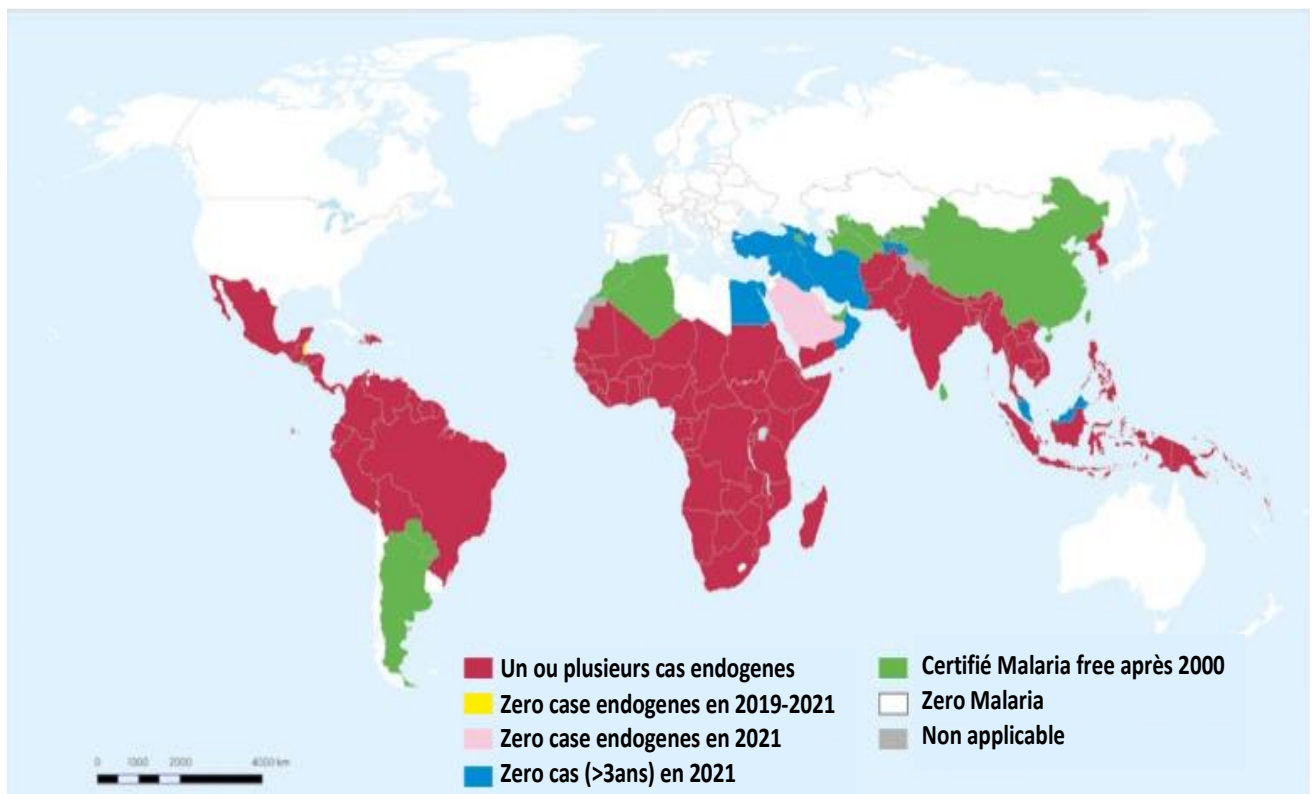


Figure 1 : Situation du paludisme dans le monde (OMS, 2023).

I.2. Agents pathogènes du paludisme

I.2.1. *Plasmodium* humains

Les agents étiologiques du paludisme sont des protozoaires de l'embranchement des Apicomplexa (protozoaires à appareil apical complexe), de la classe des Sporozoa, de l'ordre des Haemosporidia, de la famille des Plasmodiidae et appartiennent au genre *Plasmodium*. Sur plus d'une centaine d'espèces du genre *Plasmodium* parasitant les batraciens, les reptiles, les oiseaux ou les mammifères, seules cinq espèces peuvent infecter l'Homme. Il s'agit notamment de :

- *Plasmodium falciparum* (Welch, 1887) qui est responsable de la fièvre tierce maligne. C'est l'espèce la plus fréquente en Afrique sub-saharienne où 80 à 95% des cas de la maladie lui sont associés. Elle est aussi la plus redoutable car pouvant être à l'origine des formes graves, voire mortelles en l'absence de traitement approprié (WHO, 2000).
- *Plasmodium vivax* (Grassi, 1890) qui est responsable de la fièvre tierce bénigne. Elle est aussi très répandue en Asie, Océanie, Amérique du Sud et Amérique Centrale. En Afrique pendant de nombreuses années, l'espèce n'était pas présente, mais depuis quelques années sa présence est rapportée dans plusieurs pays notamment au Cameroun (Dongho *et al.*, 2021).
- *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) est l'agent aussi d'une fièvre tierce bénigne. Elle est très proche de *P. vivax* avec laquelle elle a été très longtemps confondue. Elle évolue à long terme et est donc considérée comme peu pathogène. Elle est rare et se rencontre presque exclusivement en Afrique de l'Ouest.
- *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881) est responsable d'une fièvre quarte et de troubles rénaux. Elle est responsable d'environ 1% des cas de paludisme seulement. Elle se rencontre surtout en Amérique du Sud où elle est très fréquente dans certaines tribus d'Amérindiens. Cette espèce est également présente au Cameroun et a été responsable de 1% de cas de paludisme (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019).
- *Plasmodium knowlesi* proche génétiquement de *P. vivax*, et microscopiquement de *P. malariae*. Il a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie (mais était connu antérieurement chez le singe) (Cox-Singh *et al.*, 2008).

I.2.2. Cycle de développement de *Plasmodium*

Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement du cycle des plasmodies (fig.2) : un vertébré où se déroule la multiplication asexuée ou schizogonie et un moustique du

genre *Anopheles* (pour les plasmodies infectant l'Homme), lieu de la multiplication sexuée ou sporogonie.

I.2.2.1. Schizogonie chez l'Homme

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infesté injecte avec sa salive, au niveau de la peau de l'Homme, des sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires. Il est estimé qu'un anophèle infecté peut injecter à son hôte 1 à 1000 sporozoïtes (120 en moyenne) au moment d'une piqûre (Bejon *et al.*, 2005). Ces éléments unicellulaires filiformes, à travers la circulation générale, se répartissent rapidement dans tout l'organisme puis pénètrent activement et indifféremment dans différents types cellulaires. Certains sporozoïtes vont cependant pénétrer dans des vaisseaux lymphatiques où ils seront dégradés par le système immunitaire de l'homme (Sturm *et al.*, 2006). Seuls ceux ayant atteint le foie et franchi une dernière barrière constituée par les cellules de Kupffer pourront poursuivre leur cycle dans les hépatocytes (Ishino *et al.*, 2004).

- phase hépatique

Dans les hépatocytes, les sporozoïtes s'arrondissent et se transforment en trophozoïtes. Certains trophozoïtes, par multiplication et développement, évoluent immédiatement jusqu'à maturité pour donner des schizontes. Pour certaines espèces comme *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* on a des trophozoïtes qui vont rester sous forme uninucléé et à l'état de dormance appelés hypnozoïtes (Greenwood *et al.*, 2008). A maturité, les schizontes éclatent, libérant des mérozoïtes, nouvelles formes uninucléées qui initieront la phase érythrocytaire en envahissant les globules rouges.

Cette phase hépatique constitue la partie cliniquement silencieuse et asymptomatique du cycle. Elle correspond, en effet, à une période d'incubation dont la durée (5 à 15 jours) et la fréquence (périodicité) sont fonction de l'espèce plasmodiale. La durée de cette phase varie de 5-6 jours chez *P. falciparum* à 10-14 jours, ou occasionnellement plus, chez *P. vivax* (Suwanarusk *et al.*, 2004).

- phase érythrocytaire

Les mérozoïtes, libérés dans le sang suite à la rupture de l'hépatocyte, envahissent les globules rouges, selon un processus en plusieurs étapes, s'y déplacent par des mouvements amiboïdes vers le centre où ils se transforment en trophozoïtes (Carter & Miller, 1979). Les trophozoïtes vont ainsi croître en dégradant l'hémoglobine et évoluer en schizontes dans lequel s'accumule l'hémozoïne (pigment malarique, produit de dégradation de l'hémoglobine qui

remplit progressivement la vacuole nutritive parasitaire). De nombreuses divisions nucléaires se produisent dans les schizontes aboutissant ainsi à la formation de nouveaux mérozoïtes qui sont libérés lors de l'éclatement des schizontes matures (corps rosacés). Chaque mérozoïte peut alors infester une nouvelle hématie et ainsi recommencer le cycle intra-érythrocytaire. La lyse des hématies parasitées par les schizontes mûrs est responsable des accès fébriles, symptômes cliniques caractéristiques du paludisme. Après plusieurs cycles intra-érythrocytaires, une fraction des mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges et se différencient en gamétocytes mâles et femelles qui, lorsqu'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin, permettent la poursuite du cycle du parasite chez le moustique (Ghosh *et al.*, 2000). La distribution des stades érythrocytaires dans le sang n'est pas toujours homogène (White *et al.*, 1992) et dans certaines circonstances, certains stades parasitaires disparaissent du sang périphérique parce qu'ils sont retenus (ou « séquestrés ») dans les capillaires profonds de différents tissus ou organes profonds (cerveau, cœur, rate, intestin, moelle osseuse et placenta).

Une caractéristique marquante du cycle érythrocytaire est le fait que les parasites ont tendance à se développer de façon synchrone, les parasites examinés sur un frottis sanguin sont fréquemment tous au même stade de développement et les symptômes cliniques (en particulier la fièvre) ont tendance à survenir à intervalles réguliers. Cette synchronicité du cycle biologique de *Plasmodium* serait en partie déterminée par le rythme circadien de l'hôte.

I.2.2.2. Sporogonie chez le moustique femelle

En prenant son repas sanguin sur un individu infecté par les plasmodiums, le moustique absorbe les différents stades du parasite (sexués et asexués) (Robert *et al.*, 1996). Mais seuls les stades sexués (gamétocytes mâles et femelles) poursuivront leur développement, les autres étant digérés au niveau de l'estomac de l'insecte (Frischknecht *et al.*, 2004). Rapidement, par expulsion des corpuscules chromatiniens, le gamétocyte femelle se transforme en macrogamète, tandis que la microgamétogénèse mâle ou exflagellation qui sont plus lente vont donner naissance à 8 microgamètes qui à leur tour vont rapidement à la rencontre du macrogamète (Rickman *et al.*, 1990). La fécondation donne naissance à un ookinète, œuf mobile qui traverse la paroi stomacale du moustique et migre vers la face externe de l'épithélium intestinal où il s'enkyste pour former l'oocyste mature dans lequel s'individualisent les sporozoïtes (Robert *et al.*, 1996). Libérés à la suite de l'éclatement de l'oocyste, ces derniers vont, via l'hémolymphe, gagner par prédilection les glandes salivaires (Davies, 1974) de l'insecte pour être inoculé à l'homme lors d'une piqûre infectante ultérieure du vecteur.

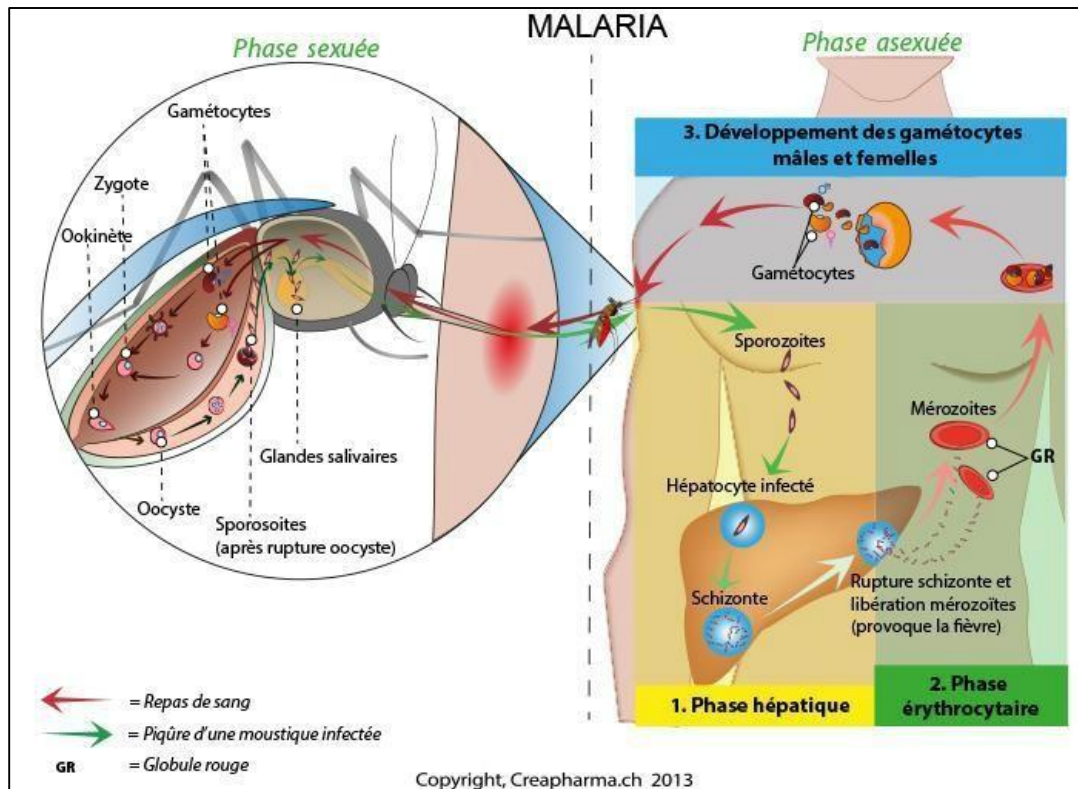


Figure 2 : Cycle de développement de *Plasmodium* chez l'homme et chez l'anophèle (Creapharma.ch, 2013).

I.3. Vecteurs du paludisme en Afrique

Au niveau taxonomique, les vecteurs des *Plasmodium* sont des insectes Diptères appartenant à la famille des Culicidae et à la sous-famille des Anophelinae. On dénombre environ 450 espèces d'anophèles dans le monde, dont une cinquantaine sont capables de transmettre des plasmodies à l'Homme (Mouchet, 2004). Plus précisément, 20 espèces assurent l'essentiel de la transmission dans le monde. Les autres ne participent pas à la transmission soit parce qu'elles piquent de préférence les animaux, soit parce qu'elles sont réfractaires à une ou plusieurs espèces (ou souches) de *Plasmodium*. Chaque espèce d'anophèle occupe une aire géographique particulière (fig.3). Cependant, on ne trouve aucune espèce d'anophèle à une altitude supérieure à 2000 m.

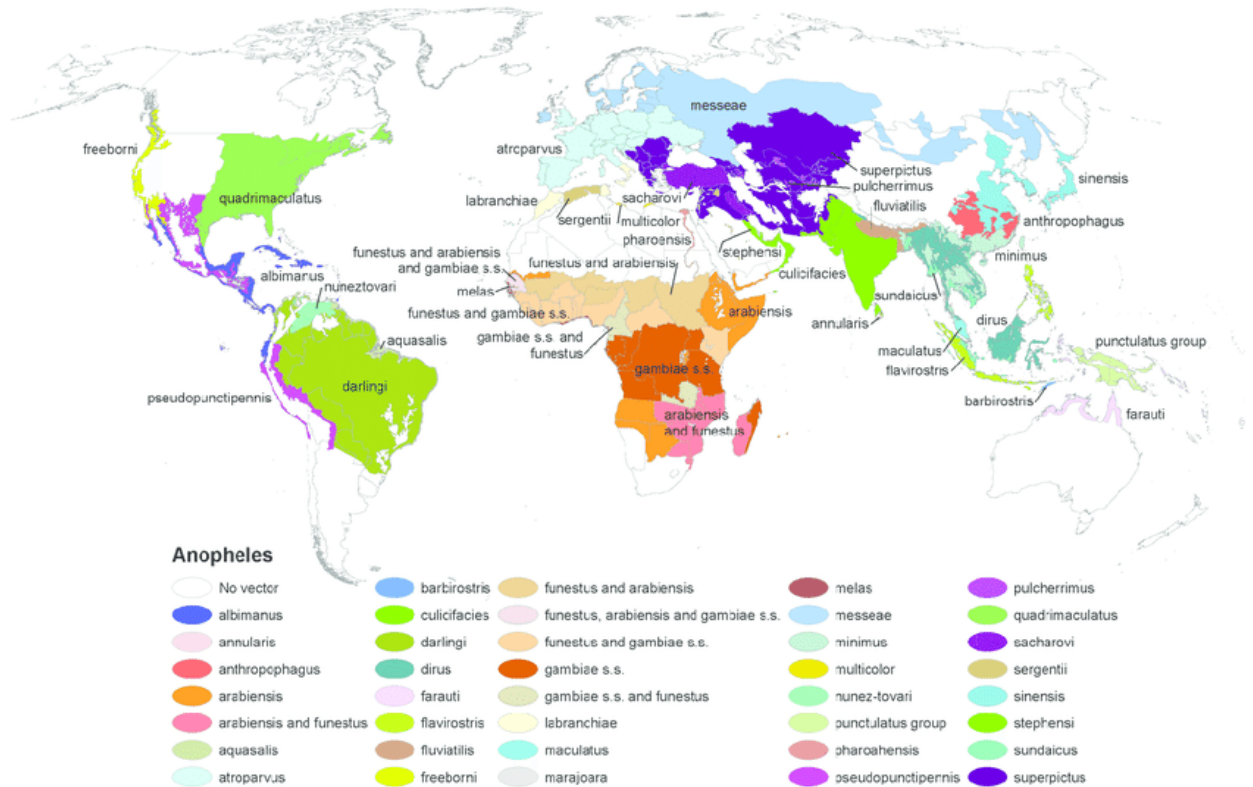


Figure 3 : Distribution des vecteurs majeurs et vecteurs secondaires du paludisme dans le monde (Kiszewski *et al.*, 2004).

En Afrique tropicale, il y a six vecteurs majeurs à savoir *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. nili*, *An. moucheti* et *An. funestus* qui assurent à elles seules 95% de la transmission alors que les 5% restant sont assurées par les vecteurs dits secondaires à savoir *An. paludis*, *An. ziemmani*, *An. rufipes*, etc...). Les espèces *An. gambiae* s.l. et *An. funestus* s.l. (fig. 4) sont cependant les plus répandues sur l'ensemble du continent africain et sont par conséquent, les plus impliquées dans la transmission (Mouchet, 2004).



Figure 4 : *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* lors d'une prise de repas sanguin (<http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/>).

Le nom *Anopheles gambiae* regroupe un complexe d'espèces (Davidson, 1962) semblables morphologiquement mais qui se distinguent tant par leurs éthologies que par leurs structures génétiques. Il est le plus étudié au monde, grâce aux travaux pionniers de Davidson, (1962), White, (1974) et Coluzzi *et al.* (1979). Ce complexe d'espèces compte en son sein deux des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique à savoir : *An. gambiae* s.s. et *An. coluzzii*. Il est cependant composé de neuf espèces jumelles différenciables initialement grâce à des techniques de cytogénétiques (Coluzzi *et al.*, 1979), puis depuis les travaux de Santolamazza et ses collègues en 1998, sur la base de l'étude du polymorphisme génétique interspécifique des régions de l'ADN ribosomal et sur une insertion SINE200 irréversible (Santolamazza *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 1993). Sur cette base les espèces du complexe *gambiae* sont les suivantes : *An. gambiae* s.s. (Giles, 1902) ; *An. merus* (Dönitz, 1902) ; *An. melas* (Theobald, 1903) ; *An. arabiensis* (Patton, 1905) ; *An. quadriannulatus An.* (Theobald, 1911) ; *An. quadriannulatus B* (Hunt *et al.*, 1998) ; *An. bwambae* (White, 1985) ; *An. comorensis* (Goff & Geoffroy, 1997) enfin *An. amharicus* (Wilkerson & Coetzee, 2013).

Sur le plan cytogénétique, l'espèce *Anopheles gambiae* s.s. se subdivise en cinq formes dont la répartition géographique dépend essentiellement des conditions environnementales, telles que le climat et la nature des gîtes larvaires (Touré *et al.*, 1994) ; identifiables par technique de PCR selon un protocole décrit en 2001 (Favia *et al.*, 2001), et correspondant à des inversions chromosomiques formant des cytotypes adaptés à un environnement particulier (Bryan *et al.*, 1982). Des marqueurs microsatellites, préalablement utilisés pour cartographier le génome des espèces du complexe *An. gambiae* (Zheng *et al.*, 1996), ont fourni un outil remarquable pour l'étude de la structuration génétique des populations (Lanzaro *et al.*, 1998). Ces marqueurs ont montré que, dans une même région, des différences importantes dans la structure des populations peuvent être observées entre plusieurs cytotypes (différentes formes chromosomiques), surtout si les marqueurs microsatellites utilisés sont localisés sur le chromosome 2 sur lequel se trouvent la plupart des inversions discriminantes (Lanzaro *et al.*, 1998). *Anopheles arabiensis*, une autre espèce du complexe et aussi excellent vecteur, a indirectement bénéficié d'un grand intérêt de ces recherches axées sur l'étude des microsatellites. En effet, la majorité des séquences microsatellites identifiées sur *Anopheles gambiae* s.s. sont également présentes chez *An. arabiensis* (Simard *et al.*, 1999).

Depuis le début des années 2000, *Anopheles gambiae* s.s. a été subdivisée en deux formes moléculaires distinctes, la forme M et la forme S, basées sur une variation nucléotidique au niveau de la séquence IGS (InterGenic Spacer) de l'ADN ribosomal (Torre *et al.*, 2001). Une étude menée au Sud-Cameroun au sein d'une population d'*Anopheles gambiae* de la forme

chromosomique « Forêt », où les deux formes moléculaires M et S étaient présentes en sympatrie, a montré une différenciation génétique significative entre les deux (Wondji *et al.*, 2002). Ceci a été confirmé par les travaux de Coetzee *et al.* (2013) qui ont permis d'élever ces formes M et S au rang d'espèces. La forme chromosomique M est ainsi devenue *An. coluzzii* alors que la forme S est devenue *An. gambiae* (Coetzee *et al.*, 2013).

Le terme « groupe *Anopheles funestus* » a été mentionné pour la première fois par Gillies et Meillon (1968), pour désigner un ensemble d'espèce morphologiquement proche d'*An. funestus* à tous les stades de développement. Comme susmentionné, la notion de "groupe" fait référence à des espèces très proches morphologiquement mais qui présentent de petites différences à un stade au moins de leur cycle de développement (Harbach, 1994). Le groupe *Anopheles funestus* comporte ainsi 5 sous-groupes dont 3 sont présents dans la région Afrotropicale :

- le sous-groupe *An. funestus* composé de 5 espèces : *An. aruni* Sobti, 1968, *An. confusus* Evans & Leeson, 1935, *An. funestus* s.s. Gillies, 1900, *An. parensis* Gillies, 1962 et *An. vaneedeni* Gillies & Coetzee, 1987 ;
- le sous-groupe *An. rivulorum* composé de 4 espèces *An. brucei* Service, 1960, *An. fuscivenosus* Leeson, 1930, *An. rivulorum* s.s. Leeson, 1935 et *An. rivulorum-like* Evans & Leeson, 1937 ;
- enfin, le sous-groupe *An. minimus*, essentiellement asiatique, sauf *An. lesoni* Evans, 1931 (localement vecteur au Cameroun et en Tanzanie).

Les espèces *Anopheles parensis*, *An. fuscivenosus*, *An. confusus* et *An. aruni* ne sont présentes qu'en Afrique de l'Est ; *An. vaneedeni* est localisée en Afrique du Sud, et *An. brucei* est rapportée au Nigeria. Par contre, les *An. funestus* s.s., *An. lesoni* et *An. rivulorum* s.s. sont largement présentes sur l'ensemble de l'Afrique subsaharienne (Coetzee & Fontenille, 2004).

Toutes les espèces du groupe sont très similaires morphologiquement et difficilement différenciables au stade adulte. Pour les espèces rares ou à distribution limitée, les stades préimaginaux sont souvent inconnus. Ce manque de caractères diagnostiques est à l'origine de mauvaises identifications. Face à ces difficultés, il a été mis sur pied un outil d'identification moléculaire par réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* : PCR) de type multiplexe permettant d'identifier les espèces *An. funestus*, *An. vaneedeni*, *An. lesoni*, *An. rivulorum*, *An. rivulorum-like* et *An. parensis*. Ce test a été initialement développé sur des populations d'Afrique du Sud (Koekemoer *et al.*, 2002) puis validé pour toute l'Afrique (Spillings *et al.*, 2009). Le test d'identification par PCR pour *An. rivulorum-like* a été mis au

point par Cohuet et ses collaborateurs en 2003. La biologie et la capacité vectorielle des espèces du groupe *An. funestus* sont très différentes. Seule l'espèce *An. funestus* s.s. qui est extrêmement anthropophile joue un rôle important dans la transmission du paludisme, bien qu'une étude de Kopya *et al.* (2021) a montré également l'implication d'*Anopheles lesoni* dans la transmission à la différence des autres membres du groupe qui sont le plus souvent zoophiles et donc de moindre importance médicale (Coetzee & Fontenille, 2004).

I.3.1. Systématique et morphologie des anophèles

D'après Harbach (2004), la position systématique des anophèles est la suivante :

- Règne Animal (organismes hétérotrophes, pluricellulaires, eucaryotes, dont les cellules ne portent pas de membrane pectocellulosique)
- Embranchement des Arthropodes (présence d'une symétrie bilatérale, présence d'appendices articulés)
- Classe des hexapodes (pièces buccales visibles à l'extérieur, corps segmenté en trois parties, présence de l'organe de Johnston sur le scape antennaire)
- Sous-classe des insectes (présence d'ailes au moins à un stade de leur développement post-embryonnaire.)
- Ordre des Diptères (présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en balanciers ; pièces buccales de type piqueur-suceur)
- Sous-ordre des Nématocères (antennes longues et multiarticulées, pronotum séparé du mésonotum par une suture transverse)
- Famille des Culicidae (corps recouvert d'écailles filiformes, bord postérieur des ailes frangées d'écailles)
- Sous-famille des Anophelinae (trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête, scutellum régulièrement courbé au bord postérieur)
- Genre *Anopheles* (Meigen, 1818) (taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa).

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 :

- (i) Les ailes des anophèles présentent une succession de taches noires et claires caractéristiques des espèces alors que celles des Culicinae en sont dépourvues ;
- (ii) 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. Caractérisation morphologique des espèces du groupe *Anopheles funestus*

Les adultes d'*Anopheles funestus* s.l. 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 partie du bord d'attaque de l'aile vers l'arrière encore appelée 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 & Coetzee, 1987; Gillies & Meillon, 1968).

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 & Coetzee, 1987; Gillies & Meillon, 1968).

I.3.3. Bio-écologie et cycle de développement des Anophèles

I.3.3.1. Bio-écologie des stades préimaginaux

La bio-écologie des larves est entièrement déterminée 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 variée 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 & Perez, 1985). Il possède deux flotteurs latéraux qui lui permettent de conserver une position horizontale à la surface de l'eau (fig.5). La taille des œufs est généralement de l'ordre de 0,5 millimètre (Rodhain & 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.

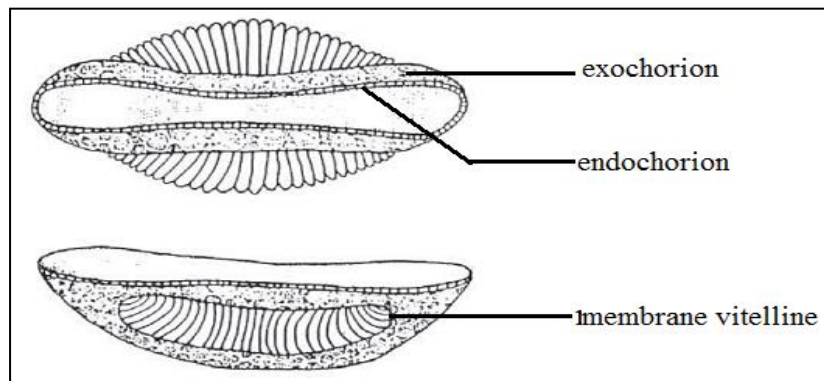


Figure 5 : Œuf d'anophèle (Russell *et al.*, 1963).

- **Larve** : Selon Holstein (1949), 24 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 & 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.

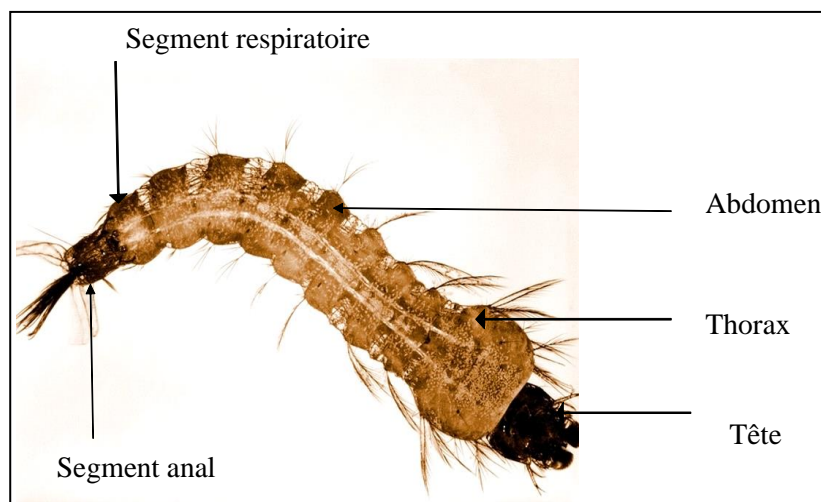


Figure 6 : Larves d'anophèle (alamandre.org/article/larve-moustique).

- **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 (fig.7). 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 & Perez, 1985).

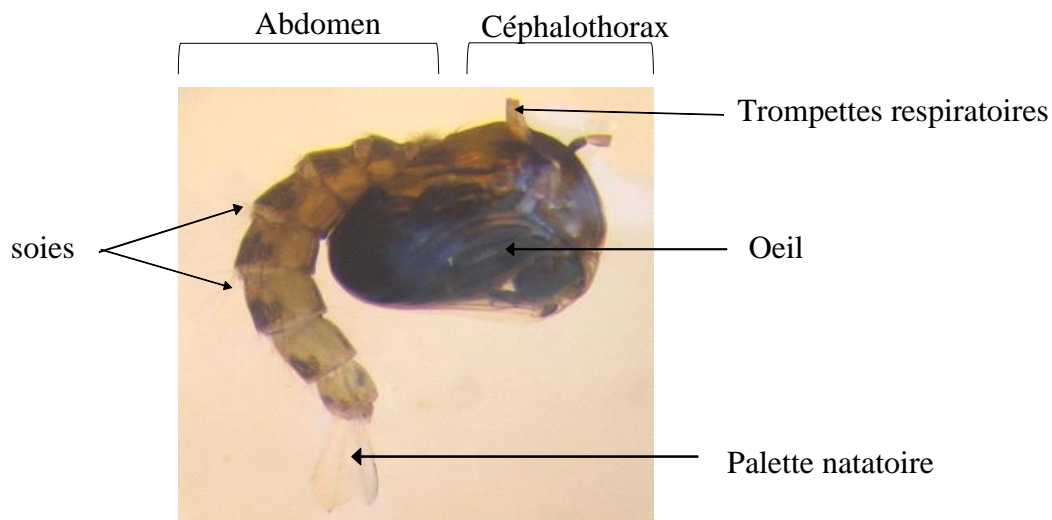


Figure 7 : Nymphes d'anophèle
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a1/Anopheles_puppe.jpg).

I.3.3.2. Bio-écologie de l'adulte

Le cycle trophogonique (ou gonotrophique) est la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique femelle entre deux repas de sang successifs (Robert & Boudin, 2002). Trois phases sont distinguées : **i**) la recherche de l'hôte et sa piqûre par la femelle à jeûn, **ii**) la digestion du sang qui se déroule dans le même temps que la maturation ovarienne et **iii**) la recherche du lieu de ponte de la femelle gravide.

- **Nutrition** : seules les femelles des anophèles 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 *et al.*, 1949). Les hôtes, pour la plupart des vertébrés homéothermes, sont choisis en fonction des préférences trophiques de chaque espèce d'anophèle. 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'anophèle 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 heure et 04 heures (Combe, 2014). 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 (fig. 8). 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) 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

autres. 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).

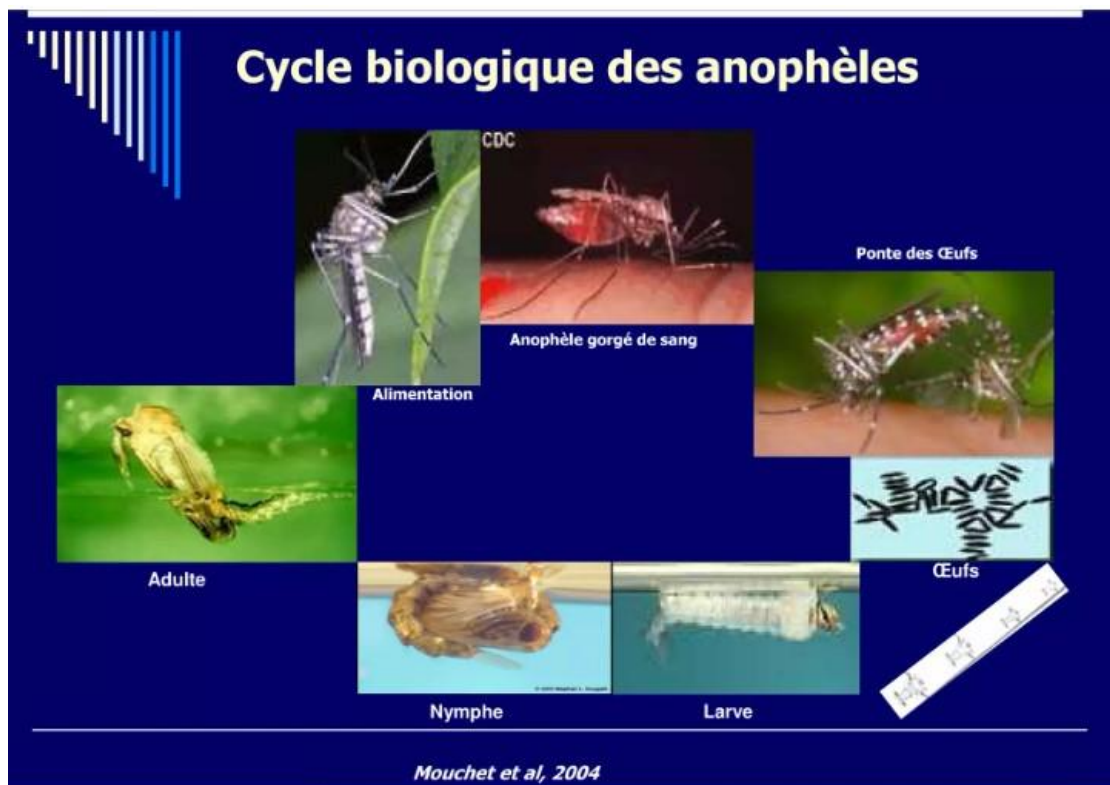


Figure 8: Cycle biologique des anophèles (Mouchet *et al.*, 2004).

I.3.3.2.1. Biologie des espèces du groupe *Anopheles funestus*

- Préférence trophique, lieu de repos et rôle vecteur

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 anthropophage 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 aussi trouvé des spécimens d'*An. lesoni* et de *An. parensis* positifs à *P. falciparum*, suggérant un rôle secondaire de ces moustiques dans l'épidémiologie du paludisme. Des spécimens de *Anopheles lesoni* ont eux aussi été trouvés infectés à *Plasmodium falciparum* au Cameroun par Kopya *et al.* (2021) suggérant son implication 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).

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 que *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). Les travaux de Francis *et al.* (2020) au Cameroun dans la localité d'Elende ont montré que la prévalence de *P. falciparum* était élevée chez l'espèce *An. funestus* avec un taux sporozoïtique de 6.66% (10/150) ; ainsi que les travaux de Cohuet *et al.* (2004) avec un taux sporozoïtique de 6,8%.

- Lieu de reproduction

Le moustique *Anopheles funestus* s.s. se reproduit dans des étendues d'eau naturelles/artificielles permanentes et semi-permanentes avec une végétation herbeuse et ombragée. 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 (fig. 9), 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.



Figure 9: Gîtes typiques de *Anopheles funestus* s.s., A : Lac et B : Etang de pisciculture.

I.4. Stratégies de lutte contre le paludisme

Actuellement, la lutte contre le paludisme repose sur 2 aspects majeurs : la lutte contre le parasite par des mesures curatives et préventives et celle contre le vecteur visant à diminuer les densités des populations de moustiques et le contact Homme-Vecteur.

I.4.1. Lutte contre le parasite

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 & Mouchet, 1990). Aujourd'hui l'OMS (2022)

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 luméfantine, l'amodiaquine et la sulfadoxine-pyriméthamine.

I.4.2. Vaccins antipaludiques

Depuis des années, de nombreux travaux sont menés pour la recherche d'un vaccin contre le paludisme. Ainsi, plusieurs candidats vaccins ont été développés à l'instar du :

- 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.

- 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) (Esen *et al.*, 2009; Girard *et al.*, 2007; Goodman *et al.*, 2010; Sheehy *et al.*, 2012),

- 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 & Jacobs-Lorena, 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 *Pfs25* qui est exprimé à la surface des zygotes et des ookinètes, le *Pfs48/45* et le *Pfs230* qui sont des protéines présentes sur les gamètes (Dinglasan *et al.*, 2013).

- vaccin R21 dirigé contre le stade pré érythrocytaire. Le vaccin R21/Matrix-M cible la protéine circumsporozoïte comme dans le RTS,S mais l'ajout de l'adjuvant Matrix-M, un ingrédient vaccinal breveté par Novavax, confère à ce vaccin une meilleure réponse immunitaire et une meilleure efficacité. En effet, il a été démontré au cours d'une étude de phase 1/2b au Burkina-Faso que ce nouveau vaccin avait une efficacité de 80% chez les enfants ayant reçu la plus forte dose d'adjuvant. Actuellement, une étude de phase 3 avec 4800 participants est en cours pour l'octroi de la licence pour ce vaccin.

De tous ces candidats, seul le RTS,S a semblé montrer des résultats satisfaisants. En effet, il a été testé dans trois pays d'Afrique à savoir le Ghana, Kenya, and Malawi. L'effet sur le paludisme grave a été estimé à une réduction de 30 % ce qui donne une indication de l'important potentiel de protection de ce vaccin (Björkman *et al.*, 2023).

Ces résultats promoteurs ont conduit l'OMS à faire de ce candidat, le seul vaccin aujourd'hui recommandé. De ce fait, il est aujourd'hui introduit dans les programmes de vaccination dans quelques pays africains dont le Cameroun.

Bien que ces vaccins soient promoteurs, la lutte antivectorielle reste le meilleur moyen de prévention contre cette maladie.

I.4.3. La lutte contre les vecteurs

Suite aux échecs des programmes de lutte menés entre les années 1930 et 1970, la lutte contre le paludisme, et les maladies à transmission vectorielle en générale, s'oriente, désormais, vers des méthodes visant, non plus à éradiquer les populations d'insectes nuisibles, mais aussi à réduire et à contrôler leurs densités en dessous d'un seuil épidémiologiquement tolérable (OMS 2022). Les programmes de lutte sont ainsi menés en tenant compte des particularités épidémiologiques des régions concernées et de la bio-écologie des espèces visées. D'un point de vue épidémiologique, les méthodes de lutte sont classées selon le « maillon » qu'elles ciblent au niveau du cycle de la transmission (Pages *et al.*, 2007). On distingue ainsi les méthodes qui visent principalement à réduire la production de moustiques ou augmenter la mortalité des adultes de celles visant à réduire le contact Homme-Vecteur. De ce fait, la réduction de la densité des moustiques peut se faire à deux niveaux en rapport avec les stades de développement du vecteur (Darriet *et al.*, 1998) à savoir la lutte contre les larves et les adultes.

I.4.3.1. La lutte contre les larves

La lutte contre les stades préimaginaux a été fortement 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. La lutte contre les larves requiert une bonne connaissance de la biologie du vecteur (conditions, lieu, période de développement etc.). Elle peut se faire par :

- l'aménagement de l'environnement : assainissement autour des habitations (protection individuelle et familiale) ou irrigations intermittentes.

- une lutte chimique : traitement larvicide des eaux de surface (ecdysoïdes tels que le triflumuron et des juvénoïdes). Les larvicides doivent être sélectifs et leur efficacité et rémanence évaluées sur le terrain avant d'être appliquées (Darriet *et al.*, 1998). Dans le même sens, une étude récente a été menée sur l'efficacité du larvicide microbien VectoMax®G contre les larves de *Anopheles gambiae* s.l. et de *Culex* spp. En laboratoire et en plein champ dans la ville de Yaoundé en indiquant les concentrations sub-létales de VectoMax®G. Les résultats de cette étude ont montré que 100 % des larves de *An. gambiae* s.l. ont été tué en 24 heures, tandis que pour les larves de *Culex* spp., une mortalité de 100 % a été enregistrée 48 heures après le traitement (Edmond *et al.*, 2021).

- une lutte biologique : introduction de prédateurs, parasites ou de bactéries entomopathogènes des larves du vecteur (Louis & Albert, 1988).

- une lutte génétique : réduction de la densité des populations de moustiques par modification de leur patrimoine génétique ou par leur autodestruction (Alphey *et al.*, 2002). La lutte anti-larvaire n'est efficace que si les gîtes larvaires sont limités en nombre, facilement identifiables et faciles d'accès. Ce qui n'est généralement pas le cas surtout pour les vecteurs principaux du paludisme en Afrique.

I.4.3.2. La lutte contre les adultes

La lutte contre les stades adultes est essentiellement chimique et basée sur l'utilisation des propriétés de nombreuses molécules à effet insecticide (substances synthétiques ou végétales) qui tuent les vecteurs par contact ou par ingestion. Il existe de nombreuses familles d'insecticides. Les plus utilisées en santé publique sont : (i) les organochlorés (DDT, dieldrine), (ii) les organophosphorés (malathion, fenitrothion, téméphos, chlorpyrifos), (iii) les carbamates (propoxur) et (iv) les pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, alpha-cyperméthrine, bifenthrine), (v) Les pyrroles (chlorfénapyr). Ces produits peuvent être appliqués directement dans l'environnement sous forme de suspension (pulvérisation intradomiciliaire) et également par imprégnation des moustiquaires d'insecticide à longue durée d'action. Ces moyens ont contribué à baisser significativement l'incidence et la mortalité due à cette maladie entre 2000 et 2019 sur le plan mondial, en Afrique et au Cameroun en particulier (WHO, 2020).

La réduction significative du paludisme obtenue ces dernières années a été associée à plus de 70% à la lutte antivectorielle (Bhatt *et al.*, 2015b) montrant que cette stratégie peut réellement contribuer à aller vers l'élimination de cette maladie. En effet, il est estimé qu'entre

les années 2000 et 2015, il y a eu une réduction de moitié de l'incidence des cas cliniques et une réduction de 40% des cas cliniques de *Plasmodium falciparum* en Afrique (Bhatt *et al.*, 2015b) due au déploiement massif des Milda en particulier. Malheureusement cette technique de lutte est actuellement menacée par le développement et l'expansion du phénomène de résistance aux insecticides chez les vecteurs majeurs du paludisme en Afrique subsaharienne. D'où la nécessité de développer des nouvelles mesures de lutte antivectorielle pour contrecarrer l'effet de cette résistance sur la lutte antivectorielle. Une des solutions implémentées actuellement est l'utilisation des moustiquaires dite de « nouvelle génération » telles que celles imprégnées avec des synergistes en plus des pyréthrinoïdes. En effet, une étude à grande échelle en Ouganda sur 25 mois a démontré que les Milda à base de pyréthrinoïdes + PBO assuraient une meilleure protection des enfants âgés de 2 à 10 ans que les Milda simples (Maiteki-Sebuguzi *et al.*, 2023), d'où la recommandation par l'OMS que les Milda à base de pyréthrinoïdes + pyrrole (chlorfenapyr) soient utilisées dans les zones avec des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes.

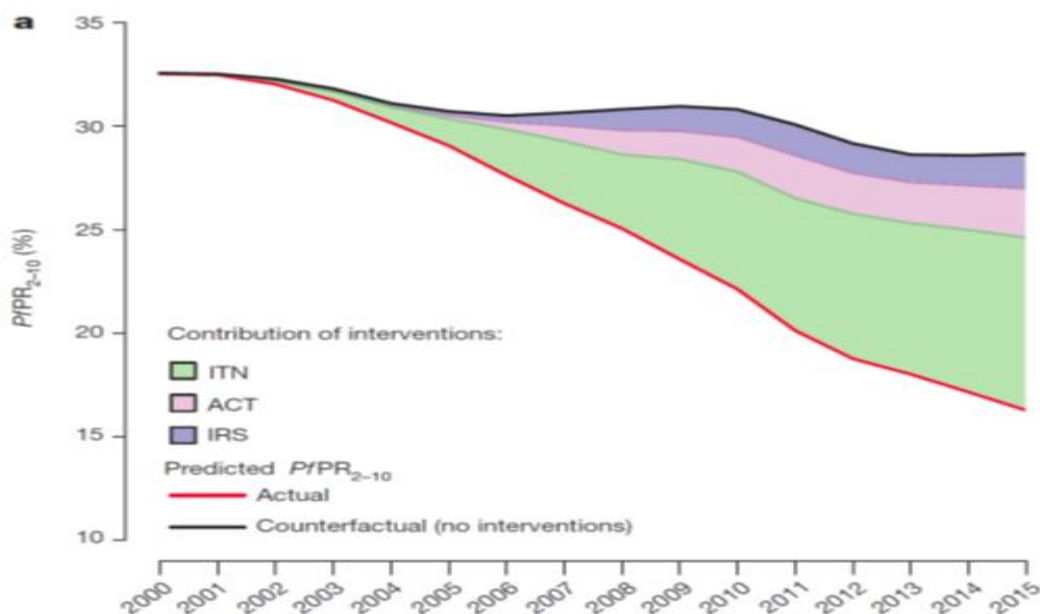


Figure 10: Contribution de différentes interventions dans la lutte contre le paludisme de 2000-2015 (Bhatt *et al.*, 2015). ITN : Moustiquaire Imprégné d'Insecticide ; ACT : Traitement à base de Combinaison d'Artemisinine ; IRS : Pulvérisation Intradomiciliaire.

I.5. Résistance aux insecticides et mécanisme impliqués chez les vecteurs du paludisme

I.5.1. Définition de la résistance aux insecticides

La résistance est définie par l'OMS comme « l'apparition dans une population, d'individus possédant la faculté de tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un

effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce» (WHO, 2012). La résistance à un insecticide peut s'étendre aux produits de la même famille voire des familles voisines ayant le même mode d'action ou les mêmes cibles ; c'est la résistance croisée. De plus chez certaines populations d'insectes, on observe une accumulation de résistances à plusieurs familles d'insecticides : ce sont des multirésistances (Hemingway & Karunaratne, 1998; Hemingway & Ranson, 2000).

I.5.2. Mécanismes de résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme

Presque tous les insecticides chimiques sont neurotoxiques car perturbent le système nerveux de l'insecte en entraînant sa paralysie puis sa mort. Mais pour agir, l'insecticide doit pénétrer puis circuler dans l'organisme et atteindre enfin les cellules cibles. Les insectes parviennent à empêcher l'atteinte des cellules cibles par l'insecticide grâce à un ensemble de mécanismes qu'ils mettent en place. Les résistances sont contrôlées par un ou plusieurs gènes qui peut (peuvent) présenter différents allèles apparus par mutation (Poirié & Pasteur, 1991) et qui permettent à l'insecte, d'éviter le contact avec le composé toxique (résistance comportementale) (Mathenge *et al.*, 2001), de diminuer sa pénétration ou d'augmenter son excrétion (résistance cuticulaire) (Apperson & Georghiou, 1975) ou encore sa détoxification (résistance métabolique), et même de modifier la structure des cibles de sorte que l'affinité avec l'insecticide est diminuée. Les résistances, comportementale et cuticulaire sont des mécanismes de résistance relativement rares mais surtout peu élucidés alors que l'augmentation de la détoxification des insecticides et les modifications des cibles sont connus comme à l'origine des niveaux de résistance très élevés chez les insectes.

Les mécanismes de résistance biochimique peuvent être classés en deux grands groupes : (i) la résistance métabolique (modification du niveau ou de l'activité des protéines de détoxification) et, (ii) la résistance par modification du site cible (mutations au niveau du canal sodique, de l'acétylcholinestérase ainsi que les gènes des récepteurs GABA).

I.5.2.1. Résistance par modification du site cible

Les principaux sites d'action des insecticides (récepteurs) localisés au niveau du système nerveux sont modifiés pour ce type de résistance, à la suite d'une mutation ponctuelle de la séquence codant pour la protéine constitutive de la cible ; réduisant ainsi l'effet de l'insecticide sur le moustique. Cette résistance est de l'ordre de trois types à savoir : la modification du canal sodium (résistance knock-down : kdr) responsable de la résistance croisée aux organochlorés et aux pyréthrinoïdes, la modification de l'acétylcholinestérase (*Ace-I*)

responsable de la résistance croisée aux organophosphorés et aux carbamates, et la modification de l'acide gamma amino butyrique responsable de la résistance à la dieldrine (RDL) (Enayati & Hemingway, 2010; Hemingway & Ranson, 2000).

I.5.2.1.1. Résistance knock-down (kdr)

Les mutations au niveau du canal sodium sont responsables de la résistance de type « knock-down », sous la dépendance du gène dit *kdr* (Hemingway *et al.*, 2004). La mutation la plus courante est observée à la position du codon 1014 avec un remplacement de la leucine par la phénylalanine (L1014F) comme observé chez *An. gambiae* (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Cependant une autre mutation est observée sur le même codon chez *An. gambiae*, *An. coluzzii* et *An. arabiensis* avec un remplacement de la leucine par la sérine (L1014S) (Ranson *et al.*, 2000). Toutes les études effectuées jusqu'à présent ne révèlent aucune présence de la résistance du type *kdr* chez *An. funestus* (Irving & Wondji, 2017).

I.5.2.1.2. Acétylcholinestérase (Ace)

La mutation de cette enzyme (mutation *AceI-R*), impliquée dans le métabolisme de l'acétylcholine (Pitman, 1971) est à l'origine d'une résistance croisée aux carbamates et aux organophosphorés. Elle provient de la substitution de la glycine par la sérine en position 119 (G119S) sur le gène *Ace-I* et affecte la structure de l'enzyme de telle sorte que le site catalytique est moins accessible à l'insecticide. Cette mutation a été observée chez plusieurs espèces de moustiques tels que *An. gambiae* (Weill *et al.*, 2003) *An. arabiensis* (Casimiro *et al.*, 2014), *Culex pipiens* (Bonning & Hemingway, 1991; Raymond *et al.*, 1986) mais jamais chez *Ae. aegypti* (Vontas *et al.*, 2012), ni chez *An. funestus* (Cuamba *et al.*, 2010).

I.5.2.1.3. Récepteur de l'acide δ -aminobutyrique (GABA)

Une substitution de l'alanine par la sérine (french-Constant & Rocheleau, 1993) appelée mutation A296S sur une séquence codante du GABA conduit à une résistance aux cyclodiènes (Bass *et al.*, 2004) tel la dièldrine chez *An. gambiae* (Brooke *et al.*, 2006), *An. funestus* et *An. Arabiensis* (Du *et al.*, 2005; Wondji *et al.*, 2011) et plus rarement une substitution de l'alanine par la glycine (Hosie *et al.*, 1997) appelée la mutation A296G confère cette même résistance chez *An. gambiae* (Brooke *et al.*, 2006).

I.5.2.2. La résistance cuticulaire

Le taux de pénétration des insecticides sur la cuticule du moustique est un important paramètre de toxicité. Chez les arthropodes, la cuticule est la partie la plus externe du système tégumentaire ; elle recouvre toute la surface du corps ainsi que celle du système digestif et des trachées. Elle sert de squelette externe (exosquelette) sur lequel les muscles s'attachent ; c'est également la première barrière de défense de l'organisme. Elle repose sur l'épiderme, qui la sécrète en grande partie lors de chaque mue. La cuticule est un milieu biologique complexe ayant des propriétés physico-chimiques particulières, notamment une très forte lipophilie. Ces caractéristiques en font un acteur potentiellement important de la résistance aux insecticides chimiques, car les molécules utilisées sont souvent très hydrophobes et agissent par contact. Ce faible taux de pénétration donne plus de temps aux enzymes de détoxification pour métaboliser les molécules insecticides, aboutissant à une meilleure survie des moustiques comme observé chez l'espèce *An. gambiae*, (Awolola *et al.*, 2009).

I.5.2.3. La résistance comportementale (éthologique)

L'évitement de l'insecticide, encore appelé "résistance comportementale" représente l'habileté qu'ont certains vecteurs à éviter le contact avec les insecticides (WHO, 1957). Elle est déclenchée par les pressions de sélection exercées par l'insecticide et est généralement stimulus dépendant (l'insecte peut détecter l'insecticide et l'éviter). Ce phénomène a été observé pour la première fois chez les moustiques exposés au DDT (Buxton, 1945). Le mécanisme a une importance dans la LAV car il peut aboutir à un changement de comportement : des vecteurs endophiles peuvent devenir exophiles voir zoophiles (Green & Srinivasan, 1990), ce qui peut compromettre les stratégies de LAV, surtout si elles sont dépendantes des aires de repos des vecteurs. Peu d'informations sont disponibles sur la résistance comportementale car ce mécanisme est difficile à étudier.

Cependant il a été observé un changement de comportement de piqûre chez *Anopheles funestus* (une proportion importante de moustiques était capturée entre 6h et 8h période pendant laquelle les populations ne sont plus sous MILDA) après la mise en œuvre de ces MILDA à couverture universelle. Ceci pourrait donc avoir des conséquences directes pour le contrôle du paludisme en Afrique et souligne le besoin de stratégies alternatives pour mieux cibler les vecteurs du paludisme (Moiroux *et al.*, 2012).

I.5.2.4. La Résistance métabolique

Certaines enzymes à large spectre sont aptes à désintoxiquer l'organisme des insectes en augmentant le métabolisme des molécules insecticides. Cette augmentation peut être due soit à une importante production d'enzymes de détoxification, soit à un meilleur métabolisme suite à une mutation suivie d'une modification de la structure de l'enzyme (Li *et al.*, 2007). Les enzymes sont principalement de trois grandes familles chez les moustiques : les carboxylestérases (COEs), les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYPs) et les glutathion S-transférases (GSTs) auxquelles on peut ajouter les transporteurs extra-membranaires (ABCs) et les protéines cuticulaires (UDP-GT) (Hemingway *et al.*, 2004).

I.5.2.4.1. Les estérases

Les estérases sont des molécules qui hydrolysent les liaisons ester et de ce fait, jouent un rôle important dans le métabolisme des organophosphorés, des carbamates et des pyréthrinoides. Les estérases confèrent une résistance en se liant rapidement aux insecticides et en ralentissant leurs mouvements, leur empêchant d'atteindre leur site d'action. Pour une action effective, la quantité d'enzymes doit de loin dépasser celle des molécules insecticides. Cette surproduction enzymatique peut être due soit à une amplification génique (modification génomique spontanée pouvant augmenter le nombre de copies d'un ou plusieurs gènes), une altération de l'expression des gènes ou une surrégulation (augmentation de la production d'une enzyme sans augmentation du nombre de copies du gène) ou de certaines mutations ponctuelles (Haubruge & Amichot, 1998). Par exemple, la surexpression des estérases *estα21* et *estβ21* est responsable de 90% des résistances aux organophosphorés chez *Culex quinquefasciatus* (Huang *et al.*, 1998).

I.5.2.4.2. Les monooxygénases à cytochrome P450

Les cytochromes P450s sont une superfamille d'enzymes que l'on rencontre chez tous les organismes (Scott *et al.*, 1998). Ces enzymes qui se caractérisent par une grande diversité génétique et une faible spécificité de substrats sont impliquées dans la détoxification de nombreuses substances endogènes (hormones, stéroïdes, acides gras) ainsi que des xénobiotiques (médicaments, pesticides, toxines, polluants...) (Scott *et al.*, 1998). Elles sont appelées monooxygénases car elles incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire. Les CYPs présentent un large spectre d'activités catalytiques. Chez l'homme, *CYP1A1* peut métaboliser plus de 90 substrats (Rendic, 2002), *CYP2D6* plus de 30 médicaments (Guengerich *et al.*, 1995) alors que *CYP7A1* n'a qu'un substrat connu. Aussi,

plusieurs CYPs peuvent métaboliser le même substrat témoignant d'une redondance fonctionnelle. L'étude du rôle des CYPs dans la biodégradation des xénobiotiques est ainsi d'autant plus difficile, surtout que le changement d'un acide-aminé dans leur séquence peut modifier la spécificité de substrat (Lindberg & Negishi, 1989). Ce phénomène est aussi observé chez *An. funestus* chez qui une variation allélique des gènes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* impacte grandement le métabolisme des pyréthriinoïdes (Ibrahim *et al.*, 2015). Chez *An. funestus*, deux gènes du cytochrome P450 dupliqués *CYP6P9* et *CYP6P4* sont associés à la résistance aux pyréthriinoïdes principalement au Mozambique et au Malawi (Riveron *et al.*, 2013; Wondji *et al.*, 2009) tandis que les gènes *CYP6P3* et le *CYP6M2* sont les plus impliqués à la résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. gambiae* (Djouaka *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2012).

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

I.5.2.4.3. Les Glutathion S-transférases

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

microsomales ont été répertoriées chez les insectes : une chez *Drosophila melanogaster* et trois chez *An. gambiae*. Les GSTs cytosoliques sont les plus importants car impliqués dans la résistance aux insecticides (Hemingway *et al.*, 2004). Leur classification actuelle présente six classes : Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta et Zeta (Enayati *et al.*, 2005). Les GSTs sont naturellement présentes chez les insectes, jouant différents rôles tels la détoxification de xénobiotiques, le transport intracellulaire de composés lipophiles, la biosynthèse des hormones, etc. (Enayati *et al.*, 2005). Une augmentation du niveau de GSTs peut être responsable de la résistance aux OPs (Huang *et al.*, 1998), aux OCs (Riveron *et al.*, 2014) et aux pyréthriinoïdes (Vontas *et al.*, 2001; Riveron *et al.*, 2014). La détoxification peut aussi se faire indirectement, comme avec les pyréthriinoïdes où les GSTs contribuent à la résistance en séquestrant les métabolites secondaires issus des réactions d'oxydation par les cytochromes P450 (Kostaropoulos *et al.*, 2001). Les mesures d'activités globales des GSTs ont montré des variations importantes à différents stades de développement des moustiques. Leurs concentrations augmentent avec l'évolution des stades larvaires, atteignent un maximum au stade nymphal et déclinent durant le stade adulte. De plus, l'expression tissulaire est également fortement variable. Certaines GSTs sont surexprimées dans les corps gras et l'intestin des insectes, tissus connus pour leurs rôles importants dans la détoxification des xénobiotiques (Enayati *et al.*, 2005).

Chez *An. funestus*, une importante découverte a été faite en 2014 où une mutation sur le gène GSTe2 a été retrouvée impliquée dans la résistance au DDT et aux pyréthriinoïdes chez ce vecteur du paludisme (Riveron *et al.*, 2014). Cette découverte a permis de concevoir le premier marqueur de la résistance métabolique basé sur l'ADN chez les moustiques. En effet, l'étude avait démontré que le changement d'un seul acide aminé (L119F) sur la séquence du gène GSTe2 (enzyme de détoxification) chez *An. funestus* confère une résistance croisée au DDT et à la perméthrine.

L'évaluation de la distribution de ce marqueur de la résistance métabolique à travers le continent a montré que l'allèle résistant 119 F corrélait au profil de résistance au DDT en Afrique (Riveron *et al.*, 2014). Autrement dit, l'allèle résistant 119 F a été fixé chez les moustiques collectés au Bénin qui sont hautement résistants au DDT mais totalement absent chez les populations d'Afrique australe entièrement sensibles à cet insecticide. Cet allèle de résistance a été également détecté dans d'autres populations de *An. funestus* d'Afrique de l'Ouest résistantes au DDT avec une fréquence de 48,2%, 44,2% et 25% au Cameroun, au Ghana et au Burkina Faso respectivement et en corrélation avec les niveaux de résistance au DDT

précédemment rapportée dans ces pays. Par ailleurs, L'allèle résistant 119F a été détecté en Ouganda aussi (20,4%) et au Kenya (7,8%) mais à de très faibles fréquences conformément au niveau de résistance modéré au DDT antérieurement signalé dans ces pays.

I.5.3. Impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur les traits de vie du moustique

Il a été démontré que certains gènes impliqués dans la résistance aux insecticides entraînent un changement important sur le comportement et la physiologie des moustiques (Agnew *et al.*, 2004; Raymond *et al.*, 2001b). Les travaux de Malal Diop (2019) ont par exemple montré que la taille du repas de sang pris par les femelles de *Anopheles gambiae* portant les mutations *Kdr* était plus élevé que le repas pris par les femelles portant la forme sauvage du gène. D'autres études ont également montré que la mutation *L119F-GSTe2* associée à la résistance croisée au DDT et aux pyréthriinoïdes influençait la fécondité et le temps de développement chez *An. funestus* avec notamment, les souches sensibles aux pyréthriinoïdes pondant plus d'œufs et se développant plus rapidement que les souches portant le gène de résistance (Tchouakui *et al.*, 2018).

Ce phénomène a également été observé chez d'autres insectes à l'instar des moustiques du genre *Culex*. En effet, une étude publiée en 2000 a montré que des moustiques *Culex quinquefasciatus* porteurs de certains gènes de résistance aux insecticides (surproduction d'estérase) pourraient être moins compétents à transmettre les microfilaires à *Wuchereria bancrofti* que les moustiques sensibles (Carroll & Hemingway, 2002). Ceci démontre que le coût génétique de la résistance pourrait affecter de nombreux traits de vie de différentes manières.

Cet impact de la résistance aux insecticides a également aussi, mais très peu été étudié sur la composition du contenu (sialome) des glandes salivaires des moustiques, dernière étape des parasites avant leur transmission chez l'Homme. En effet, dans le cadre de rares études qui se sont intéressées à cet aspect, il a été observé que la résistance aux insecticides pourrait modifier la composition du sialome chez les moustiques résistants (Cornelie *et al.*, 2014 ; Djegbe *et al.*, 2011 ; Vijay *et al.*, 2015). Par exemple, Djegbe et ses collaborateurs dans leurs travaux sur des souches de laboratoire de *C. quinquefasciatus*, ont montré que certaines protéines, dont des enzymes métaboliques (endoplasmine, triosephosphate isomérase) impliquées dans le repas sanguin étaient plus nombreuses (surexprimées) chez les souches résistantes par rapport aux souches sensibles ; alors que les protéines « D7 long form » étaient

moins abondantes (sous-exprimées) chez les résistants. Chez les anophèles, les travaux de Cornélie et collaborateurs en 2014 sur les souches de laboratoire de *An. gambiae* ont montré que la protéine Saglin, la protéine D7 long form et la Glutathione S-transferase D1 (GSTD1) étaient sous-exprimés dans les glandes salivaires des souches de moustiques portant les allèles de résistance aux insecticides AceRKis, tandis que la protéine TRIO était surexprimée chez les souches résistantes AceRKis par rapport à la souche susceptible. Dans le même sens, Vijay et ses collaborateurs en (2015), en comparant les souches du moustique *An. stephensi* résistantes et les sensibles aux pyréthrinoïdes ont observé que les protéines surexprimées étaient la déshydrogénase réductase et le cytochrome P450, alors que celles dont l'expression était faible étaient la protéine putative de liaison au zinc Yippee, la sous-unité régulatrice non ATPase du protéasome 26S, le produit du gène ND3 (mitochondrie), la S-méthyl-5'-thioadénosine phosphorylase, la sous-unité 18 du médiateur de la transcription de l'ARN polymérase II, l'hydrolase carboxyl-terminale de l'ubiquitine x4.

La seule étude réalisée sur des souches d'anophèles collectées sur le terrain a rapporté chez *An. funestus* s.s. souches résistantes aux pyréthrinoïdes, une surexpression en Afrique australe de certaines protéines salivaires telles que la "D7-related 1 protein", "Gsg6 salivary protein", "Gsg7 salivary protein", "D7-related 3 protein", "D7 protein" (Jacob M Riveron *et al.*, 2014b).

Au regard du rôle important de la salive dans la prise du repas sanguin du moustique et la transmission des parasites, l'ensemble des résultats de ces quelques travaux montrent que les études sur l'impact des mécanismes de résistance chez les populations naturelles des anophèles seraient très informatives sur leur capacité à transmettre les parasites du paludisme dans un contexte de réduction de la susceptibilité aux insecticides chez ces vecteurs.

I.6. Structure et rôle des glandes salivaires dans la capacité vectorielle des vecteurs du paludisme

I.6.1. Structure des glandes salivaires des anophèles

L'hématophagie découle d'un long et très complexe processus d'adaptation ayant engendré d'importantes modifications anatomiques, physiologiques et immunologiques chez les moustiques. Ces modifications ont surtout concerné : **(i)** les pièces buccales pour faciliter leur accès aux vaisseaux sanguins, **(ii)** les glandes salivaires et l'intestin pour la neutralisation des systèmes de défense de l'hôte vertébré et favoriser la digestion et l'absorption des éléments

du sang. Les glandes salivaires des moustiques sont des organes pairs localisés au niveau du thorax. Chez les anophèles, les glandes salivaires des mâles sont plus petites et secrèteraient, pour certaines espèces, moins de protéines (Li *et al.*, 2001). Les glandes salivaires des femelles quant à elles montrent une histologie complexe avec de nombreux types cellulaires (fig.11). Chez les femelles, chaque glande est constituée de 3 lobes : deux lobes latéraux plus structurés et un lobe médian plus court (Janzen & Wright, 1971; Jariyapan *et al.*, 2007). Les lobes latéraux comportent 2 régions : une partie distale et une partie proximale séparées par une étroite zone de transition. Les cellules de la région distale sont identiques à celles du lobe médian et sont associées à la sécrétion de protéines salivaires nécessaires au repas sanguin (James & Rossignol, 1991). La région proximale des lobes latéraux est étroite et constituée par des structures identiques à celles des glandes salivaires des mâles; ses sécrétions participent à la prise de jus sucrés et à leur digestion (Lehane & Msangi, 1991). La sécrétion de protéines salivaires est indispensable à la prise et la digestion du repas (sanguin ou sucré) de l'insecte (Ribeiro *et al.*, 1985). En effet, les contraintes observées lors de la prise de sang ont amené les arthropodes en général, au cours de leur évolution, à mettre en place des stratégies efficaces contre les réponses de leur hôte préférentiel, expliquant ainsi la diversité structurale et fonctionnelle des constituants (molécules) de leur salive (Champagne, 2004; Ribeiro *et al.*, 1995). Les stratégies, incluant au moins un antiplaquettaire, une substance anticoagulante et un composé vasodilatateur, ont évolué indépendamment, mais de manière convergente après la séparation des familles des sous-familles (Ribeiro & Francischetti, 2003).

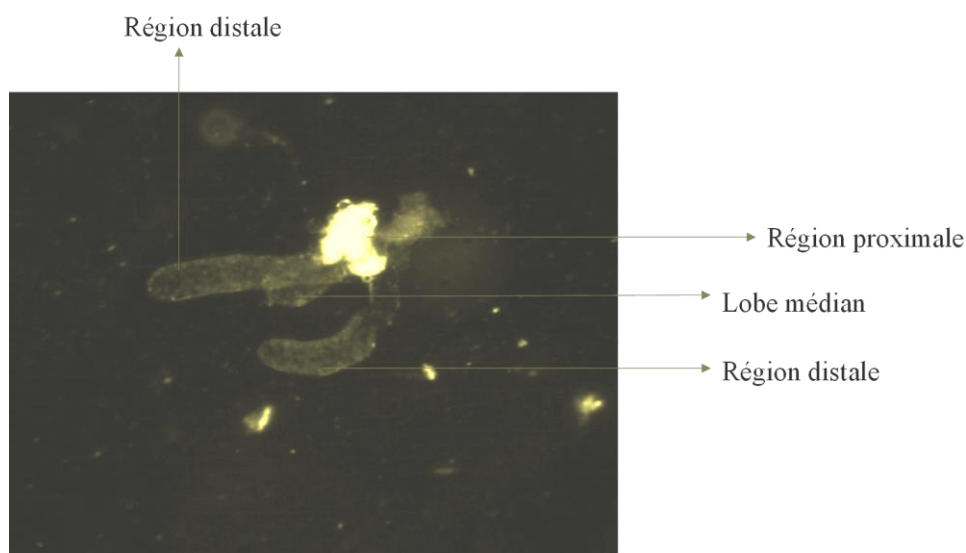


Figure 11: Photo des glandes salivaires femelle d'*Anopheles funestus* (NOUAGE Lynda 2019).

I.6.2. Rôle des glandes salivaires dans le succès du repas sanguin du moustique

Au cours de la piqûre, l'introduction des pièces buccales du moustique dans l'organisme de l'hôte, engendre une réaction de ce dernier. Cette réponse de l'hôte est généralement de type hémostatique (agrégation plaquettaire, vasoconstriction, coagulation sanguine), inflammatoire ou encore immunologique. Ainsi, pour mener à bien leur repas de sang, les arthropodes doivent absolument contrecarrer cette réponse hémostatique de l'hôte. Pour cela, ils ont développé au cours de leur évolution, une diversité de composés moléculaires (des protéines majoritairement) qui sont contenues dans leur salive et ayant des propriétés pharmacologiques et immunologiques ayant pour but d'augmenter l'afflux de sang dans la zone piquée (Champagne, 2004; Ribeiro *et al.*, 1995). Ces protéines libérées avec la salive dans la peau de l'hôte au moment de la piqûre, vont créer un ensemble de modifications physiologiques de la réponse de l'hôte au site de la piqûre, ce qui va favoriser le bon déroulement du repas sanguin de l'arthropode.

Les propriétés pharmacologiques des protéines salivaires favorisent le bon déroulement du repas sanguin en inhibant la réponse hémostatique ce qui va permettre un afflux de sang au niveau de la piqûre. En effet, les protéines salivaires vont assurer :

- l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Chez les anophèles, cette fonction est assurée par des protéines telles que l'apyrase, l'AAPP, les anophelines (Yoshida *et al.*, 2008).

- l'inhibition de la coagulation sanguine. Pour ce faire, la salive des arthropodes possède plusieurs protéines ayant une action anticoagulante qui vont ainsi bloquer la coagulation sanguine durant toute la durée du repas sanguin de l'arthropode. Chez les anophèles, cette fonction est assurée par des protéines telles que l'hamadarine, l'anopheline, la D7 et la 5'nucleotidase (Francischetti *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999).

- l'inhibition des vasoconstricteurs de l'hôte. Ceci va empêcher la réduction du diamètre des vaisseaux sanguins, favorisant ainsi l'arrivée de sang sur le site de piqûre. Chez les anophèles, cette fonction est assurée par la peroxidase (Ribeiro & Nussenzveig, 1993).

La salive des arthropodes facilite également le déroulement du repas sanguin en inhibant la réaction inflammatoire de l'hôte. Chez les moustiques, les propriétés anti-inflammatoires sont principalement portées par la famille des protéines D7 qui sont ubiquitaires chez les Culicidae (Calvo *et al.*, 2009).

I.6.3. Rôle des glandes salivaires dans l'invasion par les sporozoïtes des plasmodiums

Les protéines salivaires, inoculées avec la salive au moment de la piqûre, peuvent également jouer un rôle important dans la transmission des pathogènes et le développement de l'infection chez l'hôte (Andrade *et al.*, 2005). De nombreux travaux réalisés sur le modèle phlébotomes/leishmanies, ont montré que la salive des phlébotomes, grâce notamment au maxadilan (une protéine vasodilatatrice) favorisait le développement de la leishmaniose cutanée (Titus & Ribeiro, 1990; Trevejo *et al.*, 2005). Chez les moustiques du genre *Aedes*, il a récemment été montré qu'une protéine de la famille des 34 kDa, sécrétée dans la salive de *Ae. aegypti*, favorisait directement la réplication du DENV-2 dans les kératinocytes humains en inhibant la réponse immunitaire antivirale (Surasombatpattana *et al.*, 2014).

Concernant les moustiques du genre *Anopheles*, il a été rapporté que l'invasion des *Plasmodium* dans les glandes salivaires nécessite une reconnaissance du composant de surface des glandes salivaires de moustiques par le parasite. Il est suggéré que cette reconnaissance nécessite des interactions récepteur-ligand spécifiques. Des études antérieures ont décrit des protéines salivaires comme les récepteurs qui facilitent la fixation des sporozoïtes dans les glandes salivaires (Korochkina, 2006). Il a en effet été montré que la Saglin, une protéine sécrétée dans le lobe médian des glandes salivaires des anophèles, était un récepteur sur lequel le sporozoïte va se fixer dans les glandes salivaires du moustique (Okulate *et al.*, 2007). De plus, il est rapporté que l'interaction entre la saglin et la protéine TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) du parasite, est essentielle pour l'invasion de ce dernier dans les glandes salivaires (Ghosh *et al.*, 2009). Dans le même ordre d'idée, une protéine salivaire CSPBP (Circumsporozoïte Binding Protein) a été identifiée comme jouant un rôle essentiel dans l'invasion des *Plasmodium* dans les glandes salivaires de *Anopheles gambiae* (Wang *et al.*, 2013), ainsi que la protéine PRS1 qui module le développement du *Plasmodium* à la fois au niveau de l'intestin moyen et des glandes salivaires (Chertemps *et al.*, 2010).

Au regard du rôle important et déterminant des glandes salivaires et leur contenu dans la capacité du moustique à prendre son repas sanguin et à héberger les stades infectants du *Plasmodium*, toute modification de leur structure ou de leur contenu pourraient avoir un impact sur la capacité vectorielle du moustique. Cependant, malgré ce rôle important et plus encore, bien que ces dernières soient la dernière localisation du *Plasmodium* avant son passage à l'Homme, très peu de données sont disponibles sur l'influence que pourraient avoir des facteurs tels que l'âge du moustique, le statut physiologique ou encore la résistance aux insecticides sur le contenu des glandes salivaires et les conséquences potentielles sur la capacité à transmettre

les espèces de *Plasmodium*. Dans le contexte actuel de l'expansion du phénomène de résistance aux insecticides du fait de leur utilisation massive pour lutter contre les vecteurs du paludisme, il est important de comprendre comment ce phénomène pourrait influencer la composition du contenu de glandes salivaires chez les vecteurs du paludisme, mais surtout d'en étudier les conséquences éventuelles sur la capacité de ce vecteur à transmettre le paludisme à l'homme.

**CHAPITRE II : CADRE
GEOGRAPHIQUE,
MATERIEL ET
METHODES**

II.1. Cadre géographique

Les travaux de cette thèse ont combiné des activités de terrain et des activités réalisées en laboratoire.

Pour les activités de terrain, nous avons collectés des moustiques dans deux localités du Cameroun à savoir : Obout (3°7'0"N, 11°65'0"E) qui est une localité rurale située à environ 25km de Yaoundé dans le département de la Mefou et Afamba dans la région du Centre, et Mibellon (6°46'N, 11°70'E), un village situé dans la région de l'Adamaoua, département du Mayo-Banyo, arrondissement de Bankim à environ 75 Km de Foumbam.

Pour les activités de laboratoire et en insectarium au CRID nous avons procédé à l'élevage des moustiques et des expériences biomoléculaires.

Le choix des localités a été fait sur la base de l'abondance de *Anopheles funestus*, les gènes impliqués dans la résistance aux insecticides chez cette espèce (*GSTe2*) et la prévalence élevée de porteurs de gamétocytes de *Plasmodium* dans les différentes zones (Ndo *et al.*, 2016). Dans le cadre de l'objectif 3 de notre travail, les enquêtes parasitologiques pour le recrutement des porteurs de gamétocytes ont quant à elles été réalisées dans la localité d'Obout. Nous avons également eu à travailler dans le cadre de cette thèse avec des souches de moustiques établies et maintenues à l'insectarium du CRID ; il s'agit notamment : (i) de la souche FUMOZ, originaire du Mozambique et résistante à tous les insecticides utilisés en santé publique et (ii) de la souche FANG originaire de l'Angola et susceptible à tous les insecticides.

II.1.1. Description des sites de collecte des moustiques adultes

Obout est un village situé dans le département de la Mefou et Afamba, à 3km du chef-lieu Mfou (fig. 12). Le climat est de type équatorial guinéen, marqué par quatre saisons : une grande saison pluvieuse de mi-août à mi-novembre, une grande saison sèche de mi-novembre à mi-mars, une petite saison pluvieuse de mi-mars à mi-juin et une petite saison sèche de mi-juin à mi-août. Les températures mensuelles varient entre 19° et 29°C (Suchel, 1988). L'hydrographie est dominée par la rivière Mefou et ses affluents. Les activités des habitants sont essentiellement axées sur une agriculture de subsistance. Cependant, on y trouve aussi plusieurs autres points d'eau liés ou non aux activités anthropiques (lacs, étangs, marécages, mares d'eau quasiment permanentes dans les zones de fortes activités agro-pastorales) bordés de végétation qui constituent des gîtes potentiels d'*An. funestus* s.l. et *An. gambiae* s.l. La plupart des maisons sont faites en matériaux provisoires, terres battues, planches sur pilotis, sans plafond avec de nombreuses ouvertures facilitant l'accès aux moustiques. Les

moustiquaires imprégnées d'insecticides distribuées à grande échelle par le gouvernement sont utilisées par les populations contre les piqûres de moustiques. L'inclusion de ce site dans notre étude était également motivée par le fait qu'une forte résistance aux pyréthriinoïdes dans ce village a été rapportée comme hautement associée à la présence de l'allèle mutant 119F du gène *GSTe2* chez les populations d'*An. funestus* s.s. (Riveron *et al.*, 2014).

La localité de Mibellon est située en zone de savane, à 75km de Fouban. C'est un village de la région de l'Adamaoua, département du Mayo-Banyo, arrondissement de Bankim (Fig. 12). Ce village compte environ 200 habitants qui pour la plupart sont des cultivateurs. Les maisons y sont en grande majorité construites en terre battue et recouvertes de paille ou de tôle. On note entre les murs et le toit la présence de nombreux interstices servant potentiellement de voie d'entrée et de sortie aux moustiques. Dans ce village, la principale méthode de lutte antivectorielle est l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides utilisées par plus de 70% de la population (Tchouakui, communication personnelle). Le choix de ce site a été basé sur la prédominance de *An. funestus* (Menze *et al.*, 2016 ; Tchouakui *et al.*, 2019). Cette prédominance de l'espèce *Anophèles funestus* est favorisée par la présence dans le village, d'un lac bordé d'une végétation émergente qui constitue le principal gîte de développement des anophèles dans la localité. L'inclusion de ce site dans notre étude était également motivée par le fait qu'une forte résistance aux pyréthriinoïdes dans ce village a été rapportée comme hautement associée à la présence de l'allèle mutant 119F du gène *GSTe2* (28,1%) chez les populations d'*An. funestus* s.s. (Menze *et al.*, 2016).

II.1.2. Localités et réalisation des enquêtes parasitologiques

Les enquêtes parasitologiques pour la recherche des sujets infectés par *P. falciparum* ont été effectuées dans le village Obout et le choix du site s'est basé sur la prévalence élevée des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium* (Ndo *et al.*, 2016).

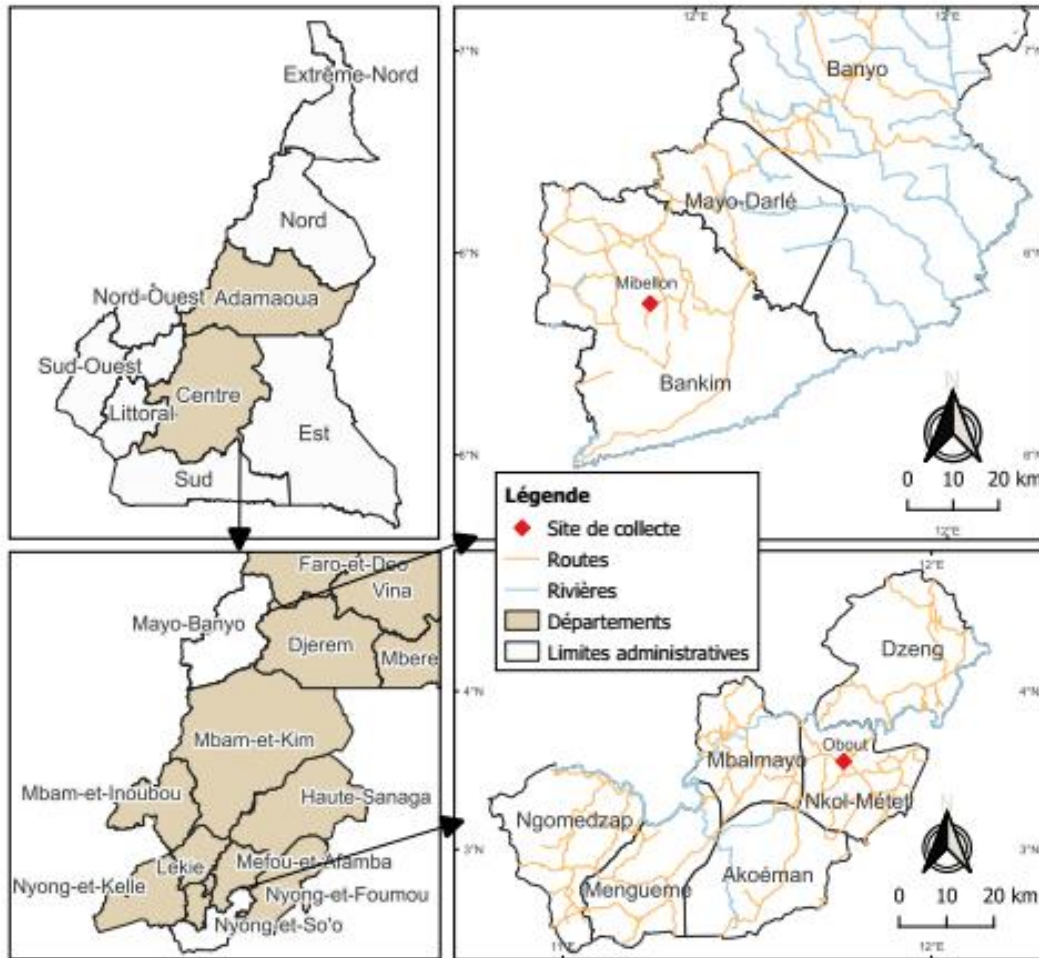


Figure 12 : Localisation des sites de l'étude (Obout et Mibellon).

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Evaluation de l'impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires (sialome) chez les populations sauvages d'*Anopheles funestus*

Cette partie a été réalisée dans le but d'identifier les gènes codant pour les protéines salivaires qui sont différemment exprimés entre les populations de moustiques résistants et les moustiques sensibles aux pyréthrinoïdes. Pour ce faire, les moustiques collectés sur le terrain et élevés à l'insectarium du CRID ont été utilisés pour sélectionner les souches sensibles et les souches résistantes chez lesquelles les glandes salivaires ont été extraites et utilisées pour le séquençage de l'ARN.

II.2.1.1. Collecte, élevage et identification des moustiques

II.2.1.1.1. Collecte des moustiques

Les collectes de moustiques pour cet objectif ont été effectuées dans la localité d'OBOU pendant 10 jours tous les mois ceci pendant 4 mois au cours de l'année 2016. Ces moustiques ont été collectés au stade adulte et vivant (fig.13b). Brièvement, à l'aide d'un aspirateur électrique (appelé Prokopack) (fig. 13a), les moustiques femelles gorgés ont été récoltés de 6h à 10h pendant qu'ils étaient au repos sur les murs à l'intérieur des maisons d'habitation. Ils ont été ensuite transférés dans des cages et transportés à l'insectarium du laboratoire pour élevage. Une fois à l'insectarium, les moustiques ont été identifiés morphologiquement à l'aide des clés spécifiques d'identification (Gillies & Coetzee, 1987; Gillies & De Meillon, 1968). Les critères morphologiques utilisés étaient notamment la taille du moustique, l'alignement des tâches noires et pâles sur les ailes, la couleur des pattes, et la couleur des palpes. Les espèces du groupe *Anopheles funestus* sont généralement de plus petite taille que celles du complexe *Anopheles gambiae*. Leurs pattes présentent un aspect uniforme et noir alors que chez *An. gambiae* les pattes sont mouchetées. Les palpes chez *An. funestus* possèdent trois taches blanches dont deux en position distales de taille identiques mais plus large que celle en position proximale (Annexe 1, fig. 13c).

Après l'identification morphologique, les femelles gorgées ont été regroupées par espèces puis maintenues en cage pendant 4 jours pour la maturation des œufs correspondant à la durée de leur cycle gonotrophique. Les femelles ayant pondu ont été conservées au congélateur à -20 °C pour des analyses ultérieures.



Figure 13 : Dispositif de collecte des moustiques adultes à l'intérieur des maisons et d'identification des moustiques adultes au laboratoire. a : aspirateur électrique ; b : collecte des moustiques au stade adulte et vivant ; c : identification des moustiques.

II.2.1.1.2. Elevage des moustiques à l'insectarium

Les moustiques conservés dans les cages durant 4 jours ont été mis en ponte forcées suivant la méthode décrite par Morgan *et al.* (2010). Cela consistait à mettre individuellement les femelles gravides dans les microtubes Eppendorf de 1,5 ml contenant à leur fonds, du papier filtre humide pour leur permettre de pondre des œufs (fig.14a). Les œufs ainsi recueillis ont été mis dans des bacs en plastique contenant de l'eau minérale pour éclosion des œufs (fig.14bc). Une quantité de nourriture (Tetramin) composée de poisson et sous-produits de poisson, céréales, levures, extraits de protéines végétales, mollusques et crustacés, huiles et graisses, algues, sucre, minéraux était ajoutée aux bacs chaque jour et l'eau des bacs était changée tous les deux jours jusqu'au stade nymphal. Après la nymphose, les nymphes obtenues étaient transférées dans des gobelets en plastique puis placées dans des cages où les adultes qui émergeaient étaient nourris avec une solution de sucre à 10 % imbibée sur du coton immergeant dans un tube falcon en plastique placé dans une cage à moustiques. Cette solution sucrée était changée tous les deux à trois jours. Chaque cage était munie d'une fiche sur laquelle était mentionné : le nom de l'espèce, le lieu/ville d'origine, le mode de collecte, la date de mise en cage des nymphes, la date d'émergence. L'insectarium disposait d'un humidificateur qui contrôlait la température ($26^{\circ}\text{C} + \text{ou} - 1$ pour les adultes et $28^{\circ}\text{C} + \text{ou} - 1$ pour les larves) et le taux d'humidité ($75\% + \text{ou} - 5\%$). Pour éviter la prédation des moustiques adultes par les fourmis, les pieds des étagères reposaient dans des petits gobelets contenant de l'eau et du liquide vaisselle.

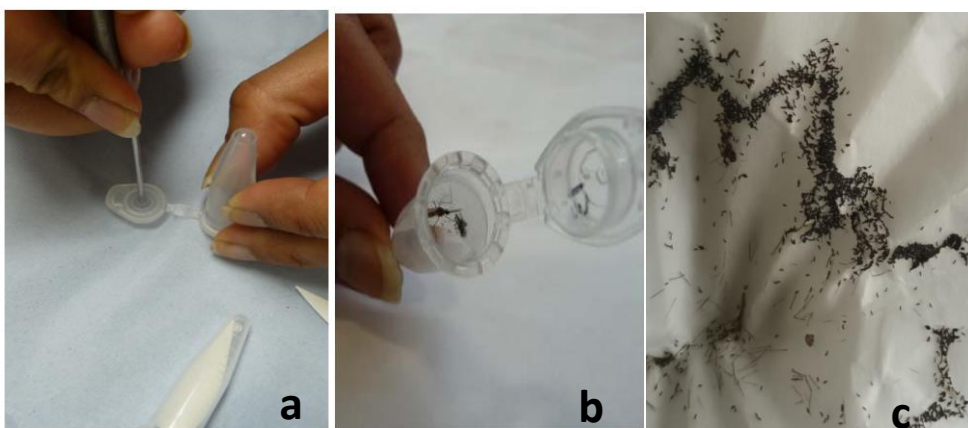


Figure 14 : Illustration de la technique de ponte forcée des anophèles. a : microtubes Eppendorf de 1,5 ml contenant à leur fonds, du papier filtre humide ; b : femelles gravides dans les tubes eppendorf ; c : Œufs d'*Anopheles funestus* recueillis.

II.2.1.1.3. Identification moléculaire des espèces du groupe *Anopheles funestus*

Le groupe *An. funestus* étant constitué d'un ensemble d'espèces morphologiquement identiques, se basant sur les clés dichotomiques de Gillies et De Meillon, (1968) et de Gillies et Coetzee, (1987), il était impossible de savoir spécifiquement avec quelle espèce l'ensemble des travaux de la thèse était réalisé. Pour cela, il a fallu recourir à l'identification sur la base des marqueurs moléculaires qui seuls permettent de différencier les espèces du groupe *An. funestus*. De ce fait, après l'identification morphologique, l'ADN génomique (ADNg) était extrait individuellement chez chacun des moustiques femelles ramenés du terrain après que celles-ci aient pondu des œufs. L'extraction était faite en utilisant le protocole décrit par Livak *et al.* (1984). Les ADN extraits étaient ensuite utilisés lors des analyses par la méthode de PCR suivant les protocoles mis en place par des études antérieures (Cohuet *et al.*, 2003; Koekemoer *et al.*, 2002). Le milieu réactionnel de cette PCR était composé de 1 µl d'ADN génomique, 1,5 µl de tampon A à 10×, 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 finale de 15 µL. Après une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 45°C, 40 secondes à 72°C) suivis d'une élongation finale de 5 minutes à 72°C dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Les produits de PCR étaient migrés sur un gel d'agarose 1,5% sous une tension de 150 volts à 300 mA pendant environ 35 minutes. A la fin de l'électrophorèse, le gel était porté dans un Trans-illuminateur à lumière ultraviolette pour la révélation des différents fragments d'amplification.

II.2.1.2. Sélection des souches de moustiques résistantes et des souches de moustiques sensibles aux pyréthrinoïdes dans les populations sauvages d'*Anopheles funestus* d'Obout

La sélection des souches de moustiques résistants et souches de moustiques sensibles aux pyréthrinoïdes s'est faite sur les individus issus des isofamilles constituées à partir des œufs pondus par les moustiques collectés sur le terrain. Pour ce faire, la moitié des individus de chaque isofamille a été exposée à un pyréthrinoïde (la perméthrine concentrée à 0,75%) pendant 1 heure et le taux de mortalité a été relevé au bout de 24h conformément au protocole mis en place par l'OMS. Les isofamilles présentant un taux de mortalité de 100% étaient considérées comme « **sensibles** ». Cependant, les familles avec une mortalité < 40% étaient considérées comme « **résistantes** ». Le reste de moustiques des familles identifiées comme « **résistantes** »

« témoins »). Les moustiques ont été disséqués sous un stéréomicroscope de marque Leica EZ4E (Heerbrugg, Switzerland) à l'objectif 4X et à l'aide d'une paire de minuties. Ils ont été au préalable anesthésiés à l'aide d'une solution de chloroforme et par la suite rincés successivement dans de l'alcool à 70 % et du PBS 1X. Chaque moustique a été ensuite étalé sur une lame de verre contenant une goutte de PBS 1X. Les pattes et les ailes ont été enlevées pour faciliter la dissection des glandes salivaires. Le moustique a été immobilisé en tenant le thorax grâce à une minutie et à l'aide d'une autre minutie la tête a été délicatement retirée. Tout en maintenant le thorax du moustique avec la minutie, ensuite l'autre minutie a été utilisée pour pousser doucement sur le thorax. Les glandes salivaires situées dans la partie antérieure du thorax pouvaient alors être isolées en utilisant une minutie et en coupant les pièces jointes qui relient les glandes au thorax. Les glandes salivaires ont été par la suite recueillies dans un microtube (un lot de 40 paires de glandes pour chaque phénotype : « résistant », « témoin » et « sensible » respectivement) contenant 40µl d'une solution de RNAlater (solution tampon qui empêche la dégradation des protéines) puis conservé au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures puis transféré au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'extraction de l'ARN, la synthèse du cDNA et le séquençage (fig.16).



Figure 16 : Dispositif de dissection pour l'extraction des glandes salivaires d'*Anopheles funestus*.

II.2.1.4. Séquençage de l'ARN

Le but du séquençage de l'ARN a été de rechercher les gènes différemment exprimés entre les souches de moustiques « résistantes » (R), « Témoin » (C) et « Sensible » (S).

Extraction des acides ribonucléiques (ARN) et préparation des librairies pour le séquençage

II.2.1.4.1.1. Extraction des acides ribonucléiques (ARN)

L'extraction de l'ARN total a été réalisée sur les pools de 30 paires de glandes salivaires extraites sur les différentes souches de moustiques établies après exposition à la perméthrine.

On disposait pour cette analyse de trois répliques de 30 paires de glandes salivaires par réplique pour les souches « Résistantes » (R), les souches « Susceptibles » (S) et les souches « Témoins » (C). L'extraction a été réalisée à l'aide du Mini kit RNAeasy de Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, Californie, États-Unis). Après extraction, l'ARN total a été quantifié en utilisant une puce Agilent 2100 Bioanalyzer Nano Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, États-Unis) et en analysant le « RNA Integrity Number » (*RIN*) (en français Numéro d'intégrité de l'ARN) compris entre 1 et 10, où un score de 10 indique un ARN de bonne qualité alors qu'un score inférieur à 6 indique un ARN de mauvaise qualité (fig. 17). Le RIN permet à la fois d'évaluer l'intégrité de l'ARN et de comparer les échantillons (Schroeder *et al.*, 2006). Les extraits d'ARN des glandes salivaires d'*An. funestus* (résistant, témoin et sensible) de bonne qualité ont été envoyés au centre de recherche génomique (CGR) de l'Université de Liverpool pour le séquençage et les résultats bruts ont été renvoyés pour la réalisation des analyses.



Figure 17 : Bioanalyzer Agilent 2100 permettant de visualiser les échantillons d'ARN total.

II.2.1.4.2. Traitement et analyse des données de séquençage

II.2.1.4.2.1 Analyse bio-informatique

L'analyse bio-informatique des données générées par le séquençage nécessite le recours à un ensemble d'étapes incluant notamment des outils pour l'alignement des séquences, la détection et l'annotation. L'alignement a consisté à disposer des séquences de nucléotides ou d'acides aminés les unes au-dessous des autres afin de les comparer avec la séquence du génome de référence pris dans une banque de données (VectorBase). Pour ce faire, nous avons utilisé comme modèle, un génome de référence (base de données de séquences nucléiques faisant consensus pour une espèce, représentant l'assemblage du génome de différentes souches). Le

logiciel « aligne », de la manière la plus pertinente possible, sur ce génome de référence toutes les séquences de quelques centaines de bases, en comparant une par une toutes les séquences avec la séquence d'ARN du génome de référence. Au terme de cette étape, les données des séquences sont produites et groupées au format FASTQ qui stocke la séquence d'ADN de chaque lecture avec un indicateur de position spécifique.

Pour l'étape d'annotation, il s'est agi d'identifier les gènes exprimés de façon différente entre les moustiques résistants et les moustiques sensibles. Pour cela, le logiciel Blast2GO a été utilisé pour l'annotation fonctionnelle des données des séquences (Conesa *et al.*, 2005).

II.2.1.4.2.2 Analyse statistiques des données

L'analyse statistique des données du séquençage de l'ARN a été basée sur la comparaison des niveaux d'expressions différentielles des gènes codant pour les protéines dans les glandes salivaires d'*Anopheles funestus* en fonction du statut de résistance à la perméthrine. Pour ce faire, on a comparé tour à tour, les souches « Résistantes » avec les souches « Sensibles » ; les souches « résistantes » avec les souches « Témoin » et enfin, les souches « Sensibles » avec les souches « Témoin ». L'analyse était faite en utilisant la fonction DEseq2 (conçu pour la normalisation, la visualisation et l'analyse différentielle de données de comptage à haute dimension) du logiciel STRANG NGS. Le paramètre utilisé pour comparer l'expression différentielle entre deux groupes a été le facteur de variation (« Fold Change » en anglais ou FC). Les critères utilisés étaient les suivants :

- $\text{Log}_2\text{FC} > 0,58$, c'est-à-dire qu'un gène était considéré différemment exprimé entre deux souches si, son niveau d'expression était de 1,5 différent entre les 2 souches
- La différence d'expression était significative avec une $\text{FDR} < 0,05$ (ou False discovery rate en anglais) ou la valeur de la valeur de P ajustée en français par le test de Bonferoni qui augmente la puissance statistique.

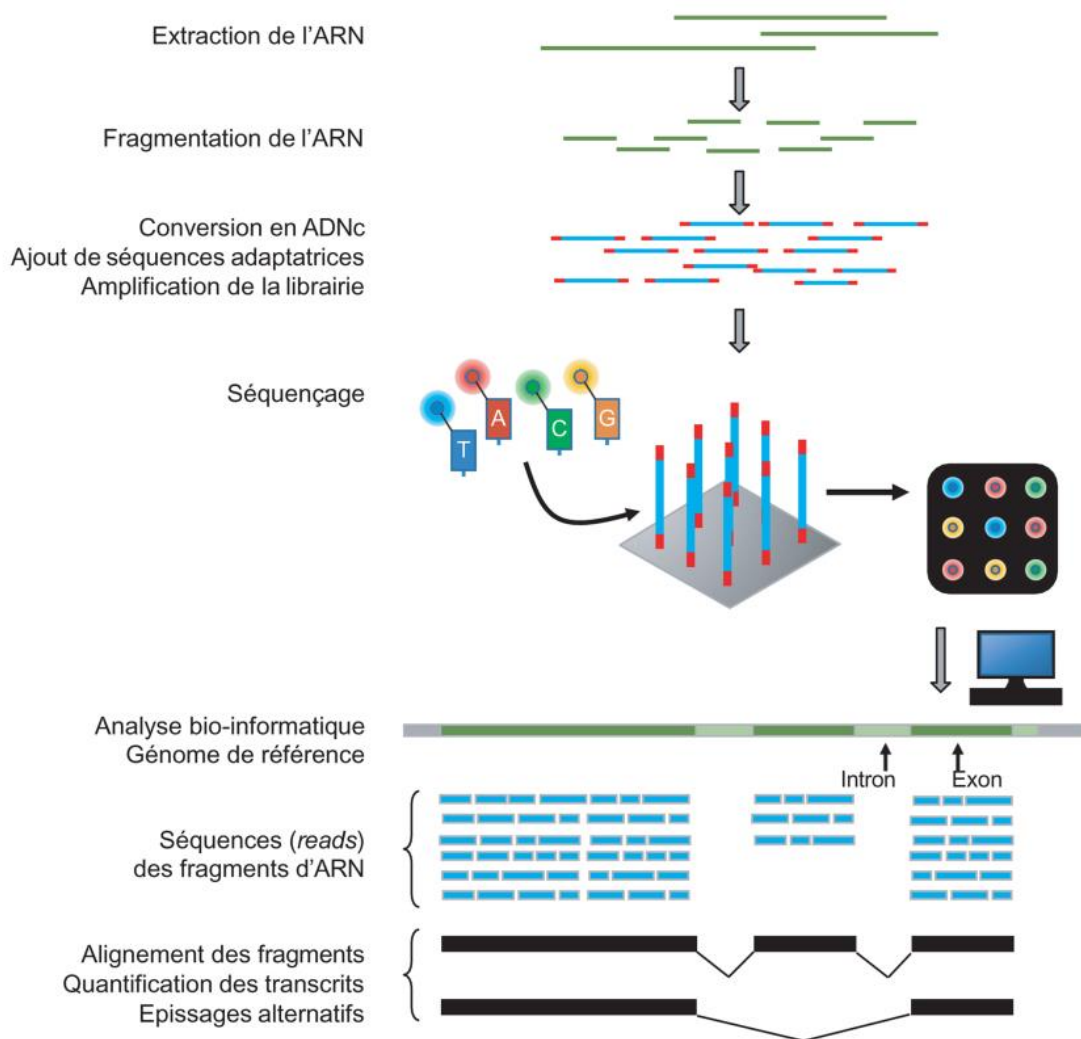


Figure 18 : Etapes du séquençage des banques d'ADN complémentaires (F. Uhel L. Zafrani ; 2019).

II.2.2. Evaluation de l'impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur le déroulement de prise de repas sanguin chez *Anopheles funestus*

Cette partie a été réalisée dans le but d'investiguer si les différences d'expression des protéines salivaires observées entre les souches de moustiques résistantes et les souches sensibles pourraient influencer le déroulement du repas sanguin d'*An. funestus*. La distinction entre ces deux groupes était faite au niveau génotypique en utilisant notamment deux marqueurs moléculaires à savoir : les mutations *L119F GSTe2* et *CYP6P9a/b* de la résistance métabolique chez *An. funestus* récemment développés par Riveron *et al.* (2014) et Weedall *et al.* (2019) respectivement.

II.2.2.1. Collecte et élevage des moustiques

Pour la réalisation de cet objectif, nous avons travaillé avec deux souches différentes du moustique *Anopheles funestus* :

- Pour évaluer l'impact de la mutation *L119F-GSTe2* impliquée dans les mécanismes de résistance métabolique aux insecticides sur le processus du repas sanguin, nous avons travaillé avec des souches de moustiques collectées pendant 4 jours par mois ceci pendant 5 mois (Mars, Avril, Mai, Juin, Juillet) au cours de l'année 2018 dans la localité de MIBELLON. Dans cette localité, des travaux antérieurs et récents ont rapporté que la résistance aux pyréthrinoïdes chez les populations d'*Anopheles funestus* était significativement associée à la mutation L119F du gène *GSTe2* chez cette espèce de moustique (Menze *et al.*, 2016).

- Pour évaluer l'impact des gènes *CYP6P9a/b* impliqués dans les mécanismes de résistance métabolique aux insecticides nous avons travaillé avec deux souches collectées sur le terrain et colonisées au laboratoire à savoir : (i) la souche FUMOZ, résistante à tous les insecticides et originaire du Mozambique, et (ii) la souche FANG, sensible à tous insecticides et originaire de l'Angola. Ces souches ont été utilisées du fait des marqueurs de résistance *CYP6P9a/b* absents dans la population de *Anopheles funestus* en Afrique Centrale sont, mais reportés en Afrique de l'Est et du Sud (Weedall *et al* 2019). A cet effet nous avons procédé à des croisements réciproques multiples entre la souche sensibles (FANG) et la souche résistante (FUMOZ) pour obtenir des hybrides avec une résistance intermédiaire portant un bagage génétique semblable. Pour nos différentes analyses, nous avons travaillé avec des individus obtenus des générations G4 à G8.

II.2.2.2. Evaluation de l'impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur le déroulement et le succès du repas sanguin par *Anopheles funestus*

Le repas sanguin permet à la femelle du moustique fécondé d'assurer la maturation et la production de ses œufs. Le succès de la prise de ce repas sanguin dépend de beaucoup de paramètres importants et distincts tels que : la recherche de l'hôte, la durée de sondage du site de piqûre, la durée d'alimentation et surtout le volume de sang pris (Ribeiro *et al.*, 1984). Dans cette partie du travail nous nous sommes intéressés à évaluer si la résistance aux pyréthrinoïdes aurait un impact sur ces différents paramètres et par conséquent sur le déroulement du repas sanguin.

II.2.2.2.1. Impact de la résistance sur le temps de sondage et la durée d'alimentation du vecteur sur l'homme

Des études antérieures ayant démontré que le poids du moustique pouvait influencer le volume de repas sanguin pris par ce dernier, la première étape de nos analyses a été de nous assurer de travailler avec des moustiques de poids égaux. Pour cela, les individus utilisés pour

cette expérience ont été au préalable regroupé en fonction de leur poids. Ce dernier a été déterminé en pesant individuellement, à l'aide d'une microbalance analytique (SARTORIUS, Goettingen, Allemagne) des femelles âgées de 3 à 7 jours et mises à jeun 24 heures avant (figure 19 A). Après la pesée, les moustiques de poids égal ont été regroupés ensemble. Les moustiques étaient ensuite maintenus dans des gobelets en papier pendant environ une heure avant qu'un repas de sang leur soit offert. L'avant-bras nu d'un volontaire humain leur était présenté pendant 30 minutes pour qu'ils puissent y prendre leur repas sanguin (fig. 19 B). Le volontaire humain a été inclus dans l'étude seulement après qu'il ait donné son consentement éclairé. Il ne courait aucun risque d'infection par *Plasmodium* car les expériences étaient réalisées avec les moustiques de la G₁ obtenus au laboratoire et donc non-infectés par les parasites.

Le temps de sondage et la durée d'alimentation sont deux paramètres distincts qui se définissent comme étant le temps écoulé entre l'insertion initiale des pièces buccales dans la peau et l'engorgement initial du sang (Ribeiro, 2000) ; et le temps mis entre l'insertion initiale des pièces buccales et le retrait du proboscis respectivement. Ces paramètres ont été évalués sur un échantillon de 120 femelles issues de la souche de moustique collectée à Mibellon. À cet effet, les moustiques ont été transférés individuellement dans des gobelets en polystyrène recouverts d'une tuile moustiquaire (fig.19 C). Ils étaient laissés au repos pendant 30 minutes avant le début des observations. Pendant la durée de l'expérimentation, chaque moustique était filmé à l'aide d'une caméra vidéo numérique HD (Canon PC2154, Canon INC, Japon) placée à proximité du gobelet. A la fin de l'expérimentation, la vidéo de chaque moustique a été analysée et les paramètres tels que : (i) le temps de sondage et (ii) la durée totale de prise de sang, ont été enregistrés à l'aide d'un minuteur numérique. Les médianes du temps des sondages et de la durée du repas ont été estimées pour chaque génotype et comparées par un test de Mann-Whitney.

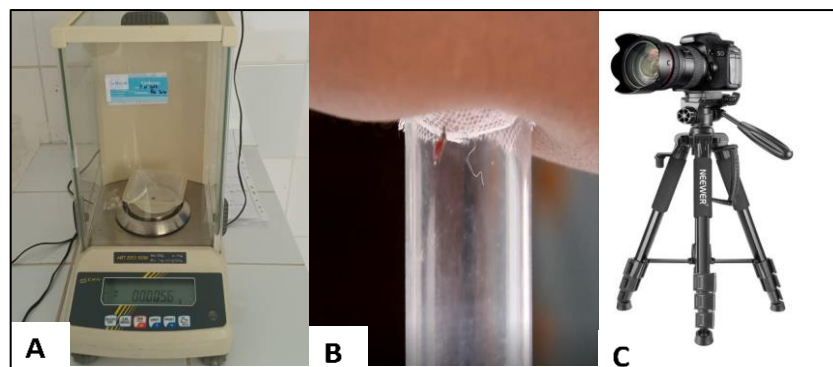


Figure 19 : Dispositif de pesée et d'engorgement des moustiques. A : microbalance analytique ; B : gobelets en polystyrène recouverts d'une tuile moustiquaire ; C : caméra vidéo numérique HD (Canon PC2154, Canon INC, Japon).

II.2.2.2.2. Quantification du volume de sang pris par les moustiques

Pour évaluer l'impact de la résistance aux pyréthriinoïdes sur le volume de sang pris par le moustique *An. funestus*, une deuxième expérience d'engorgement des moustiques a été réalisée. A cet effet, les individus issus des moustiques collectés sur le terrain tout comme ceux issus du croisement entre les souches FANG et FUMOS ont été utilisés. Pour chaque souche de moustiques, des lots de 25 moustiques groupés selon leur poids ont été autorisés à piquer sur le bras d'un volontaire humain. Au terme de l'expérience, l'abdomen entier des moustiques qui se sont engorgés avec succès (le succès de l'engorgement était apprécié par la coloration rouge de l'abdomen du moustique) a été extrait, transféré et conservé dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à -20°C. Le reste des carcasses ainsi que les moustiques qui ne se sont pas gorgés ont été conservés individuellement dans des tubes Eppendorf contenant une solution de RNAlater et stockés à -20°C.

La taille du repas de sang ingéré par chaque moustique a été déterminée en quantifiant l'hémoglobine humaine dans l'abdomen du moustique suivant le protocole décrit par Briegel *et al.* (1979). Pour ce faire, les abdomens des moustiques gorgés de sang ont été homogénéisés dans 0,5 ml de réactif de Drabkin (bicarbonate de sodium, carbonate de potassium, cyanure de potassium, ferricyanure de potassium) qui convertit l'hémoglobine en cyanure d'hémoglobine (HiCN). Après 20 minutes à température ambiante et l'ajout de 0,5 ml de solution de chloroforme, les échantillons étaient centrifugés à 5600 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant aqueux contenant le HiCN était par la suite transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. Un aliquot de 200 µl de chaque échantillon était déposé dans une microplaque et la densité optique (DO) était lue à une longueur d'onde de 620 nm dans un spectrophotomètre (EZ Read 400, biochrom, Cambridge, UK). Les densités optiques (DO) de chaque échantillon étaient lues en double et la valeur moyenne entre les deux répliques était considérée comme la valeur de DO de l'échantillon. Parallèlement, les DO étaient également lues dans les puits des microplaques dans lesquels l'on a déposé le réactif de Drabkin mélangé avec du sang total prélevé chez le volontaire humain ayant permis d'engorger les moustiques. Ces échantillons ont été utilisés comme « témoins » et les valeurs des moyennes de leurs DO ont permis de tracer une courbe standard et obtenir une droite de régression. La projection des DO de chaque échantillon testé sur cette droite de régression et surtout l'équation qui en résultait, a ensuite permis d'estimer la taille du repas de sang présent dans l'abdomen de chaque moustique. La quantité de sang ingérée a été estimée en fonction du poids en divisant le volume sanguin déterminé à l'aide de la droite de régression par le poids moyen de chaque lot de

moustiques constitué après la pesée. La taille du repas sanguin a ensuite été exprimée en μL de sang par mg de poids ($\mu\text{l}/\text{mg}$) pour limiter les biais qui pourraient être liés au poids des moustiques.

Les carcasses ont été utilisées pour déterminer la répartition des génotypes (RR, RS et SS) du gène *L119F-GSTe2* pour les souches de moustiques collectés sur le terrain et des gènes *Cyp6p9a* et *Cyp6p9b* pour les moustiques issus du croisement entre les souches de laboratoires (FANG et FUMOZ).

II.2.2.3. Détermination des génotypes des gènes de résistance

II.2.2.3.1. Détermination des génotypes de la mutation L119F dans le gène *GSTe2* chez les souches de terrain d'*Anopheles funestus*

La détermination de la distribution des génotypes de la mutation *L119F-GSTe2* au sein du sous échantillon utilisé a été faite par la technique de PCR Allèle Spécifique suivant le protocole précédemment décrit par Tchouakui *et al.* (2018) sur l'ADN génomique extrait de carcasses de souches de moustiques collectées sur le terrain. Deux paires d'amorces ont été utilisées pour cette technique à savoir deux amorces externes et deux amorces internes :

Nedel-GSTe2 reverse : 5'TTCCTCCTTTTTACGATTTCGAACT3',

Xbal-GSTe2 forward : 5'ATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT3',

L119 Full-Résistant : 5'CGGGAATGTCCGATTTCCGTAGAATAAA3',

L119 Full-Susceptible : 5'CATTTCTTATTCTCATTACAGGAGCGTAATC3.

Le milieu réactionnel contenait : 1 μl d'ADN génomique, 1,5 μl de tampon A à 10 \times (Buffer A, Qiagen), 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl_2), 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 finale de 15 μL . Après une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, 30 cycles d'amplification ont été réalisés (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C, 1 minute à 72°C) suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Les produits amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% contenant 1 μl de Midori Green (intercalant de l'ADN double brin) suivant la procédure précédemment décrite plus haut. La taille de la bande de diagnostic était de 523 pb pour les homozygotes résistants (RR) et de 312 pb pour les homozygotes sensibles (SS), alors que les deux bandes étaient hétérozygotes (RS).

II.2.2.3.2. Détermination des génotypes de l'allèle CYP6P9a/b-R chez les moustiques issus du croisement entre les souches de laboratoire d'*Anopheles funestus*

La détermination de la distribution des génotypes de la mutation *CYP6P9a* et *CYP6P9b* au sein du sous échantillon utilisé ont été faite par la technique PCR-RFLP récemment décrite par Weedall *et al.* (2019) en utilisant l'ADN génomique extrait des carcasses des individus obtenu à partir des croisements réciproques entre les souches FANG et FUMOZ. Les produits de digestions étaient du tampon cutSmart, l'enzyme Taq1 (New England Biolabs) pour *CYP6P9a* ; et du tampon CutSmart, et l'enzyme de restriction Tsp45I (New England Biolabs) pour le *CYP6P9b*. La séparation des tailles a été effectuée sur un gel d'agarose à 2,0 % coloré avec du Midori Green Advance à 100 V pendant 30 minutes. Le gel a été visualisé à l'aide du système d'imagerie du gel pour confirmer les tailles du produit. Pour *CYP6P9a* il apparaît une bande à 350 pb pour l'échantillon résistant et deux bandes (350 pb et 450 pb) pour les hétérozygotes et les sensibles ne sont pas digérés (450 pb). Pour le *CYP6P9b* il apparaît une bande à 550 pb pour l'échantillon résistant (non digéré) et deux bandes à 400 pb et 150 pb pour les échantillons sensibles. Après avoir détecté et regroupé (RR, RS, SS) les différents génotypes de nos échantillons, nous avons étudié leur association avec les valeurs des différents paramètres importants du repas sanguin du moustique tel que : le poids du moustique, temps de sondage, la durée du repas sanguin et la taille du repas sanguin.

II.2.2.3.3. Etude de la relation entre les gènes de résistance métabolique et l'expression des gènes codant pour les protéines salivaires impliquées dans le déroulement du repas sanguin

Les protéines salivaires du moustique hématophages facilitent le bon déroulement du repas sanguin en neutralisant la réaction de l'hôte. Nous avons également observé à l'objectif 1 que l'expression de certains gènes codant pour les protéines impliquées dans le repas pouvait être influencée par les mécanismes de résistance. L'analyse faite dans cette partie de notre étude avait pour but d'investiguer si l'influence de la taille du repas sanguin par les mécanismes de résistance aux insecticides était associée à la modulation par ce phénomène, du niveau d'expression des gènes codant pour les protéines salivaires impliquées dans le déroulement du repas sanguin du moustique. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines salivaires suivantes :

- ❖ **Apyrase** et **5'nucléotidase** connues pour faciliter l'acquisition d'un repas sanguin par la dégradation de l'adénosine diphosphate (ADP), un médiateur de l'agrégation plaquettaire et de l'inflammation (Lombardo *et al.* 2000) ;
- ❖ la famille des protéines **D7** : qui ont des propriétés vasodilatatrice, d'agrégation plaquettaire et d'induction de la douleur (Calvo *et al.* 2006) ;
- ❖ la Protéine antiplaquettaire anophélienne (**AAPP**) : qui présente une forte activité antiplaquettaire lorsqu'elle se lie directement au collagène de l'hôte (Calvo *et al.* 2007) ;
- ❖ La protéine **cE5/anophelin** (peptide anti-thrombine) qui inhibe la coagulation (Valenzuela *et al.* 1999) ;
- ❖ **gSG6** qui est une petite protéine dont la fonction est inconnue, mais son inhibition entraîne une augmentation du temps de sondage et une réduction de la capacité à se nourrir de sang chez *An. gambiae* (Lombardo *et al.* 2009) ;
- ❖ la famille de protéines **gSG7** inhibiteurs anti-complémentaires (Mendes-Sousa *et al.*, 2016).

Le profil d'expression de ces gènes a été analysé par la technique de qPCR (PCR quantitative) et comparée entre les souches de moustiques *An. funestus* portant le génotype homozygote résistant (RR), hétérozygote résistant (RS) ou homozygote sensible (SS) du gène *CYP6P9a* responsable de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus*. Une série de 16 gènes a été sélectionnée et conçue de la manière suivante : Pour chaque gène, deux paires d'amorces jonction exon-exon ont été conçues à l'aide du logiciel en ligne Primer3 (v4.0.0 ; <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Seules les amorces ayant une efficacité de PCR comprise entre 90 et 110 %, déterminée à l'aide d'une série de dilutions d'ADNc obtenues à partir d'un seul échantillon, ont été utilisées pour l'analyse par qPCR. Compte tenu de ce critère d'efficacité seuls l'AAPP et quatre membres des gènes de la famille D7 (D7r1, D7r2, D7r3 et D7r4) ont été utilisés pour cette analyse. Le test t de Student nous a permis de comparer le niveau d'expression des gènes entre les différentes souches de moustiques. L'estimation des rapports de côte a été réalisée à l'aide du test probabiliste de Fisher.

II.2.3. Conséquences de la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez *Anopheles funestus*

Cette partie de la thèse visait à investiguer si la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux insecticides pourrait avoir une influence sur la capacité du moustique *An. funestus* à héberger les espèces de *Plasmodium* dans les glandes salivaires. Pour ce faire, après avoir infecté de manière artificielle les souches d'*An. funestus* par une souche sauvage de *Plasmodium falciparum*, nous avons évalué et comparé l'intensité de l'infection par les sporozoïtes entre les moustiques résistants et les moustiques sensibles aux pyréthrinoïdes. Pour déterminer le statut de moustique résistant et de moustique sensible, nous nous sommes focalisés sur la mutation *L119F-GSTe2* qui confère la résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus*. Les différentes activités menées dans le cadre de la mise en œuvre de cet objectif ont consisté à : (i) la collecte sur le terrain et l'élevage de moustique à l'insectarium, (ii) le recrutement des porteurs de gamétocytes à travers les enquêtes parasitologiques, (iii) la réalisation des infections expérimentales des moustiques avec la souche sauvage de *P. falciparum*, (iv) l'estimation de la prévalence et de la densité des sporozoïtes de *P. falciparum* dans les glandes salivaires des moustiques.

II.2.3.1. Procédures éthiques et population d'étude

Une procédure éthique est un ensemble de valeurs basées sur des critères moraux que les participants doivent adopter et mettre en œuvre pour le bon fonctionnement de l'étude. L'enquête parasitologique a été faite dans le but de recenser les différents enfants porteurs de gamétocytes qui devraient nous être utiles pour infecter les moustiques. Pour ce faire, une demande a été faite auprès du Comité national d'éthique de la recherche pour la santé humaine (N°2016/07/791/CE/CNERSH/SP) pour obtenir un accord. Ensuite les autorisations administratives ont été obtenues auprès du médecin-chef de l'hôpital de district de Mfou. Notre population cible était constituée d'enfants inscrits à l'école primaire de la localité d'Obout. Elle regroupe ainsi les enfants âgés de 5 à 14 ans, représentant la tranche d'âge la plus exposée au risque d'infection palustre (Rogier., 2003 ; Kolk *et al.*, 2003). Seuls les enfants pour lesquels nous avons reçu l'accord du parent ou du tuteur légal ont été inclus dans l'étude. L'anonymat des participants a été respecté en codifiant les échantillons de sang. Ceux-ci ont été strictement utilisés pour répondre aux objectifs définis dans le cadre de ce projet de thèse. Avant le début de l'enquête, une note de sensibilisation a été transmise aux parents d'élèves et au directeur de

l'école afin de leur expliquer les objectifs et le protocole relatif à l'étude. Les enquêtes parasitologiques ont été effectuées en collaboration avec l'hôpital de district de Mfou. En effet, un infirmier et un technicien de laboratoire de cette structure sanitaire ont participé à la confection des gouttes épaisses et le médecin-chef a assuré le traitement et le suivi thérapeutique des patients. Le consentement des parents a été obtenu avant l'inclusion des enfants pour les infections à Yaoundé (OCEAC).

II.2.3.2. Origine des moustiques utilisés

Pour cette partie du travail nous avons utilisé les individus âgés de 3 à 6 jours de la 1^{ère} génération issus des femelles gorgées d'*An. funestus* collectées en 2019 dans la localité de Mibellon pendant 1 mois. La mutation étudiée étant le *L119F-GSTe2* du fait de sa présence signalée en Afrique Centrale. Les moustiques ont été collectés à l'aide d'un aspirateur électrique à l'intérieur des maisons d'habitation et transférés à l'insectarium pour élevage jusqu'à la première génération (G1). Ils ont été identifiés sur la base des critères morphologiques des clés d'identification de Gillies et Coetzee (1987). Par la suite les tests moléculaires ont été faite pour identifier les membres du groupe *An. funestus* que nous avons utilisés.

II.2.3.2. Détection et sélection des porteurs humains de gamétocytes de *Plasmodium falciparum*

La sélection des porteurs de *Plasmodium* a été effectuée par des dépistages actifs sur les enfants dans les écoles de la localité d'Obout. L'objectif du dépistage actif a été de sélectionner dans la population humaine asymptomatique, des individus ayant les plus fortes densités gamétocytaires pour *P. falciparum*. Pour chaque individu dépisté, un test de diagnostic rapide (TDR) (Malaria Pf/Pan, SD Bioline ®) et des frottis sanguins en deux exemplaires (deux lames constituées chacune d'un frottis épais et d'un frottis mince) ont été effectué. L'évaluation de la parasitémie et le choix du porteur ont été basés sur la lecture microscopique des frottis, test de référence. Après coloration avec une solution de Giemsa 10 %, les goutte épaisses ont été observées au microscope en immersion à un grossissement 100X. Tous les individus présentant les stades asexués de *Plasmodium* dans le sang ont reçu un traitement antimalarique de 3 jours suivant les recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme.

II.2.3.3. Infections expérimentales des moustiques avec *Plasmodium falciparum*

Pour réaliser les infections expérimentales d'*Anopheles funestus* avec les gamétocytes de la souche sauvage de *Plasmodium falciparum*, un volume de 5 ml du sang a été récolté dans

un tube à héparine au pli du coude d'un enfant infecté par ce stade du parasite. Toutes les expérimentations étaient faites suivant le protocole décrit par Vallejo *et al.* (2016). Afin de limiter l'effet des facteurs immuns pouvant bloquer la transmission du parasite chez le moustique, le sérum du porteur a été remplacé par un sérum « non-immun » de donneurs ne vivant pas en zone d'endémie palustre selon le protocole décrit par Boudin *et al.* (2005). Le sang a été maintenu à 37 °C dans un bain-marie jusqu'à la distribution dans les cellules d'engorgement.

Pour optimiser le taux d'engorgement, 80 à 100 moustiques femelles ont été transférées délicatement à l'aide d'un aspirateur à bouche, dans un gobelet en papier carton. L'ouverture du gobelet a été recouverte d'un voile moustiquaire maintenue par des élastiques. Les moustiques ont été laissés au repos et privés de jus sucré pendant au moins 24 heures avant l'infection. Le dispositif d'infections était constitué de cellules d'engorgement en verre de silice reliées entre-elles par des tuyaux faisant circuler de l'eau chauffée à 37 °C grâce au bain marie (Fig. 20) sur une barre servant de support. Chaque cellule comprenait un circuit interne de régulation thermique et un circuit externe pour l'introduction du sang. La surface basale de chaque cellule était recouverte d'une membrane de parafilm étirée au travers de laquelle les moustiques étaient appelés à prendre du sang (Rutledge *et al.*, 1964). Une quantité de 400 µl de sang infecté a été distribuée dans chaque cellule et les moustiques ont été gorgés pendant 30 min, à l'abri du vent et de la lumière. Après l'engorgement, les femelles ont été transférées dans une cage et ont été nourries au jus sucré. Elles ont été maintenues à l'insectarium pendant 14 jours après infection correspondant à la période à laquelle les sporozoïtes envahissent les glandes salivaires du moustique. Au terme de ce temps d'observation, chaque femelle gorgée a été utilisée pour la détermination des génotypes du gène *GSTe2*, la prévalence, l'intensité de l'infection, et enfin quantifier l'expression des gènes connus comme récepteurs de *Plasmodium* dans les glandes salivaires en fonction du génotype de résistance par la technique de qPCR.

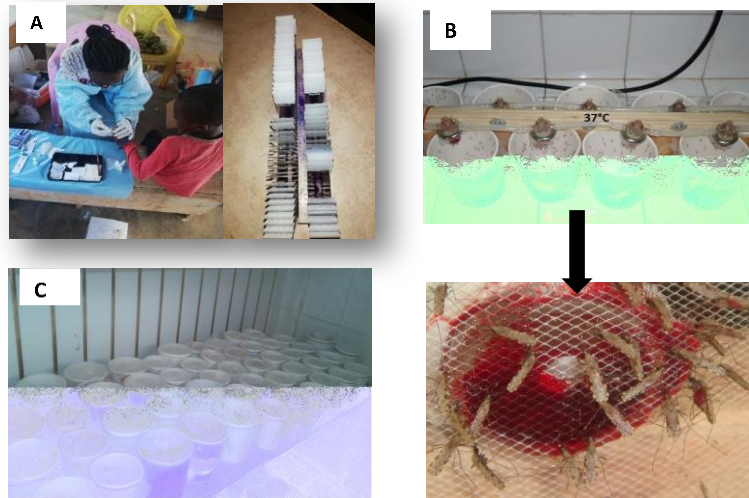


Figure 20 : Dispositif des infections expérimentales des moustiques par les souches sauvages de *Plasmodium falciparum*.

II.2.3.4. Détection de l'infection à *Plasmodium falciparum*, quantification du nombre de copies d'ADN et évaluation du niveau d'expression des gènes chez les moustiques infectés

Cette partie du travail avait pour but d'évaluer et comparer l'intensité de l'infection à *Plasmodium falciparum* entre les moustiques possédant la mutation L119F (RR) et ceux ne la possédant pas (SS). L'ARN et l'ADN de nos échantillons ont été extraits à l'aide du TRIZOL qui offre la possibilité de réaliser les deux types d'extractions sur le même échantillon. L'ADN obtenu nous a permis de détecter la présence du parasite après l'infection et l'ARN nous a permis de déterminer le niveau d'expression des gènes codant pour les protéines décrites comme réceptrices des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Une étude d'association entre niveau d'expression de ces protéines et la résistance aux insecticides induites par la mutation *L119F-GSTe2* a par la suite été réalisée en comparant le niveau d'expression des gènes salivaires entre les moustiques portant les différents génotypes de la mutation. Cette dernière analyse a permis d'évaluer l'association entre les mécanismes de résistance et le niveau d'expression des protéines réceptrices des sporozoïtes de *Plasmodium* dans les glandes salivaires.

II.2.3.4.1. Détection de la présence des plasmodiums dans les glandes salivaires du moustique

La détection de *P. falciparum* après l'infection expérimentale a été faite en utilisant la technique de la PCR TaqMan décrite par Bass *et al.* (2008) pour identifier le gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (ssrRNA) de quatre espèces de *Plasmodium* humains (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. vivax*). Pour cela, l'ADN plasmodial extrait des glandes salivaires a été utilisé pour détecter la présence des sporozoïtes (fig.21).

Le test de χ^2 a ensuite été utilisé pour comparer les proportions de moustiques infectés entre les différents génotypes de la mutation *L119F-GSTe2*.

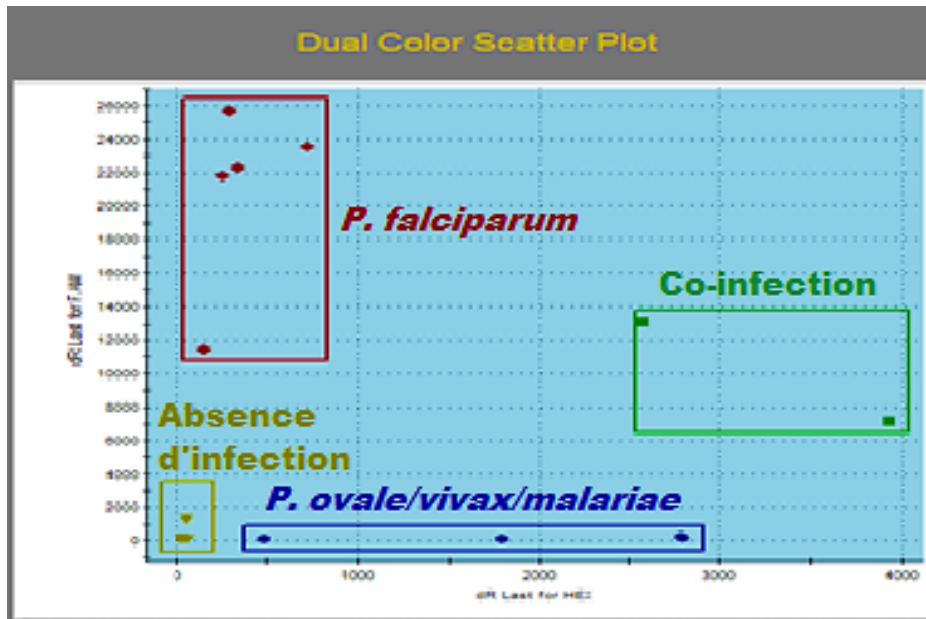


Figure 21 : Illustration d'un résultat de la détection des moustiques infectés par les *Plasmodium* par la technique PCR TaqMan.

NB : La couleur rouge : moustiques infectés par *P. falciparum*, bleue : moustiques infectés par *P. ovale/vivax/malariae*, vert : co-infection et marron : moustiques non- infectés

II.2.3.4.2. Estimation de l'intensité de l'infection plasmodiale dans les glandes salivaires du moustique

Pour l'estimation de l'intensité de l'infection, il a été question de quantifier le nombre de génomes de *Plasmodium* (ou nombre de copies d'ADN) contenus dans les glandes salivaires de chaque moustique. Pour ce faire, une courbe standard a été réalisée à partir d'une série de dilution en cascade de l'ADN de *P. falciparum* extrait de prélèvements sanguins de patients positifs au paludisme. Cette courbe standard nous a permis d'obtenir l'équation de régression suivante : $y = -3.7493x + 43.285$ $R^2 = 0.9985$ (y correspond à la moyenne des Ct de chaque échantillon).

La quantification du nombre de copies d'ADN dans les glandes salivaires de chaque moustique a été obtenue en projetant sur une droite de régression et ce pour chaque moustique, les valeurs de « Ct ou cycle threshold en anglais » ou « seuil de cycle en français » qui correspondait au nombre de cycles d'amplification nécessaire pour que le signal PCR soit détecté dans un échantillon. Les niveaux du « seuil de cycle » sont inversement proportionnels

à la quantité de l'acide nucléique contenue dans l'échantillon ; c'est-à-dire, plus le « Ct » est bas, plus la quantité d'acide nucléique cible dans l'échantillon est élevée.

Après révélation des génotypes au locus GSTe2, les moustiques ont été regroupés par génotype (RR, RS et SS) et les médianes du nombre de copies du génome du *Plasmodium* ont été comparées entre les différents génotypes en utilisant le test de Man Withney.

II.2.3.4.3. Evaluation de l'association entre les mécanismes de résistance et le niveau d'expression des protéines réceptrices des sporozoïtes des plasmodiums dans les glandes salivaires

Dans le but d'étudier l'influence des mécanismes de la résistance aux insecticides sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires d'*An. funestus*, nous avons évalué le niveau d'expression des gènes codant pour certaines protéines salivaires telles que la Saglin, la Trio, la PRS1 et la SGS4, réceptrices des plasmodiums dans les glandes salivaires des moustiques portant les génotypes homozygotes résistant (RR), hétérozygote résistant (RS) et homozygote sensible de la mutation *CYP6P9a*. Les niveaux d'expression ont par la suite été comparés entre les trois génotypes à l'aide d'un test de Student. La détermination du niveau d'expression des gènes codant pour les protéines d'intérêt dans cette partie du travail a été réalisée en utilisant la technique de Reverse Transcriptase qPCR (RT-qPCR). Pour ce faire, nous avons utilisé l'ARN total extrait à partir des glandes salivaires des moustiques portant les génotypes RR, RS ou SS de la mutation *CYP6P9a*. Brièvement, environ 1µl d'ARN de chaque groupe de moustiques (RR, RS ou SS) a été utilisé pour la synthèse d'ADNc à l'aide du superscript III (Invitrogen, CA, USA) suivant les recommandations du fabricant. La RT-qPCR a été réalisée comme décrit précédemment (Elanga *et al.*, 2019), et le niveau d'expression relatif des gènes pour chaque génotype a été calculé selon la méthode décrite par Schmittgen et Livak, 2008. Pour la normalisation des résultats, nous avons utilisé le niveau d'expression de deux gènes de ménage : les RSP7 et Actin 5C.

II.2.3.4.4. Analyses des données

Les données ont été enregistrées dans un tableur Excel version 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Les taux d'infection à *Plasmodium* dans les échantillons des souches de moustiques résistants et des souches sensibles ont été comparées entre elles en utilisant le test χ^2 . L'expression normalisée de chaque gène ciblé a été déterminée en utilisant les gènes de contrôle interne ou gènes de ménages. Le test de Man withney a été utilisé pour comparer l'intensité de l'infection entre les deux souches. La différence des niveaux d'expression des

gènes d'intérêt entre les différents génotypes de la mutation *GSTe2* chez *An. funestus* a été évaluée à l'aide du test t de Student. La valeur de P pour ces analyses était estimée à 0,05 ; donc les différences étaient considérées significatives pour $P < 0,05$. Les différents graphes obtenus ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

CHAPITRE III :

RESULTATS ET

DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires (sialome) chez les populations sauvages d'*Anopheles funestus*

III.1.1.1. Résultats de l'échantillonnage

Au cours de notre étude entomologique, au total 1557 moustiques femelles adultes ont été collectés dans la localité d'Obout. L'espèce prédominante a été *An. funestus* s.l. avec 1531 (98%) spécimens collectés, suivi d'*An. gambiae* s.l. 15 (1%) individus collectés et enfin les Culicinae 11 (1%) individus collectés. Les analyses moléculaires réalisées sur les moustiques morphologiquement identifiés comme *An. funestus* s.l. ont montré que tous les individus collectés étaient de l'espèce *An. funestus* s.s. (fig.22).



Figure 22 : Bandes révélées suite à la migration sur gel d'agarose 1,5% des produits d'amplification du gène ITS2. M : marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases (pb) ; F : contrôle positif (*Anopheles funestus* s.s.) ; N : contrôle négatif.

III.1.1.2. Souches de moustiques d'*Anopheles funestus* « résistantes » ou « sensibles » à la perméthrine sélectionnée

Sur un total de 1350 moustiques femelles mis en ponte individuelle à l'insectarium, 653 moustiques seulement ont pondu des œufs qui ont par la suite été mis en élevage pour l'établissement des isofamilles. Au total, 492 isofamilles ont été établies et utilisées pour la sélection des souches d'*Anopheles funestus* résistantes et des souches sensibles aux pyréthriinoïdes. Pour la sélection de ces souches, nous avons réalisé des tests de susceptibilité en exposant les moustiques à la perméthrine (concentrée à 0,75%). A l'issue des tests réalisés sur les 492 familles testées, 82 ont présenté un taux de mortalité de 100% et étaient ainsi considérées comme souches « Sensibles » ; 200 avaient des taux de mortalité inférieur à 40% et ont été classées comme souches « Résistantes ». Les restes d'individus non exposés à l'insecticide issus des familles des souches résistantes ont été utilisés comme souche « témoin ». Les 210 familles dont les mortalités étaient comprises entre 40 et 98% n'ont pas été utilisées pour cette étude.

III.1.1.3. Nombre de paires glandes salivaires obtenues de chaque souche de moustique

Les moustiques des trois souches sélectionnées (« résistantes », « témoins » et « sensibles ») ont été disséqués dans le but d'extraire des glandes salivaires. Au total 435 paires de glandes salivaires ont été extraites des moustiques de souches « résistantes » (R), 603 paires de glandes des souches « témoins » (C) et 322 paires de glandes des souches « sensibles » (S). Ces glandes salivaires ont par la suite été utilisées pour l'extraction de l'ARN. Le contrôle de la qualité de l'ARN extrait a permis d'obtenir pour l'ensemble des échantillons, le graphe présenté à la figure 23. Cette dernière présente le chromatogramme obtenu après analyse de l'ARN au Bioanalyzer (fluorescence units) d'un de nos échantillons. Sur cette figure, on observe la présence de deux pics 18S et 28S, preuves que l'ARN extrait était de bonne qualité avec une concentration qui a varié entre 10 à 35 ng/μL.

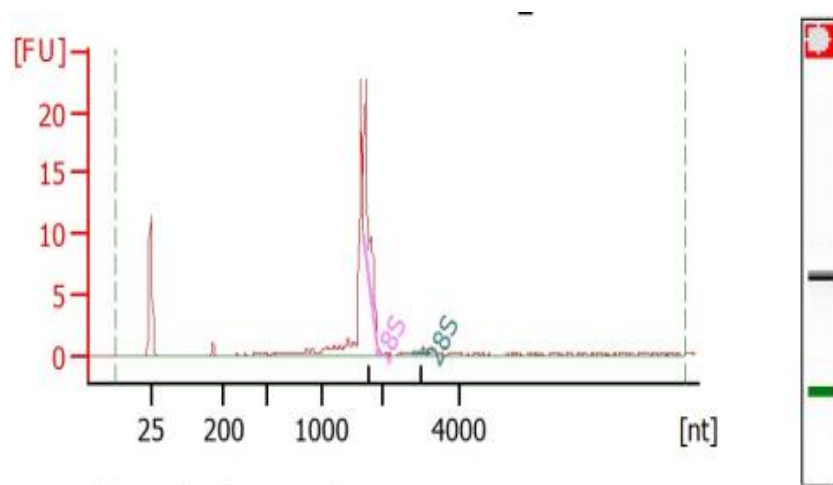


Figure 23 : Courbes montrant l'intégrité de l'ARN dans les échantillons d'*Anopheles funestus* après des analyses de contrôle qualité.

III.1.1.4. Analyse de l'expression différentielle des gènes salivaires des moustiques des souches « résistantes », des souches « témoins » et des souches « sensibles »

L'analyse transcriptomique a été faite dans le but de comparer l'expression différentielle des gènes entre les différentes souches de moustiques sélectionnées : « Résistante » (R), « Témoin » (C) et « Sensible » (S). Le nombre de séquences obtenues pour chaque souche est présenté dans le Tableau I. A l'issue du processus d'alignement des séquences, nous avons observé que le nombre de séquences était plus élevé chez les souches « résistantes » que chez les souches de moustiques « sensibles » et les souches « témoins ». Ce qui a permis d'obtenir un total de 13 588 gènes parmi lesquels 5233 ont pu être annotés (c'est-à-dire identifiés).

Tableau I : Nombre de séquences générées lors du séquençage de l'ADN Complémentaire des différentes souches de moustiques

Souches	Séquences brutes	Séquences nettoyées	Séquences alignées
Témoin	38 469 334	38 172 322	33 776 974
Résistantes	46 872 546	46 531 622	41 838 715
Sensibles	36 817 628	36 555 344	32 473 811

III.1.1.5. Analyse de l'expression différentielle des gènes des moustiques résistants, des sensibles, et des témoins

En tenant compte des critères de signification préétablis à savoir : (i) $\text{Log}_2\text{FC} > 0,058$ c'est-à-dire qu'un gène présente un niveau d'expression au moins une fois et demie différent entre deux groupes ou phénotypes, (ii) $\text{FDR} < 0,05$, parmi les 5233 gènes retrouvés correctement annotés, on avait (Tableau II) :

- 998 gènes qui étaient différemment exprimés entre les moustiques de souches « résistantes » et ceux de souches « Sensibles », soit, 377 gènes dont le niveau d'expression était plus élevé chez la souche « Résistante » par rapport à la souche « Sensible » et 621 gènes dont les niveaux d'expression étaient plus bas chez les « Résistantes » ;
- 979 gènes différemment exprimés entre les souches « Témoins » et les souches « Sensibles », soit 472 dont l'expression était plus élevée et 507 dont l'expression était moins élevée chez la souche « témoin » par rapport à la souche « sensible » ;
- 1040 gènes différemment exprimé entre souches « Résistantes » et les souches « Témoins » soit 651 dont l'expression était plus élevée et 389 dont l'expression était moins élevée chez la souche « Résistants » par rapport à la souche « Témoin »

Tableau II : Nombre de gènes annotés différemment exprimés entre les souches de moustiques Résistants, sensibles, ou témoins

	R vs S	T vs S	R vs T
Nombre total de gènes	998	979	1040
Gènes surexprimés	377	472	651
Gènes sous-exprimés	621	507	389

N= Nombre Total de gènes, R= Résistant, T= témoin, S=Sensible

III.1.1.5.1. Gènes annotés les plus différemment exprimés entres souches de moustiques résistantes et souches sensibles

L'annexe 8 présente la classification des 100 gènes les plus différemment exprimés (soit 50 surexprimés et 50 sous-exprimés). Il est apparu que le gène le plus sous-exprimé était la "serine protéase inhibitor (serpin) " qui est 1,5 fois inférieur chez le résistant par rapport au sensible avec une FRD de 0,029 et le gène le moins sous-exprimé était le gène (ADP-ribosylation factor-like) qui s'est avéré 1,8 fois inférieur chez les résistants par rapport aux sensibles avec un FRD de 0,038. Le gène le plus surexprimé était "l'Eukaryotic large subunit ribosomal RNA" qui a été 63 fois plus élevé chez le résistant comparé aux sensibles avec une FRD de 0,04 et le gène le moins surexprimé "Lamin" a été 3 fois supérieur chez les résistants comparés aux sensibles avec une FDR de 0,01.

III.1.1.5.2. Gènes annotés les plus différemment exprimés entre moustiques résistants et moustiques témoins

L'annexe 9 présente la classification des 100 gènes les plus différemment exprimés (soit 50 surexprimés et 50 sous-exprimés) entre résistant et témoin. Les résultats révèlent que le gène le plus sous-exprimé dans ce groupe était la "Solute carrier family 30" (zinc transporter), qui était 1,5 fois inférieur chez le résistant comparé au témoin avec une FRD de 5,18E-04. Le gène le moins sous-exprimé était la "Lariat debranching enzyme", 1,7 fois inférieur chez les résistants comparés aux sensibles avec une FRD de 0,003. Quant aux gènes surexprimés, le plus exprimé était la "Cuticular protein", 56 fois supérieur chez les résistants comparés aux témoins avec une FRD de 0,04 et le "dumpy-like protein", 3 fois inférieur chez le résistant comparé au témoin avec une FDR de 0,01.

III.1.1.5.3. Gènes annotés les plus différemment exprimés entre moustiques témoins et moustiques sensibles

L'annexe 10 présente la classification des 100 gènes les plus différemment exprimés (soit 50 surexprimés et 50 sous-exprimés) entre témoin et sensibles. Parmi ces gènes, le moins sous-exprimés était le gène "Outer segment 2", 1,5 fois inférieur chez le témoin comparé au sensible avec une FDR de 0,03. Le gène le plus sous-exprimé était " l'Actin-related protein 2/3 complex subunit", 1,6 fois inférieur chez les témoins comparés aux sensibles avec une FRD de 0,004. Pour ce qui est des gènes surexprimés, le " Sphingomyelin phosphodiesterase" était le plus surexprimé (44 fois supérieur chez le témoin par rapport au sensible) avec une FDR de 0,03 la "protein phosphatase" était le gène le moins surexprimé, avec 2 fois supérieur chez les témoins par rapport aux sensibles avec une FDR de 0,001.

Dans le cadre de nos analyses et en fonction des objectifs de la thèse, nous nous sommes focalisés particulièrement à étudier les niveaux d'expression des gènes codant pour les protéines connues spécifiques aux glandes salivaires et impliquées soit dans la prise du repas sanguin par le moustique ou soit dans l'invasion des sporozoïtes de *Plasmodium* dans les glandes salivaires du vecteur.

III.1.1.6. Comparaison de l'expression des gènes codant pour les protéines salivaires chez les souches de moustiques « Résistants » et des souches « Sensibles »

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le repas sanguin du moustique et/ou l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires des souches de *An. funestus* « Résistantes » ou « Sensibles » a montré qu'au total 7 gènes codant pour des protéines salivaires étaient différemment exprimés entre les souches suivant les critères d'analyses que nous avons initialement établies. Parmi ces gènes 4 avaient un niveau d'expression plus élevé chez les moustiques de souche « Résistante » tandis que 3 étaient moins abondamment exprimés que chez les souches « Sensibles ». Ces gènes dont les niveaux d'expression ont été trouvés différents sont :

a) Pour les gènes dont le niveau d'expression était plus élevé :

- le gène AFUN007416 codant pour la protéine "D7 long form" (isotype 1) qui empêche la vasoconstriction, inhibe l'agrégation plaquettaire et induit la douleur. Son niveau d'expression a en effet été trouvé plus de 3 fois supérieur (FC= 3,1821) chez la souche résistante comparé à la souche sensible ;

- le gène AFUN000976 codant pour la protéine "Salivary gland protein 1-like" (Saglin; isotype 1) qui est un récepteur spécifique des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique et son niveau d'expression était également plus de 3 fois supérieur (FC=3,434) chez les souches résistantes comparé aux souches sensibles ;
- le gène AFUN011825 qui code pour la protéine "Venom allergen" (Isotype 1) dont la fonction chez le moustique reste inconnue et son niveau d'expression étant plus de 7 fois supérieur (FC=7,8342) chez les souches résistantes comparé aux souches sensibles.

b) Pour les gènes dont le niveau d'expression était moins élevé :

- le gène AFUN022131 codant pour la protéine "facilitated glucose transporter " (solute carrier family 2) jouant un rôle dans la reconnaissance des espèces de *Plasmodium* dans les glandes salivaires du moustique. Son niveau d'expression a été trouvé 2 fois inférieur (FC=2,016907) chez les souches résistantes comparé aux souches sensibles ;
- le gène AFUN008757 codant pour la protéine "salivary gland protein" (isotype 1). Son niveau d'expression a été trouvé 1,5 fois (FC=1,5440872) inférieur chez les souches résistantes comparé aux souches sensibles ;
- le gène AFUN016187 codant également pour la protéine "salivary gland protein" (isotype 2). Son niveau d'expression a été trouvé 11,6 fois (FC= 1,6501911) inférieur chez les souches résistantes comparé aux souches sensibles,
- le gène AFUN020017 codant pour la protéine "venom allergen " (isotype 2) dont les rôles restent inconnus chez le moustique. Son niveau d'expression a été trouvé 35 fois (FC=37,572346) inférieurs chez les souches résistantes comparé aux souches sensibles.

Tableau III : Nombre de gènes salivaires annotés différemment exprimés entre souches de moustiques « résistants » et des « sensibles »

Identifiant du gène	Nom du gène	Log ₂ FC	FC	FDR	Sens de régulation
AFUN007416	"D7 long form salivary protein"	1,6754846	3,1821	0,008089	Surexprimé
AFUN000976	"salivary gland protein 1-like"	1,78236496	3,4398	7,86E-04	Surexprimé
AFUN011825	"venom allergen"	2,969801	7,8342	2,58E-04	Surexprimé

AFUN022131	"facilitated glucose transporter (solute carrier family 2) "	-1,0121446	2,016907	0,017712	Sousexprimé
AFUN008757	"salivary gland protein"	-0,62675416	1,5440872	4,17E-04	Sousexprimé
AFUN016187	"salivary gland protein"	-0,72263306	1,6501911	1,79E-04	Sousexprimé
AFUN020017	"venom allergen"	-5,2315993	37,572346	0,001125	Sousexprimé

III.1.1.7. Comparaison de l'expression des gènes codant pour les protéines salivaires chez les souches de moustiques « Témoins » et des « Sensibles »

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le repas sanguin du moustique et/ou l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires des souches *d'An. funestus* « Témoins » et des souches « Sensibles » a montré qu'au total 6 gènes codant pour des protéines salivaires étaient différemment exprimés entre les souches suivant les critères d'analyses que nous avons initialement établies. Parmi ces gènes 4 avaient un niveau d'expression moins élevé chez les souches « Témoins » tandis que 2 étaient plus abondamment exprimés que chez les souches « Sensibles ». Ces gènes dont les niveaux d'expression ont été trouvés différents sont :

a) Pour les gènes dont le niveau d'expression était plus élevé :

- le gène AFUN011825 codant pour la protéine "venom allergen" dont la fonction reste inconnue et son niveau d'expression a été trouvé 1,6 fois supérieur (FC=1,6289) chez les souches témoins par rapport aux souches sensibles ;
- Le gène AFUN021417 codant pour la protéine "antigen 5 related protein" qui est impliquée dans l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires dont la fonction spécifique reste inconnue, son niveau d'expression a été trouvé 2 fois (FC=2,891) supérieur chez les souches témoins par rapport aux souches sensibles,
- le gène AFUN022131 codant pour la protéine "facilitated glucose transporter (solute carrier family 2) ". Ici le niveau d'expression a été trouvé 9 fois (FC=9,6321) supérieur chez les souches témoins par rapport aux souches sensibles.

b) Pour les gènes dont le niveau d'expression était moins élevé :

- le gène AFUN016458 codant pour la protéine "D7 short form salivary protein" dont le rôle est mentionné plus haut, avec un niveau d'expression trouvé 2 fois (FC=2,164) inférieur chez les souches témoins par rapport aux souches sensibles ;
- le gène AFUN008757 codant pour la protéine "salivary gland protein (isotype 1) ", avec un niveau d'expression trouvé 1 fois (FC=1,7404), inférieur chez les souches témoins par rapport aux souches sensibles ;
- le gène AFUN020017 codant pour la protéine "venom allergen (isotype 2) " où le niveau d'expression a été trouvé 6 fois (FC=6,8437) inférieur chez les souches témoins par rapport aux souches sensibles.

Tableau IV : Nombre de gènes salivaires annotés différemment exprimés entre souches de moustiques « Témoins » et souches « Sensibles »

Identifiant du gène	Nom du gène	Log ₂ FC	FC	FDR	Sens de régulation
AFUN011825	"venom allergen"	0,70391	1,6289	2,58E-04	Surexprimé
AFUN021417	"antigen 5 related protein"	1,5318	2,891	5,79E-04	Surexprimé
AFUN022131	"facilitated glucose transporter (solute carrier family 2) "	3,267	9,6321	0,017712	Surexprimé
AFUN016458	"D7 short form salivary protein"	-1,1143	2,164	5,90E-04	Sousexprimé
AFUN008757	"salivary gland protein"	-0,79947	1,7404	4,17E-04	Sousexprimé
AFUN020017	"venom allergen"	-2,7748	6,8437	0,001125	Sousexprimé

III.1.1.8. Comparaison de l'expression des gènes codant pour les protéines salivaires chez les souches de moustiques « Résistants » et souches « Témoins »

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le repas sanguin du moustique et/ou l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires des souches

de *An. funestus* « Résistants » et souches « Témoins » a montré qu'au total 6 gènes codant pour des protéines salivaires étaient différemment exprimés entre les souches suivant les critères d'analyses que nous avons initialement établies. Parmi ces gènes 1 avait un niveau d'expression moins élevé chez les moustiques de souche « Résistants » tandis que 5 étaient plus abondamment exprimés que chez les souches « Témoins ». Ces gènes dont les niveaux d'expression ont été trouvés différents sont :

a) Pour les gènes dont le niveau d'expression a été observé plus élevé :

- les gènes AFUN007416 codant pour la protéine "D7 long form salivary protein (isotype 1) " où le niveau d'expression était 1,5 (FC=1,5213) fois supérieur chez les souches résistantes comparé aux souches témoins ;
- le gène AFUN016458 codant pour la protéine "D7 short form salivary protein (isotype 2) " avec un niveau d'expression 2 (FC=2,310) fois supérieur chez les souches résistantes comparé aux souches témoins ;
- le gène AFUN003544 codant pour la protéine "salivary gland protein 1-like (isotype 2) ", dont le niveau d'expression était 1,6 (FC=1,6730) fois supérieur chez les souches résistantes comparé aux souches témoins ;
- le gène AFUN000976 codant pour la protéine "salivary gland protein 1-like (isotype 1)", dont le niveau d'expression était 1,7 (FC=1,7780) fois supérieur chez les souches résistantes comparé aux souches témoins ;
- le gène AFUN016250 codant pour la protéine "salivary gland protein 7-like", avec un niveau d'expression 1,5 (FC=1,5501) fois supérieur chez les souches résistantes comparé aux souches témoins.

b) L'unique gène dont le niveau d'expression a été observé moins exprimé était le gène AFUN021417 codant pour la protéine "antigen 5 related protein". Son niveau d'expression était 2 fois (FC=2,051) inférieur chez les souches résistantes comparé aux souches témoins.

Tableau V : Nombre de gènes salivaires annotés différemment exprimés entre souches de moustiques « Résistants » et souches « Témoins »

Identifiant du gène	Nom du gène	Log ₂ FC	FC	(FDR)	Sens de régulation
AFUN021417	"antigen 5 related protein"	-1,03686	2,051	5,79E-04	Sousexprimé

AFUN007416	"D7 long form salivary protein"	0,605335	1,5213	0,008089	Surexprimé
AFUN016458	"D7 short form salivary protein"	1,2079468	2,310	5,90E-04	Surexprimé
AFUN003544	"salivary gland protein 1-like"	0,742518	1,6730	0,001072	Surexprimé
AFUN000976	"salivary gland protein 1-like"	0,831012	1,7780	7,86E-04	Surexprimé
AFUN016250	"salivary gland protein 7-like"	0,63243	1,5501	9,84E-04	Surexprimé

En somme, cette analyse nous a montré que des gènes étaient différemment exprimés dans les glandes salivaires des moustiques résistants aux insecticides en comparaison avec les moustiques sensibles. De plus, il a été observé une expression différentielle des gènes codant pour des protéines directement impliquées dans la prise du repas sanguin et l'invasion par des sporozoïtes. De manière globale, le résultat de cette analyse soulève la question de savoir si l'expression différentielle des gènes codant pour les protéines salivaires du fait de la résistance aux insecticides pourrait influencer la prise du repas sanguin et l'invasion des glandes salivaires du moustique *Anopheles funestus* par les sporozoïtes.

III.1.2. Impact de la modulation de la composition du sialome par la résistance aux insecticides sur le déroulement du repas sanguin chez *Anopheles funestus*

Les différents paramètres analysés dans cette partie étaient la taille du repas sanguin, le temps de sondage et la durée d'alimentation.

III.1.2.1. Mécanisme des gènes de résistance aux insecticides et poids des moustiques *Anopheles funestus*

L'analyse de l'impact de la résistance sur le poids du moustique a été effectuée au préalable dans le but d'éviter tout biais lié au poids, par la suite, une association avec le profil d'expression des gènes salivaires a été faite. Au total, 1 200 moustiques femelles (G₁ de la souche de terrain) et 273 moustiques femelle de la souche de laboratoire (G₄-G₈) ont été pesés. Aucune différence significative (P= 0,8) n'a été observée entre le poids moyen des moustiques de terrain $0,9 \pm 0,010$ mg (min = 0,5 mg ; max = 2,3mg) et celui des souches de laboratoire $0,89 \pm 0,016$ mg (mini = 0,5 mg ; max = 1,7mg).

Lors de nos analyses, nous avons tout d'abord procédé à un regroupement des moustiques en classes de poids en prenant de manière aléatoire une amplitude de 0,2 mg. L'ensemble des valeurs du poids étant compris entre 0,5 et 2,4 mg, les moustiques ont été regroupés en 4 classes qui sont :

- 1^{ere} classe : [0,5 -0,8[, n =88
- 2^{ème} classe : [0,8 -1,1[, n =96
- 3^{ème} classe : [1,1 -1,4[, n =46
- 4^{ème} classe : [1,4 -2[, n =11

La comparaison 2 à 2 des médianes de ces classes à l'aide du test de Mann-Whitney a montré que les médianes des classes 1 et 2 n'étaient pas significativement différentes entre elles tout comme celles des classes 3 et 4. Par contre, les médianes de la classe 1 et 2 étaient significativement différentes de celles des classes 3 et 4. Ces analyses statistiques nous ont donc conduits à regrouper les moustiques en 2 classes selon leur poids à savoir :

- groupe 1 moustique dont le poids appartient à la classe [0,5-1,0], n =241
- groupe 2 moustique dont le poids appartient à la classe [1,1-2,4[, n=119

L'analyse de la distribution des génotypes de la mutation *L119F-GSTe2* dans les deux groupes pour la souche d'*An. funestus* collectée sur le terrain n'a montré aucune association ($\chi^2 = 0,15$; $p = 0,9$) entre le poids du moustique et ce mécanisme de résistance. En effet, il n'a été observé aucune différence significative dans les deux groupes de poids :

- Pour des individus homozygotes résistants comparés aux hétérozygotes on a eu OR = 1,2 et intervalle de confiance à 95% (CI, 95%) : 0,3742 - 4,176 ;
- Pour les individus homozygotes résistants comparés aux homozygotes sensibles on a eu (OR=1,1, 95% CI : 0,3659 - 3,606) ;
- et enfin pour les individus hétérozygotes résistants comparés aux homozygotes sensibles on a eu (OR = 0,9, 95% IC : 0,4943 - 1,709).

Cette absence de corrélation entre les génotypes *L119F-GSTe2* et le poids des moustiques a été également observée au niveau allélique (OR=1 ; 95% : CI : 0,5-2,0 ; $p = 0,5$) (Tableau VII, figure 24a).

Par contre, les analyses ont montré que le poids du moustique pouvait être significativement associé à la surexpression du gène *CYP6P9a/b* conférant la résistance aux pyréthriinoïdes ($\chi^2= 29,54$, $p<0. 0001$; $\chi^2= 28,62$, $p<0. 00001$). En effet, il a été observé que les proportions de moustiques portant le génotype homozygote sensible (SS) étaient 5,4 et 4 fois plus abondants dans l'intervalle des poids élevé ([1,1-2,4[) que ceux portant le génotype homozygote résistant (RR) pour les gènes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* respectivement.

Aussi, les moustiques porteurs de l'allèle sensible (*CYP6P9a-S*) ont présenté un poids plus élevé que ceux qui étaient porteurs de l'allèle résistant (*CYP6P9a-R*) (OR=2,8 ; IC 95% : 1,5-5,0 ; $p=0,0003$). Cette tendance a également été observée chez les moustiques porteurs de l'allèle sensible (*CYP6P9b-S*) comparé à ceux portant l'allèle résistant (*CYP6P9b-R*) (OR=2,3 ; IC 95% : 1,3-4,1 ; $p=0,002$ respectivement (fig. 24b/c, Tableau VI).

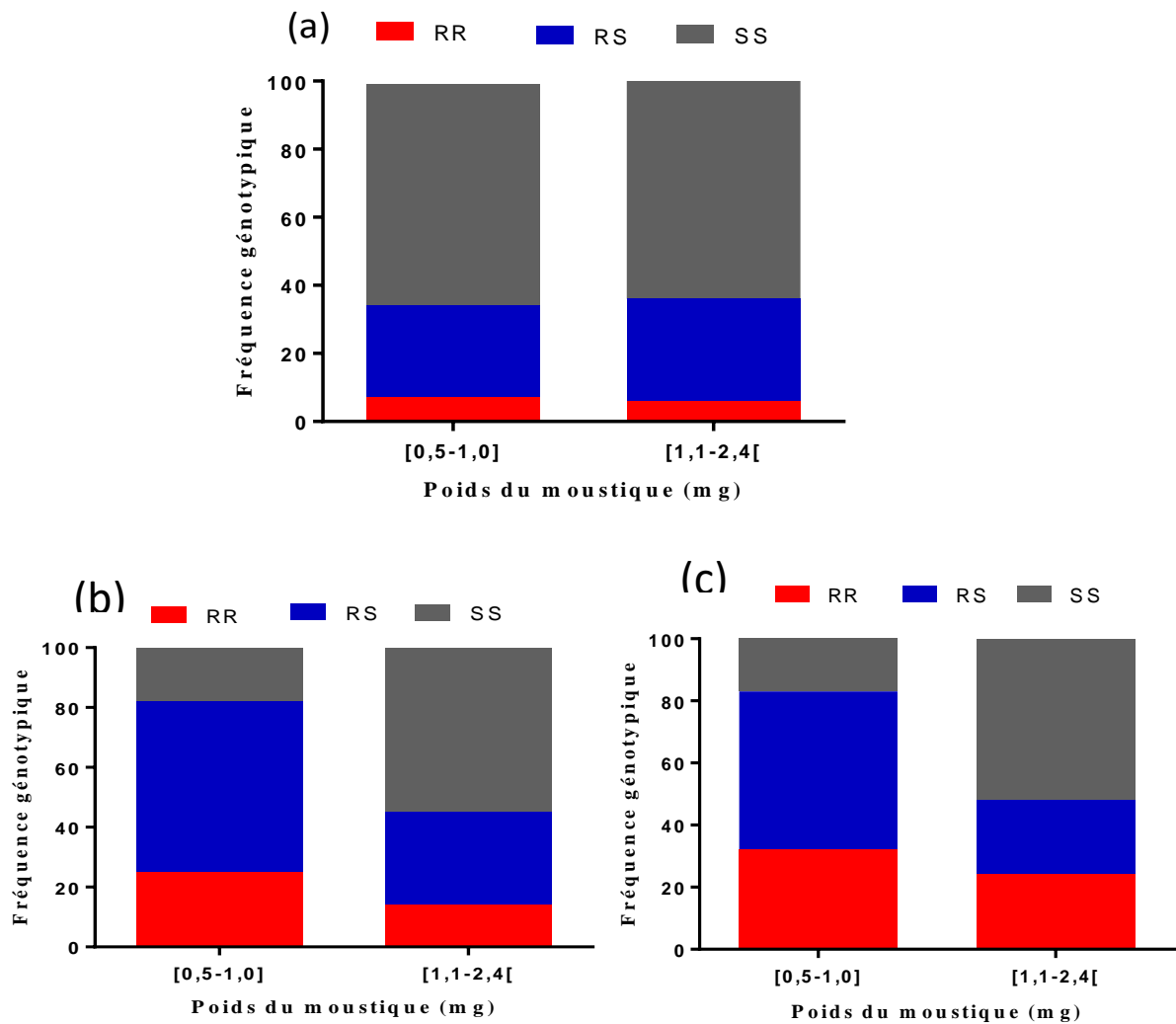


Figure 24 : Effet de la résistance métabolique sur le poids du moustique *Anopheles funestus*. (a) *L119F-GSTe2* (b) *CYP6P9a-R* et (c) *CYP6P9b-R*.

Tableau VI : Influence des mutations *L119F-GSTe2* et *CYP6P9a/b-R* sur le poids du moustique *Anopheles funestus*

Comparaisons	<i>GSTe2</i>		<i>Cyp6p9a</i>		<i>Cyp6p9b</i>	
	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
SS vs RR	1,1 (0,4-3,6)	0,5	5,4 (2,3-12,7)	0,0001*	4,0 (1,9-8,7)	0,0002*
SS vs RS	0,9 (0,5-1,7)	0,4	5,6 (2,8-11,1)	0,0001*	6,5 (3,1-13,5)	1,5
RS vs RR	1,2 (0,4-4,1)	0,5	1,0 (0,5-2,3)	0,5	1,5 (0,7-3,2)	0,13
S vs R	1 (0,5-2,0)	0,5	2,8 (1,5-5,0)	0,0003*	2,3 (1,3-4,1)	0,002*

SS : homozygotes sensibles ; RR : homozygotes résistants ; RS : hétérozygotes ; * différence significative, (CI 95%) : intervalle de confiance à 95%, p = seuil de signification

III.1.2.2. Influence de la résistance aux insecticides sur la capacité du moustique à prendre son repas sanguin chez *An. funestus*

Pour évaluer l'influence de la résistance sur la capacité du moustique à prendre le repas sanguin, deux marqueurs moléculaires ont été utilisés à savoir le *L119F-GSTe2* et *CYP6P9a/b*

III.1.2.2.1. Impact de la mutation *L119F-GSTe2*

Pour évaluer l'impact de la mutation *L119F-GSTe2* sur 1200 individus de moustiques de terrain autorisés à prendre un repas de sang, 457 (39,6 %) se sont effectivement gorgés avec succès, tandis que 743 n'ont pas pris de sang.

L'identification des génotypes de la mutation *L119F-GSTe2* a été réalisée avec succès sur 360 des 457 ayant pris un repas sanguin. On a ainsi observé que 24 individus (7 %) portaient le génotype homozygote résistant (RR), 103 (28 %) le génotype hétérozygote résistants (RS) et 233 (65 %) le génotype homozygote sensible (SS) (Figure 25a, Tableau VIII). La même analyse réalisée sur 300 des 743 moustiques qui n'ont pas pu prendre un repas sanguin avec succès, a montré que 5% (15/300), 32% (62/300) et 63% (189/300) d'individus ont été détectés avec les génotypes, homozygote résistant, hétérozygote résistant et homozygote sensible, respectivement.

L'aptitude à prendre un repas sanguin avec succès n'a cependant pas été observée associée à la mutation *L119F-GSTe2* chez *An. funestus*. En effet, la distribution des génotypes de la mutation L119F n'était pas statistiquement différente entre les moustiques qui ont pu prendre leur repas de sang et ceux qui ne l'ont pas ($\chi^2=0,63$, $p=0,7$). De plus, l'estimation du rapport de côtes (OR=1 ; CI 95% : 0,5-2,0 ; $p = 0,6$) a montré globalement que les moustiques porteurs de l'allèle mutant résistant (119F-R) ont les mêmes chances que les moustiques porteurs de l'allèle sauvage sensible (119F-S) d'avoir un repas sanguin complet. Ce résultat suggère que la capacité du moustique à se gorger de sang ne serait pas influencée par la résistance aux insecticides due à la mutation *L119F-GSTe2* chez *An. funestus*.

III.1.2.2.2. Impact de la mutation CYP6P9a-R et CYP6P9b-R

Pour évaluer l'impact du gène *CYP6P9a* et *CYP6P9b* (gènes impliqués dans la résistance métabolique) sur la capacité du moustique *An. funestus* à prendre le sang, 273 moustiques ont été autorisés à se gorger sur l'avant-bras d'un humain. Au total, 140 (51,3%) se sont gorgés avec succès, tandis que 133 n'ont pas pris de sang (figure 25b et 25c).

- Impact du mécanisme de résistance associé à la surexpression du gène *CYP6P9a* sur la capacité du moustique à prendre son repas sanguin

La détermination des génotypes du gène *CYP6P9a* sur 140 moustiques ayant pris le repas sanguin avec succès a montré que 31 (23%) étaient identifiés avec les génotypes (RR) des homozygotes résistants (RR), 67 (50 %) étaient de génotypes hétérozygotes résistants (RS) et 36 (27%) étaient de génotypes homozygotes sensibles (SS) (Figure 25b, Tableau VII). Pour les 133 moustiques qui n'ont pu prendre un repas sanguin avec succès, 11,3% (15/133), 47,4% (63/133) et 41,3% (55/133) ont été détectés avec les génotypes homozygotes résistants, hétérozygotes et homozygotes sensibles, respectivement.

L'aptitude à prendre un repas sanguin avec succès a été observée associée à la mutation *CYP6P9a* chez *An. funestus*. En effet, la distribution des génotypes de la mutation *CYP6P9a* était statistiquement différente entre les moustiques qui ont pu prendre leur repas de sang et ceux qui ne l'ont pas ($\chi^2=7,6$, $p=0,02$). De plus, l'estimation du rapport de cote a montré que les moustiques *CYP6P9a-RR* homozygotes résistants étaient significativement plus aptes à se gorger de sang que les homozygotes sensibles (OR = 3,33 ; CI 95% : 1,4 -7,7 ; $p = 0,01$). Par contre, aucune différence n'a été observée entre les moustiques *CYP6P9a-RS* hétérozygotes et homozygotes résistants RR (OR = 1,9, 95 % IC : 0,9-4,4 ; $p = 0,1$), ni avec les moustiques *CYP6P9a-SS* homozygotes sensibles (OR = 1,7, 95 % IC : 0,9-3,1 ; $p = 0,1$). Cette observation

persistait même au niveau allélique car il était observé que les moustiques porteurs de l'allèle résistant à *CYP6P9a-R* avaient une plus grande chance de se nourrir de sang que ceux porteurs de l'allèle sensible (OR = 1,9 ; IC 95% : 1,03-3,2 ; p =0,04).

- **Impact du mécanisme de résistance associé à la surexpression du gène *CYP6P9b* sur la capacité du moustique à prendre son repas sanguin**

La détermination des génotypes du gène *CYP6P9b* sur 140 moustiques ayant pris le repas sanguin avec succès a montré que 40 (31%) étaient identifiés avec les génotypes (RR) des homozygotes résistants (RR), 59 (50 %) étaient de génotypes hétérozygotes résistants (RS) et 32 (27%) étaient de génotypes homozygotes sensibles (SS) (fig. 25c, Tableau VII). Pour les 133 moustiques qui n'ont pu prendre un repas sanguin avec succès, 8% (3/38), 53% (20/38) et 39% (15/38) ont été détectés avec les génotypes homozygotes résistants, hétérozygotes et homozygotes sensibles, respectivement.

L'aptitude à prendre un repas sanguin avec succès a dans ce cas aussi été observée associée au mécanisme de résistance aux insecticides chez *An. funestus*. En effet, la distribution des génotypes de la mutation *CYP6P9b* était statistiquement différente entre les moustiques qui ont pu prendre leur repas de sang et ceux qui ne l'ont pas fait ($\chi^2=17,8$ p=0,0001). De plus, l'estimation du rapport de cote a montré que les moustiques *CYP6P9b-RR* homozygotes résistants étaient significativement plus aptes à se gorger de sang que les homozygotes sensibles (OR = 1,5 ; CI 95% : 0,06 -0,87 ; p =0,03). Aucune différence n'a été observée entre les moustiques *CYP6P9b-RS* hétérozygotes et homozygotes résistants RR (OR = 0,2, 95 % IC : 0,09-2,5 ; p = 0,2), ni avec les moustiques *CYP6P9b-SS* homozygotes sensibles (OR = 0,7, 95 % IC : 0,4-1,4 ; p = 0,2). Cette observation persistait même au niveau allélique car il était observé que les moustiques porteurs de l'allèle résistant à *CYP6P9b-R* avaient une plus grande chance de se nourrir de sang que ceux porteurs de l'allèle sensible (OR = 1,2 ; IC 95% : 0,2-0,74 ; p =0,002).

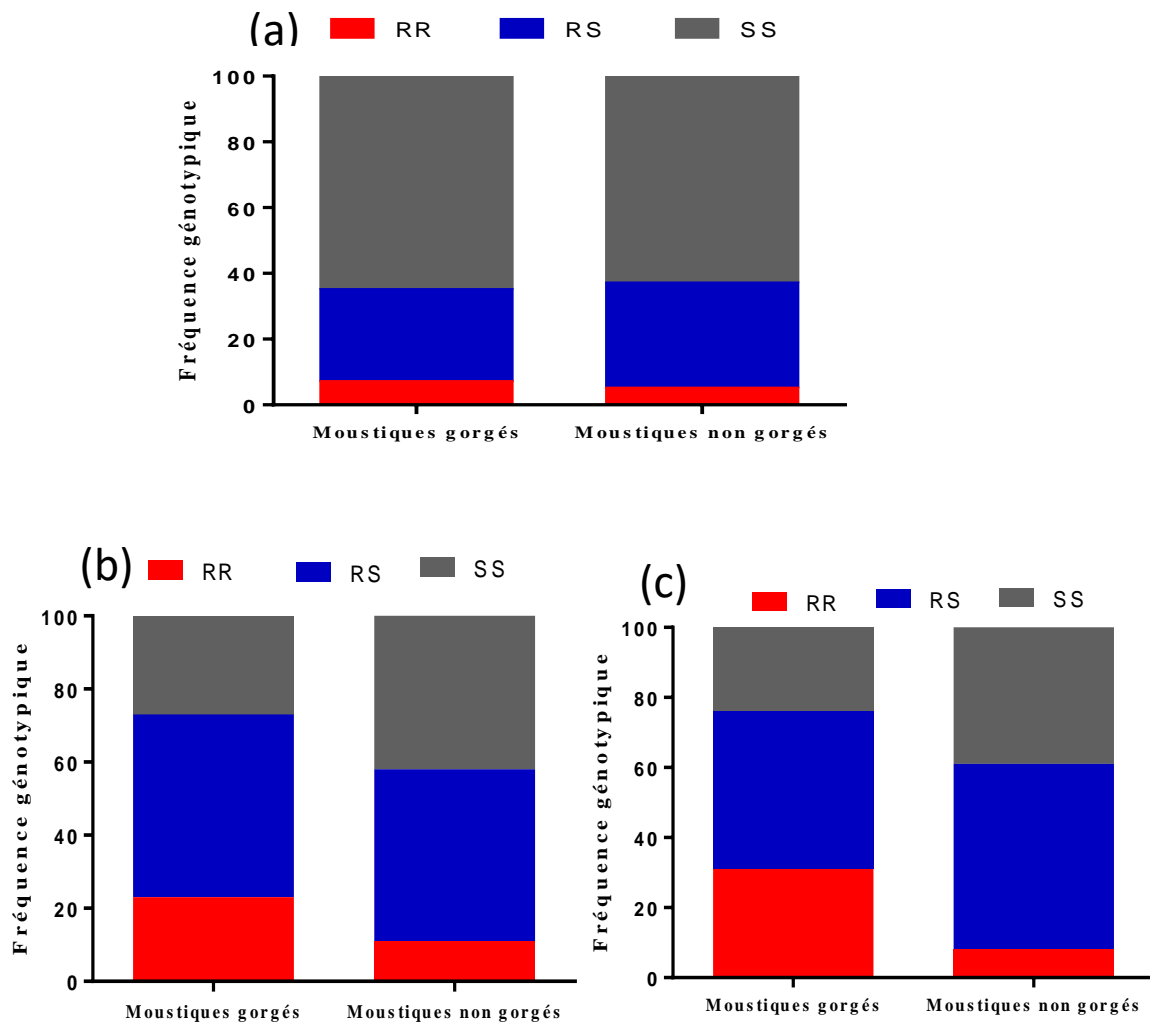


Figure 25 : Association entre les marqueurs de résistance et la capacité d'*Anopheles funestus* à prendre un repas de sang. (a) mutation *L119F-GSTe2* (b) mutation *CYP6P9a-R* et (c) mutation *CYP6P9b-R*.

Tableau VII : Influence des mutations *L119F-GSTe2* et *CYP6P9a/b-R* sur la capacité du moustique *Anopheles funestus* à prendre un repas sanguin complet

Comparaisons	<i>GSTe2</i>		<i>Cyp6p9a</i>		<i>Cyp6p9b</i>	
	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
RR vs SS	0,7 (0,2-2,4)	0,4	3,3 (1,4-7,7)	0,01*	1,5 (0,06-0,87)	0,03*
RS vs SS	1,1 (0,62-2,1)	0,4	1,7 (0,9-43,1)	0,1	0,7 (0,4-1,4)	0,2
RR vs RS	0,6 (0,2-2,3)	0,3	1,9 (0,9-4,4)	0,1	0,2 (0,09-2,5)	0,2
S vs R	1 (0,5-2,0)	0,6	1,8 (1,1-3,2)	0,04*	1,2 (0,2-0,74)	0,002*

SS : homozygotes sensibles ; RR : homozygotes résistants ; RS : hétérozygotes ; * différence significative, (CI 95%) : intervalle de confiance à 95%, p = valeur de la significativité

III.2.2.3. Influence de la résistance aux insecticides sur la durée de sondage et d'alimentation du moustique *Anopheles funestus* lors de la prise de son repas sanguin

L'influence de la résistance aux insecticides sur le temps de sondage et d'alimentation a été évaluée sur les souches de moustique collectées dans la localité de Mibellon. Pour évaluer ces paramètres, les moustiques étaient filmés par un système de caméra vidéo pendant leur repas. Par la suite après visionnage de l'enregistrement, les temps de sondage et d'alimentation ont été évalués. Les analyses ont été faites sur un total 120 moustiques dont on a obtenu un bon enregistrement des paramètres.

Dans l'ensemble, la valeur médiane du temps de sondage et de durée d'alimentation était de 49,5 secondes (min = 4sec et max = 290sec) et de 249,5 secondes (min = 68 secondes et un max = 772 secondes respectivement). L'analyse de l'influence de la résistance après détermination du génotype du marqueur *L119F-GSTe2*, n'a montré aucune différence significative entre les temps de sondage des moustiques portant le génotype homozygote résistants (médiane = 53 secondes), hétérozygotes L119F-RS (médiane = 52sec) et ceux portant le génotype homozygote sensible (médiane = 52sec) avec $p=0,19$. De même, aucune différence significative n'a été observée pour la durée de l'alimentation entre les trois groupes de moustique bien que cette durée ait été observée plus longue pour les moustiques homozygotes sensibles que pour les homozygotes ou hétérozygotes résistants (Tableau VIII).

Tableau VIII : Tableau représentant les temps de sondage et les durées d'alimentation en fonction des génotypes de la mutation *L119F-GSTe2* chez *Anopheles funestus* s.s.

	Génotypes de la mutation <i>GSTe2</i>		
	RR	RS	SS
Temps de sondage	53(sec)	52(sec)	52(sec)
Durée d'alimentation	214(sec)	229(sec)	269(sec)

Homozygotes sensibles ; RR : homozygotes résistants ; RS : hétérozygotes ; (sec) secondes

III.2.2.4. Influence de la résistance aux insecticides sur la taille du repas sanguin *d'An. funestus*

Pour évaluer l'influence de la résistance aux insecticides sur la taille du repas sanguin *d'An. funestus*, les moustiques ont été privés du jus sucré 24h avant l'expérience et gorgés sur l'avant-bras pendant environ 30 minutes. Cependant pour éviter tout biais lié au poids, nous

avons d'abord analysé l'impact de la résistance sur le poids du moustique ce qui a permis d'exprimer la taille du repas sanguin en $\mu\text{l}/\text{mg}$. Cette influence a été évaluée en utilisant les marqueurs décrits pour les mécanismes *L119F-GSTe2* et *CYP6P9a/b* (Tableau IX).

Tableau IX : Distribution des génotypes de la mutation *L119F-GSTe2*

<i>L119F-GSTe2</i>			
Génotypes	RR	RS	SS
Fréquence	24 (7%)	103 (28 %)	233 (65 %)

RR= homozygote résistant, **RS**=hétérozygote, **SS**=homozygote sensible

III.2.2.4.1. Influence de la résistance aux insecticides médiée par la mutation *L119F-GSTe2* sur la taille du repas sanguin

Sur 457 individus ayant pris un repas de sang complet, nous avons observé que la taille médiane du repas sanguin était de $3,4 \pm 1,3 \mu\text{l}/\text{mg}$ (min = $1,2 \mu\text{l}/\text{mg}$; max = $9,2 \mu\text{l}/\text{mg}$) pour un moustique et ceci quel que soit le génotype de la mutation *L119F-GSTe2*. Toutefois, la taille du repas sanguin pris par les moustiques de génotype homozygote sensible *L119-SS* ($3,0 \mu\text{l}/\text{mg}$) n'était pas significativement différente ($P=0,17$; test de Kruskal-Wallis) de celle du repas pris par les moustiques homozygotes résistants *L119-RR* ($2,8 \mu\text{l}/\text{mg}$) et hétérozygotes *L119-RS* ($3,3 \mu\text{l}/\text{mg}$). Ce résultat suggère que la mutation *L119F-GSTe2* n'impacterait pas la taille du repas de sang absorbé par un moustique au cours du repas sur l'homme (fig. 26).

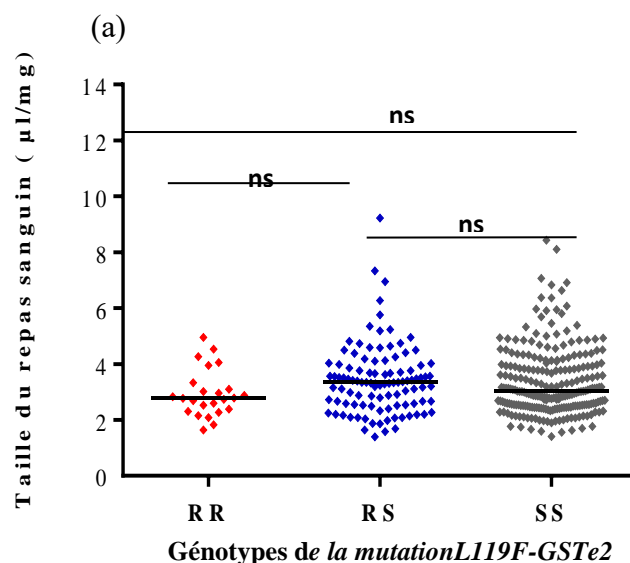


Figure 26 : Taille du repas sanguin en fonction des génotypes de la mutation *L119F GSTe2* chez le moustique *Anopheles funestus*.

III.2.2.4.2. Influence de la mutation CYP6P9a-R sur la taille du repas sanguin du moustique *An. funestus*

L'influence de la mutation CYP6P9a-R sur la taille de repas sanguin pris par *An. funestus* a été évaluée en utilisant 134 moustiques nourris au sang humain. Il a été observé que, quel que soit le génotype du gène *CYP6P9a*, la taille du repas sanguin pris par un moustique était en moyenne de $4,8 \pm 2 \mu\text{l/mg}$ (min = $2 \mu\text{l/mg}$; max = $13,3 \mu\text{l/mg}$). Cependant, la taille de sang ingérée par les moustiques de génotype *CYP6P9a-SS* (médiane = $3,71 \mu\text{l/mg}$) était significativement inférieure à celle des moustiques de génotype *CYP6P9a-RS* (médiane = $4,73 \mu\text{l/mg}$) et *CYP6P9a-RR* (médiane = $4,78 \mu\text{l/mg}$) ; $p < 0,004$ pour RS vs SS et $p < 0,006$ pour RR vs SS, test de Mann-Whitney). Par contre la quantité de sang prise par un moustique homozygote résistant *CYP6P9a-RR* n'était pas significativement différente de celle prise par un moustique hétérozygote *CYP6P9a-RS* ($P = 0,7$; test de Mann-Whitney). Ce résultat suggère que la résistance aux pyréthrinoïdes due au gène *CYP6P9a* pourrait être associée à une augmentation de la taille du repas sanguin ingéré par un moustique *An. funestus* résistant aux pyréthrinoïdes (fig. 27).

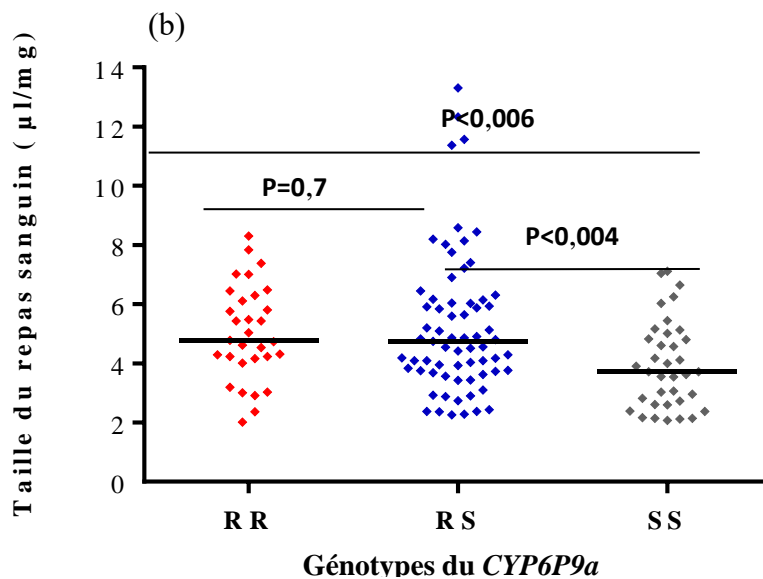


Figure 27 : Taille du repas sanguin en fonction des génotypes de la mutation *CYP6P9a* chez le moustique *Anopheles funestus*.

III.2.2.4.3. Influence de la mutation CYP6P9b-R sur la taille du repas sanguin du moustique *Anopheles funestus*

L'influence de la mutation CYP6P9b-R sur la taille de repas sanguin pris par *An. funestus* a été évaluée en utilisant 131 moustiques nourris au sang humain dont le génotype pour le gène CYP6P9b a été détecté avec succès. Il est apparu que, la taille de sang (3,85 $\mu\text{l}/\text{mg}$) pris par les moustiques portant le génotype sauvage (sensible) n'était pas significativement différent ($P=0,118$; test de Kruskal-Wallis) de celui des moustiques homozygotes résistants CYP6P9b-RR (4,61 $\mu\text{l}/\text{mg}$) ou hétérozygotes CYP6P9b-RS (4,82 $\mu\text{l}/\text{mg}$) (fig. 28).

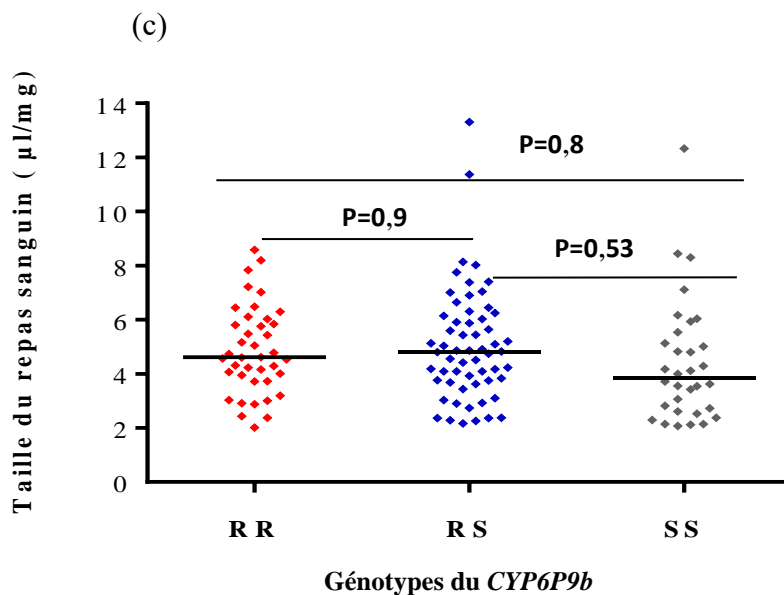


Figure 28: Taille du repas sanguin en fonction des génotypes de la mutation *CYP6P9b* chez le moustique *Anopheles funestus*.

III.2.2.5. Effet combiné des mutations CYP6P9a-R et CYP6P9b-R sur la taille du repas sanguin du moustique *An. funestus*

Le but de cette analyse était d'évaluer l'effet combiné des mutations *CYP6P9a*-R et *CYP6P9b*-R sur la taille du repas de sang chez les souches d'*An. funestus* résistantes aux pyréthrinoïdes. Pour cela, nous avons fait une comparaison de la taille de repas sanguin entre (voir Tableau X) :

- (i) les moustiques présentant à la fois le génotype homozygote résistant pour les mutations *CYP6P9a* et *CYP6P9b* et les moustiques doubles homozygotes susceptibles (**RR/RR vs SS/SS**) ;

- (ii) les moustiques doubles hétérozygotes et les moustiques doubles susceptibles **(RS/RS vs SS/SS)** ;
- (iii) les moustiques hétérozygotes/homozygotes résistants et les moustiques doubles homozygotes sensibles **(SS/RR vs SS/SS)** ;
- (iv) les moustiques homozygotes résistants / homozygotes sensibles et les moustiques doubles homozygotes sensibles **(RR/SS vs SS/SS)** ;
- (v) les moustiques doubles hétérozygotes et les moustiques homozygotes sensibles / hétérozygotes **(RS/RS vs SS/RS)** ;
- (vi) les moustiques doubles hétérozygotes et les moustiques homozygotes sensibles / homozygotes résistants **(RS/RS vs SS/RR)** ;
- (vii) les moustiques doubles homozygotes résistants et les moustiques homozygotes sensibles / homozygotes résistants **RR/RR vs SS/RR)** ;
- (viii) les moustiques **homozygotes résistants /homozygotes sensibles et les moustiques homozygotes sensibles / hétérozygotes (RR/SS vs SS/RS).**

Après analyse nous avons observé que la taille du repas de sang prise par les moustiques doubles homozygote résistants (4,85 $\mu\text{L}/\text{mg}$) était significativement plus importante que celle prise par les moustiques doubles homozygotes sensibles (3,6 $\mu\text{l}/\text{mg}$) RR/RR vs SS/SS (P=0,002 ; t=3,03).

Les moustiques doubles hétérozygotes qui avaient eux aussi la taille du repas sanguin significativement plus élevée (5,02 $\mu\text{l}/\text{mg}$) que les moustiques double homozygotes sensibles (3,6 $\mu\text{l}/\text{mg}$) RS/RS vs SS/SS (P=0,003 ; t=2,8).

Nous avons également observé que la taille du repas de sang chez les moustiques à la fois homozygotes sensibles pour *CYP6P9a* et homozygotes résistants pour *CYP6P9b* était significativement plus élevée (4,81 $\mu\text{l}/\text{mg}$) que chez les moustiques double homozygotes sensibles (3,6 $\mu\text{l}/\text{mg}$) (P=0,03). La même observation était faite (P=0,01) pour les individus homozygotes sensibles pour *CYP6P9a* et hétérozygotes pour le gène *CYP6P9b* (taille du repas sanguin = 5,9 $\mu\text{l}/\text{mg}$) comparés aux moustiques double homozygotes sensibles (taille du repas sanguin = 3,6 $\mu\text{l}/\text{mg}$).

L'ensemble des résultats de cette analyse suggère l'effet combiné de l'allèle résistant des deux gènes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* augmenterait la taille du repas sanguin pris par un moustique en comparaison au moustique sensible.

Tableau X : Effet combiné des mutations *CYP6P9a*-R et *CYP6P9b*-R sur la taille du repas de sang pris par le moustique *Anopheles funestus*

Combinaison des génotypes	Taille de sang (µl/mg)	Valeur de p
RR/RR vs RS/RS	4,85 vs 5,02	0,35
RR/RR vs SS/SS	4,85 vs 3,6	0,002*
RS/RS vs SS/SS	5,02 vs 3,6	0,003*
SS/RR vs SS/SS	4,81 vs 3,6	0,03*
SS/RS vs SS/SS	5,09 vs 3,6	0,01*
RS/RS vs SS/RS	5,02 vs 5,09	0,74
RS/RS vs SS/RR	5,02 vs 4,81	0,41
RR/RR vs SS/RR	4,85 vs 4,81	0,48

RR/RR : doubles homozygotes résistants au *CYP6P9a* et *CYP6P9b*, **SS/SS** : doubles homozygotes sensibles au *CYP6P9a* et *CYP6P9b*, **RS/RS** : doubles hétérozygotes au *CYP6P9a* et *CYP6P9b*, **SS/RR** : homozygotes sensibles au *CYP6P9a* et homozygotes résistants au *CYP6P9b* ; **RR/SS** homozygotes résistants au *CYP6P9a* et homozygote sensibles au *CYP6P9b*, **SS/RS** ; homozygote sensibles au *CYP6P9a* et hétérozygotes *CYP6P9b*. ; (*) Différence significative $p < 0,05$

III.2.2.6. Etude de l'association entre l'expression des gènes codant pour les protéines salivaires et la taille du repas sanguin chez les individus d'*Anopheles funestus* portant des gènes de résistance aux insecticides

Dans cette partie du travail, il était question d'évaluer si l'impact observé de la mutation *CYP6P9a*-R sur la taille du repas sanguin pourrait être une conséquence de l'expression différentielle des protéines salivaires chez les moustiques *An. funestus* portant ce mécanisme de résistance.

Pour ce faire, le niveau d'expression de l'AAPP et de 4 membres des gènes salivaires de la famille D7 (D7r1, D7r2, D7r3 et D7r4) a été analysé et comparé entre les moustiques de génotype homozygote résistant (*CYP6P9a*-RR), hétérozygote (*CYP6P9a*-RS) et homozygote

sensible (*CYP6P9a*-SS) (fig. 29). Il ressort de cette analyse qu'aucune différence significative du niveau d'expression de chacun de ces gènes n'a été observée entre les trois types de moustiques. Toutefois, les gènes de la famille D7 ont semblé montrer une légère tendance à une surexpression chez les moustiques portant l'allèle mutant (*CYP6P9a*-RR et *CYP6P9a*-RS) en comparaison avec ceux portant l'allèle sauvage (*CYP6P9a*-SS). Ce résultat suggère que l'allèle *CYP6P9a*-R responsable de la résistance aux pyréthriinoïdes n'influence significativement pas le niveau d'expression des gènes codant pour AAPP et les protéines de la famille des D7 dans les glandes salivaires des moustiques *An. funestus*. Cette observation montre que la taille du repas sanguin supérieur chez les individus d'*An. funestus* résistants aux pyréthriinoïdes en comparaison avec les individus susceptibles ne serait pas une conséquence de la modulation de l'expression des protéines salivaires intervenant dans la prise du repas sanguin par les mutations génétiques impliquées dans la résistance chez ce vecteur.

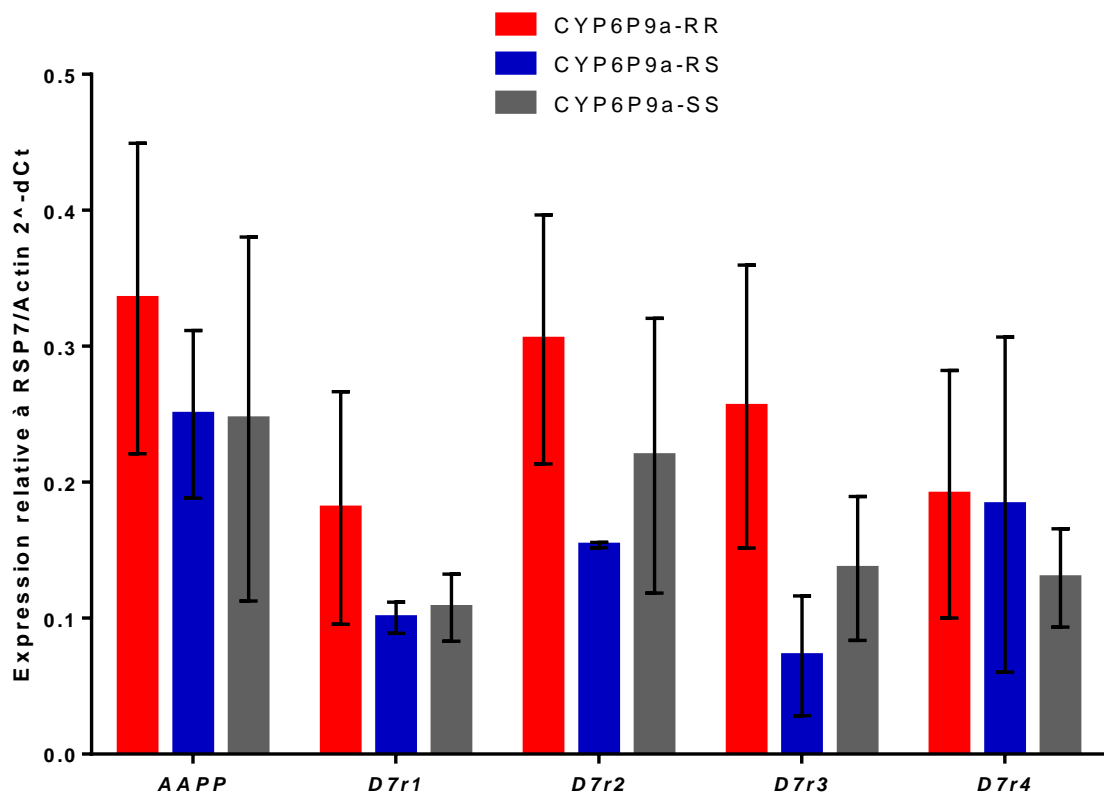


Figure 29 : Profil d'expression des gènes salivaires des familles AAPP et D7 chez *Anopheles funestus* en fonction du génotype de la mutation CYP6P9a-R.

III.2.3. Conséquences de la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthrinoïdes sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez *An. funestus*

Pour répondre à cet objectif, nous avons travaillé avec la génération 1 (G1) issues des moustiques collectés sur le terrain et qui ont été amenés à pondre à l'insectarium. Ces moustiques ont reçu un repas de sang infecté de gamétocyte d'une souche sauvage de *P. falciparum*. La présente étude étant nouvelle chez *An. funestus* s.s., la souche Ngouso (*An. coluzzii*) maintenue à l'OCEAC depuis 2006 et connue comme très susceptible à l'infection par *P. falciparum* a servi de contrôle 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. L'impact de la résistance aux insecticides a été étudié en comparant : la prévalence d'infection (présence des sporozoïtes) et l'intensité (nombre de sporozoïtes) dans les glandes salivaires entre les groupes de moustiques constitués sur la base du marqueur de résistance *L119F-GSTe2*

Un total de 1200 femelles d'*An. funestus* issues de la première génération des moustiques collectés sur le terrain et élevé au laboratoire, âgées de 4 à 6 jours, a été autorisé à se gorger avec du sang humain contenant des gamétocytes de *P. falciparum*. Parmi ces moustiques, 300 (25%) ont pris un repas de sang complet évalué par l'observation d'un abdomen totalement rempli). De ces 300 individus ayant pris un repas de sang complet, 281 ont survécu jusqu'au quatorzième jour après l'infection soit un taux de mortalité de 6,33%. L'analyse de la répartition des génotypes de la mutation *L119F* a été effectuée sur 251 individus : 13 (5,2%) individus étaient homozygotes résistants *119F/F-RR*, 63 (25,1%) étaient hétérozygotes *L119F-RS* et 175 (69,7%) étaient homozygotes sensibles *L/L119* (Tableau XI).

La recherche des sporozoïtes de *Plasmodium* dans les glandes salivaires de ces moustiques 14 jours après l'infection expérimentale a montré que seuls 32/251 (12,7%) ont pu être infectés avec succès par *P. falciparum*. La prévalence des sporozoïtes en fonction du génotype variait de 0% (0/32) pour les homozygotes résistants RR, 37,5% (12/32) pour les hétérozygotes RS et 62,5% (20/32) pour les homozygotes sensibles. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre le taux d'infection chez les moustiques hétérozygotes et les homozygotes sensibles.

Tableau XI : Répartition des génotypes de la mutation L119F du gène *GSTe2* chez des individus d'*Anopheles funestus* après infection expérimentale par *Plasmodium falciparum*

	Proportion des génotypes des moustiques gorgés	Proportion de moustiques infectés
RR	13 (5, 2%)	0/32 (0%)
RS	63 (25, 1%)	12/32 (37, 5%)
SS	175 (69, 7%)	20 /32 (62, 5%)

hétérozygotes RS (2239 copies de génome) que les individus aux génotypes homozygotes sensibles SS (2129 copies de génome) mais la différence n'était pas statistiquement significative ($p > 0,05$). L'absence d'individus positivement infectés parmi les moustiques homozygotes résistants a rendu impossible toute analyse comparative avec ce groupe de moustique.

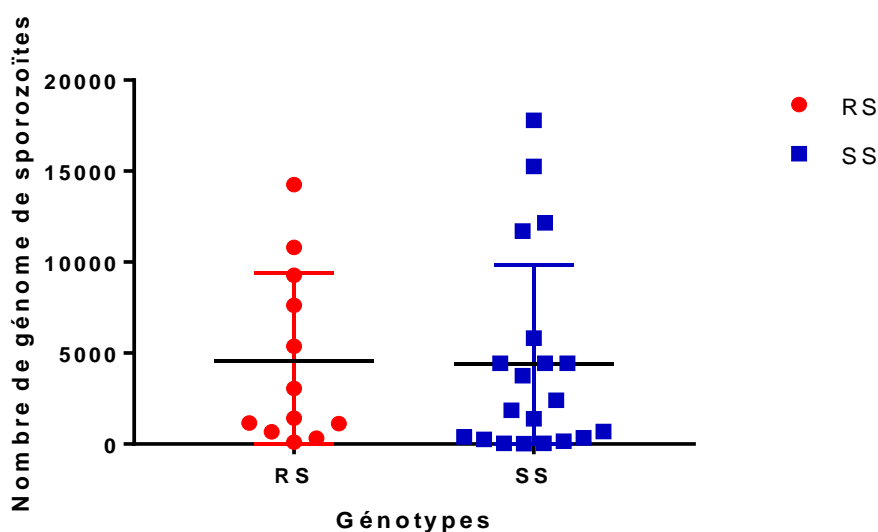


Figure 30 : Intensité de l'infection *Plasmodium falciparum* en fonction du génotype de la mutation L119F-GSTe2 chez *Anopheles funestus*

III.2.3.1. Niveau d'expression des gènes récepteurs des *Plasmodium* dans les glandes salivaires

Cette partie de l'étude ici visait à évaluer l'association entre le niveau d'expression des gènes codant pour les protéines réceptrices des sporozoïtes et la résistance due au GSTe2. Pour cela, le niveau d'expression de ces gènes salivaires a été déterminé par qPCR et comparé entre

les moustiques portant le génotype homozygote résistant, hétérozygote, et sensible de la mutation *L119F-GSTe2*. Ainsi, nous avons comparé le niveau d'expression de 4 gènes (fig. 31) à savoir :

- ❖ la **Trio** (protéine qui possède une propriété anti hémostatiques/immunomodulatrice) ;
- ❖ **Saglin** (protéine saline identifiées comme cible d'anticorps monoclonaux affectant l'infectivité des glandes salivaires des sporozoïtes de *Plasmodium*) ;
- ❖ la **Sgs4** (famille de protéines spécifiques du moustique qui sont des récepteurs candidats pour l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes) ;
- ❖ la **PRS1** (protéines qui module le développement du *Plasmodium* à la fois au niveau de l'intestin moyen et des glandes salivaires) entre les moustiques qui ont été premièrement détecté positifs au *Plasmodium*, et par la suite entre les moustiques hétérozygotes L119F-RS et homozygotes sensibles L119F-SS.

Il ressort de cette analyse que le niveau d'expression du gène Trio était plus élevé chez les moustiques portant l'allèle mutant du gène (L119F-RS) comparé à ceux portant l'allèle sensible (L119F-SS) bien que les différences n'étaient pas significatives. Cependant pour les autres gènes aucune différence n'a été observée. En effet, les valeurs du FC présentées sur la figure 31 ont montré que pour la Saglin, la PRS1, la SG4, le niveau d'expression n'était pas différent entre les deux groupes de moustiques. Pour la TRIO par contre, le FC montre que le niveau d'expression était 2 fois élevé chez RS que chez SS. Toutefois, cette différence n'était cependant significative ($p=0,4$).

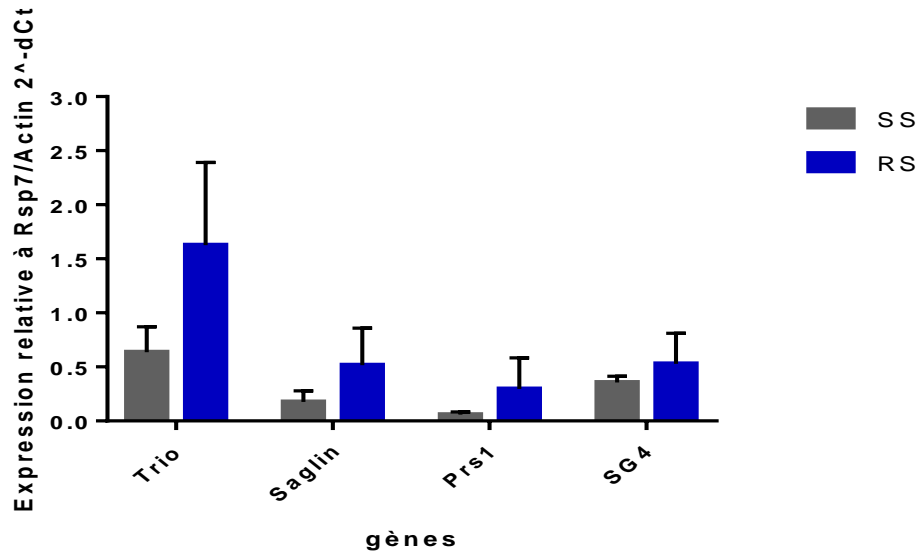


Figure 31 : Niveau d'expression des gènes codant pour les protéines réceptrices des sporozoïtes dans les glandes salivaires en fonction du génotype de la mutation L119F chez *Anopheles funestus*.

III.2. Discussion

Au cours des dernières décennies, la mortalité liée au paludisme a diminué de façon considérable en Afrique subsaharienne (WHO 2021). Malheureusement, les efforts visant à l'élimination du paludisme sont mis en péril par la résistance aux insecticides apparue chez les principaux vecteurs, depuis que l'utilisation généralisée des insecticides sous forme de pulvérisations intradomiciliaire (PID) ou de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA), constitue le seul moyen de prévention de masse contre le paludisme. Toutefois, s'il est vrai que la résistance confère un avantage sélectif en présence de l'insecticide, il a été observé qu'elle pourrait avoir un coût génétique et impacter de nombreux traits de vie des individus résistants (Michel Raymond *et al.*, 2001a; John Vontas *et al.*, 2020).

Par exemple il a été observé que la résistance aux pyréthriinoïdes avait un impact sur le cycle gonotrophique qui s'est avéré être plus long chez les moustiques *Anopheles gambiae* résistants comparé aux moustiques sensibles. De même, le nombre d'œufs pondus par moustique et le pourcentage d'éclosion étaient faibles chez les moustiques résistants comparé aux sensibles (Osoro *et al.*, 2022). Dans la même lancée, les travaux de Tchouakui *et al.* (2018) chez *An. funestus* ont montré que la mutation *L119F-GSTe2* associée à la résistance aux pyréthriinoïdes et au DDT impactait la durée de développement des moustiques. Les souches de moustiques résistants avaient en effet une durée de développement plus longue que celle des souches sensibles (Tchouakui *et al.*, 2018). De plus ces auteurs ont montré que les moustiques sensibles (SS) homozygotes L/L119 pondaient significativement plus d'œufs et avaient une capacité de ponte supérieure à celle des moustiques résistants. D'autres, études récentes ont montré que la résistance aux insecticides pourrait aussi impacter la composition des protéines dans la salive des moustiques (Cornelie *et al.*, 2014; Djegbe *et al.*, 2011; Vijay *et al.*, 2015). Cependant, malgré l'importance de la salive du moustique dans la prise du repas sanguin de ce dernier, mais surtout dans la transmission des *Plasmodium* à l'Homme, très peu de données sont disponibles sur l'impact que pourrait avoir la résistance aux insecticides sur la composition des protéines salivaires chez les moustiques et les conséquences qui peuvent en découler sur la capacité vectorielle des anophèles. Dans le but d'enrichir les connaissances de la communauté scientifique sur la transmission de *Plasmodium falciparum* à l'homme par les anophèles dans un contexte de résistance aux insecticides, cette thèse avait pour objectif d'évaluer l'influence des mécanismes de résistance aux pyréthriinoïdes sur l'expression des protéines salivaires chez les populations de moustiques sauvages d'*Anopheles funestus* et les conséquences de cette

modulation sur le bon déroulement du repas sanguin et l'invasion des plasmodiums dans les glandes salivaires de ce vecteur majeur du paludisme en Afrique.

Impact de la résistance aux insecticides sur la composition des protéines dans les glandes salivaires (sialome) chez les populations sauvages d'*Anopheles funestus*

L'étude des protéines des glandes salivaires du vecteur du paludisme est d'une importance fondamentale et un point d'attraction en raison de leur rôle dans l'alimentation du moustique, la transmission du parasite du paludisme (Vijay *et al.*, 2015). En effet, au cours de la piqûre, l'introduction des pièces buccales de l'arthropode dans l'organisme de l'hôte, engendre une réaction de ce dernier. Cette réponse de l'hôte est généralement de type hémostatique (agrégation plaquettaire, vasoconstriction, coagulation sanguine), inflammatoire ou encore immunologique (Ribeiro, 2000). Ainsi, pour s'assurer de prendre leur repas de sang, les arthropodes doivent absolument contrecarrer cette réponse hémostatique de l'hôte. Pour cela, ils ont développé au cours de leur évolution, une diversité de composés moléculaires (des protéines majoritairement) ayant des propriétés pharmacologiques et immunologiques qui sont contenues dans leur (Champagne, 2004; Francischetti, 2010; Ribeiro *et al.*, 1995). Ces protéines sécrétées avec la salive dans la peau de l'hôte au moment de la piqûre, vont créer un ensemble de modifications physiologiques de la réponse de l'hôte au site de la piqûre, ce qui va favoriser le bon déroulement du repas sanguin de l'arthropode et le parasite peut dès lors être transmis (Ribeiro 1995). Toutefois, le nombre et la composition de ces protéines dans les glandes salivaires du moustique peuvent être influencés par des paramètres tels que l'âge et l'état de l'infection par les pathogènes (Choumet *et al.*, 2014). Très récemment, il a été démontré que la résistance pouvait également modifier la composition de ces protéines dans les glandes salivaires des moustiques tels que *Culex quinquefasciatus* (Djegbe, 2011), *An. stephensi* (Vijay, 2015) ou *An. gambiae* (Cornelie *et al.*, 2014). Il n'existe cependant pas de données sur l'autre vecteur majeur de paludisme en Afrique qu'est *An. funestus*. De plus aucune étude n'a été faite sur l'impact que cette modification de la composition des protéines par la résistance aux insecticides pourrait avoir sur la capacité du moustique à transmettre les plasmodiums à l'homme. Dans la première partie de la thèse nous nous sommes intéressés de savoir comment les mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes pouvaient influencer la composition des protéines dans les glandes salivaires du moustique *An. funestus*.

Nous avons ainsi observé de manière générale qu'il y'a impact de la résistance sur l'expression de plusieurs gènes chez le moustique. En effet, il était observé que les niveaux

d'expression de nombreux gènes importants étaient significativement différents entre les moustiques résistants et les moustiques sensibles. Nos résultats vont dans le même sens que les travaux de Bonizzoni *et al.* (2012), Riveron (2017, 2014b) qui par des analyses transcriptomiques sur le moustique entier ont trouvé un nombre élevé de protéines différemment exprimés chez les souches de moustiques résistantes comparées aux souches sensibles à la deltaméthrine. L'observation du nombre élevé de gènes différemment exprimés au niveau des glandes salivaires démontre que la résistance a des conséquences dans plusieurs compartiments du moustique.

L'intérêt principal de notre étude étant focalisé majoritairement sur l'expression des gènes codant pour les protéines salivaires impliquées dans le repas sanguin ou l'invasion des sporozoïtes, nous avons observé qu'au total 7 protéines sécrétées uniquement dans les glandes salivaires avaient des niveaux d'expression différents entre moustiques résistant et sensibles. Parmi ces gènes on a notamment : la « **D7 long forme protein, la facilitated glucose transporter, salivary gland protein, salivary gland protein 1-like et enfin deux venom allergen** ». Ce nombre apparemment faible de gènes salivaires différemment exprimés va dans le même sens de travaux de Cornelia *et al.*, (2014), de Vijay *et al.*, (2015) et de Djegbe *et al.*, (2011) qui, par des analyses protéomique ont également trouvé un nombre très réduit de protéines différemment exprimées chez les souches de moustiques résistantes comparé aux souches sensibles. De plus, dans notre cas, ce nombre réduit de protéines salivaires différemment exprimés pourrait aussi s'expliquer par le fait que la sélection de nos souches pourrait avoir été biaisée. En effet, nous avons considéré comme « résistant » les moustiques vivants après une exposition d'une heure à l'insecticide et comme sensible les moustiques vivants non exposés à l'insecticide issus des familles qui présentaient un pourcentage de mortalité égal à 100%. Etant donné que pour les moustiques « sensibles » nos analyses n'ont pas été faites sur les individus exposés à l'insecticide, l'on ne peut garantir qu'au sein des individus non exposés des familles dites « sensibles » il n'y avait pas quelques-uns qui auraient pu être résistants. Une meilleure approche pourrait être de comparer des souches de moustiques résistants et les sensibles entretenue au laboratoire. Cependant nous aurions peut-être observé une tendance sans toutefois générer des données représentant la situation réelle sur les populations naturelles car le bagage génétique entre les deux souches serait différent. Ce très faible nombre de gènes différemment exprimés pourrait également s'expliquer par le fait que le bagage génétique de nos souches de moustiques était très proche et il aurait fallu que la différence soit significativement très élevée afin que l'expression différentielle des gènes soit détectée.

Néanmoins, la surexpression des protéines D7 *long form salivary protein* chez les souches résistantes pourrait augmenter leur action anti hémostatique et inflammatoire, qui pourrait alors permettre au moustique résistant d'avoir une grande quantité de sang à prélever dans la zone de pique et ceci pourrait potentiellement réduire le temps de la prise du repas sanguin. Cette hypothèse s'appuie sur quelques études menées sur la protéine D7LF chez l'espèce *Aedes albopictus* par Martin-Martin *et al.* (2020) qui ont démontré la fonction biologique de la protéine AlboD7L1 en tant qu'inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et du recrutement cellulaire des neutrophiles et des éosinophiles. De même chez *An. gambiae* Barion Smith en (2022) ont fait des essais fonctionnels confirmant que l'AngaD7L1 inhibait l'agrégation plaquettaire et vasoconstriction induites par l'U-46619, l'AngaD7L3 inhibe l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction induites par la sérotonine et enfin que l'AngaD7L2 avait un effet anticoagulant dose dépendant via la voie de coagulation intrinsèque en interagissant avec les facteurs XII, XIIIa et XI. La surexpression de la D7 chez le moustique résistant pourrait favoriser une prise de sang plus élevée chez ces derniers et par ricochet avoir un impact sur la fécondité. Parallèlement le temps de piqûre réduit observé chez le moustique résistant lui confère un avantage d'échapper à la prédation ce qui peut donc lui permettre de transmettre plus facilement le parasite.

Le niveau d'expression plus élevé de la Saglin chez les moustiques résistants comparé aux moustiques sensibles laisse penser que l'intensité de l'infection à *Plasmodium* dans les glandes serait plus élevée chez le moustique résistant comparé au moustique sensible. Cette hypothèse se justifie par le fait que la protéine salivaire Saglin est décrite comme un des récepteurs des sporozoïtes du *Plasmodium* dans les glandes salivaires (Klug *et al.*, 2023). Dans une étude récente de Klug *et al.* (2023) par exemple, il a été observé que chez les souches de moustique *An. gambiae* dépourvus de Saglin, l'intensité et la prévalence de l'infection par *Plasmodium* était réduite. De ce fait, l'on pourrait donc émettre l'hypothèse que chez un moustique *An. funestus* résistant aux insecticides, le niveau d'expression élevé de la saglin induirait une augmentation du nombre de récepteurs. La conséquence de cela serait donc que le moustique résistant porterait un plus grand nombre de sporozoïtes du *Plasmodium* dans ses glandes salivaires et transmettrait par conséquent plus facilement le paludisme que les moustiques sensibles.

L'expression différentielle des gènes codant pour les protéines salivaires impliquées dans le repas sanguin et l'installation des sporozoïtes dans les glandes salivaires amène à l'hypothèse selon laquelle, les moustiques résistants auraient plus de chance à prendre du sang

et transmettraient plus efficacement le parasite que les moustiques sensibles. Cela pourrait expliquer pourquoi dans les zones endémiques telle que le Cameroun, malgré la forte couverture des outils de lutte antivectorielle, on observe une recrudescence du paludisme.

Impact de la modulation de la composition du sialome par la résistance aux insecticides sur le déroulement du repas sanguin chez *Anopheles funestus*

La prise de sang chez le moustique est un élément très capital pour ce dernier car elle permet d'assurer la maturation des œufs. De plus, la taille de sang pris peut avoir un impact sur la fécondité (JMe Ribeiro, 1995). Dans le cadre de notre étude, nous avons observé que la mutation *CYP6P9a*, contrairement aux mutations *L119F-GSTe2* et *CYP6P9b* pouvait avoir un impact sur le succès de prise de repas sanguin du moustique *An. funestus*. En effet, en comparaison avec les moustiques des souches sensibles, la probabilité d'avoir un repas sanguin complet était plus élevée pour les individus portant l'allèle mutant du gène *CYP6P9a* responsable de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus*. Un tel avantage sélectif de l'allèle de résistance au *CYP6P9a* a également été rapporté précédemment dans une étude dans des cases expérimentales sur le terrain, montrant ainsi que les moustiques portant le génotypes homozygotes *CYP6P9a-RR* avaient une probabilité à prendre un repas sanguin complet sur l'homme significativement plus élevée que les moustiques homozygotes sensibles *SS* (Weedall *et al.*, 2019). Ce résultat suggère que la résistance métabolique médiée par le *CYP6P9a* pourrait influencer la capacité du moustique *An. funestus* à se nourrir de sang. Cette prise de sang aurait un grand impact sur la fécondité des moustiques résistants avec pontes abondantes et le risque de transmission sera également plus élevé chez ces derniers. En revanche, l'absence d'association observée ici pour la mutation *L119F-GSTe2* devrait être confirmée par d'autres études car dans le cadre de notre étude, cela pourrait résulter d'un biais lié à la faible taille de l'échantillon de moustiques homozygotes résistants pour la mutation *L119F-RR*.

Le mécanisme par lequel l'allèle résistant au *CYP6P9a-R* pourrait influencer l'alimentation des moustiques est inconnu et n'a pas été examiné dans la présente étude. Une hypothèse pour expliquer cette association pourrait être liée à la motivation du moustique à se nourrir de sang. En effet, il a été rapporté que certains individus de moustiques qui ont émergé avec des réserves ténérales insuffisantes nécessitent un repas sanguin initiale pour compenser l'insuffisance des réserves ténérales plutôt que pour le développement des œufs pendant leur premier cycle gonotrophique (Klowden & Lea, 1978; Takken *et al.*, 2001). Ce phénomène est surtout observé chez les moustiques femelles de petite taille qui émergent avec des réserves

insuffisantes (Briegel, 1990). Ainsi, nous pouvons présumer que les moustiques résistants au *CYP6P9a* qui ont été trouvés significativement plus petits que les moustiques sensibles dans la présente étude étaient plus motivés à se nourrir de sang car ils étaient probablement ceux qui en avaient plus besoin pour compenser leurs réserves ténérales insuffisantes.

Cependant, il est important de noter qu'il était surprenant et inhabituel d'observer des moustiques homozygotes sensibles *CYP6Pa-SS* plus gros que les moustiques homozygotes résistants *CYP6Pa-RR* puisque des études précédentes ont souvent rapporté que les moustiques plus gros ont tendance à être plus tolérants aux insecticides, ou que les phénotypes résistants sont associés à des tailles corporelles plus grandes (Jeanrenaud *et al.*, 2019; Owusu *et al.*, 2017). Cette observation inhabituelle pourrait s'expliquer par le fait qu'au lieu d'utiliser des moustiques morts séchés et non nourris comme cela se fait habituellement, dans la présente étude le poids a été estimé en utilisant des moustiques frais et vivants qui ont été nourris avec une solution sucrée jusqu'à 24 heures avant d'être pesés, ceci reflétant mieux la réalité du terrain. De même, bien que les moustiques aient été élevés dans les mêmes bacs (au stade larvaire) ou cages (au stade adulte), regroupés indépendamment de leur génotype, certains paramètres importants tels que la densité larvaire, la quantité de nourriture n'étaient pas strictement contrôlés. Nous ne pouvons donc pas exclure que cette absence de conditions d'élevage contrôlées ait influencé de manière significative la croissance des moustiques et par conséquent leur poids corporel. Globalement, il est important de noter que le poids corporel inhabituel d'*An. funestus* observé ici représente une limitation importante de notre étude. Ce point souligne la nécessité de réaliser d'autres études, par exemple avec des moustiques séchés, avant de confirmer notre hypothèse sur l'association entre la réserve ténérale et la mutation de *CYP6P9a*. Une autre approche pourrait être de réaliser des essais calorimétriques comparant la réserve ténérale entre les moustiques *CYP6Pa-SS* et *CYP6Pa-RR*. Nous pourrions aussi simplement mesurer et comparer la taille des ailes entre les moustiques *CYP6Pa-SS* et *CYP6Pa-RR*. Ces autres études seraient certainement plus informatives sur l'influence de la résistance métabolique sur la motivation du moustique *An. funestus* à se nourrir de sang.

Influence de la résistance aux insecticides sur le temps de sondage et la durée de l'alimentation

Il a été signalé dans les travaux antérieurs qu'une alimentation rapide réduit le risque d'être tué par le comportement défensif de l'hôte (Diop *et al.*, 2019; Lyimo *et al.*, 2012). L'influence de la résistance métabolique sur le temps de sondage et la durée de l'alimentation a

été évaluée dans la présente étude uniquement pour la mutation L119F-GSTe2. Les résultats n'ont révélé aucune influence significative de ce gène de résistance métabolique sur le temps de sondage. L'absence d'influence de la résistance aux insecticides sur le temps de sondage du moustique a également été rapportée pour le gène de résistance knockdown (kdr) chez *An. gambiae* en comparant le temps de sondage entre les génotypes (RR, RS et SS) après exposition à une moustiquaire non traitée et traitée à l'insecticide (Diop *et al.*, 2019). Cela semble indiquer que la résistance aux insecticides pourrait ne pas avoir d'impact sur le temps de sondage chez les anophèles pendant leur repas sanguin sur l'homme. Néanmoins, cette hypothèse doit être prise avec prudence car, à notre connaissance, et à l'exception de la présente étude et de celle de Diop *et al.* (2019), très peu d'informations sont disponibles sur l'impact de la résistance aux insecticides sur le temps de sondage lors de la prise de sang des moustiques. D'un autre côté, même si la différence n'était pas statistiquement significative, les moustiques possédant un allèle résistant 119F-GSTe2 (homozygotes et hétérozygotes) ont passé moins de temps à prendre leur repas sanguin que les moustiques sensibles. Ceci corrobore l'observation faite précédemment pour la mutation kdr chez *An. gambiae* avec une durée d'alimentation plus faible pour les moustiques homozygotes résistants que pour les moustiques hétérozygotes et homozygotes sensibles (Diop *et al.*, 2019). De plus, le résultat non significatif observé peut être dû à la faible taille de moustiques résistants dans la présente étude. On peut aussi penser que cette absence d'influence observée dans notre étude soit due au fait qu'on a non seulement, travaillé avec un seul type d'insecticide mais aussi, notre intérêt était porté sur un seul mécanisme de résistance. Il serait donc intéressant d'étudier cela pour plusieurs insecticides et d'autres mécanismes de résistance.

Effet de la résistance métabolique sur la taille du repas sanguin

Nous avons observé dans cette étude que la taille du repas de sang pris par un moustique au cours d'un seul repas sanguin était associée au génotype du gène P450 *CYP6P9a* mais pas à la mutation *L119F-GSTe2* de la résistance métabolique. Ceci suggère que les mécanismes impliqués dans la résistance métabolique aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus* pourraient influencer de manière différente les traits de vie des moustiques. Cependant, comme mentionné plus haut, nous ne pouvons pas exclure que l'absence de l'influence observée pour le gène *L119F-GSTe2* pourrait également être liée au faible nombre de moustiques homozygotes résistants L119F- RR utilisés dans l'étude. Cette dernière hypothèse semble d'ailleurs renforcée par les résultats d'études précédentes montrant que la mutation *L119F-GSTe2* (Tchouakui *et al.*, 2018) et le gène de résistance *CYP6P9a-R* (Tchouakui *et al.*, 2020) influencent la fécondité

d'An. funestus de la même manière. L'association positive entre l'allèle résistant CYP6P9a-R et la taille du repas sanguin est en accord avec les travaux de Okoye *et al.* (2007) rapportant que le mécanisme de résistance aux pyréthrinoïdes chez *An. funestus* d'Afrique australe n'entraîne aucune réduction dans la fitness du moustique (Okoye *et al.*, 2007). Ainsi, nos résultats suggèrent que la surexpression du gène *CYP6P9a* n'impacterait probablement pas la taille du repas sanguin ingéré par les moustiques portant l'allèle résistant au *CYP6P9a-R*.

Étant donné que l'activité des P450 monooxygénases ainsi que la digestion du repas sanguin, ont été signalés comme générant une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmentant le stress oxydatif qui pourrait induire plusieurs dommages dans le système du moustique pouvant entraîner la mort (Rivero *et al.*, 2010; Saeaeu *et al.*, 2011), on aurait pu s'attendre à ce que les moustiques homozygotes résistants *CYP6P9a-RR* prennent moins de sang pour réduire les effets négatifs du stress oxydatif. Cette observation pourrait certainement être expliquée par la capacité des moustiques anophèles à faire face aux dommages oxydatifs après la prise de sang en augmentant l'activité antioxydante notamment la superoxyde dismutase (SOD) Cu Zn et Mn, la catalase, les peroxydes de glutathion et la thiorédoxine réductase (Graça-Souza *et al.*, 2006). Cela suggère que l'association entre l'allèle résistant au *CYP6P9a-R* et la taille du repas sanguin du moustique pourrait être une conséquence indirecte de certaines activités physiologiques. Par exemple, parce que les moustiques résistants au *CYP6P9a-RR* étaient significativement plus petits que leurs homologues sensibles, et en notant qu'il a été démontré que la réserve ténérale est proportionnelle à la taille du corps du moustique (Briegel, 1990), nous pouvons présumer que la taille élevée du repas sanguin ingéré par les moustiques *CYP6P9a-RR* pourrait être le résultat d'un besoin de compenser le volume limité de réserves ténérales limitées après l'émergence. Dans ce cas, l'association observée ici pourrait être une conséquence indirecte de l'association négative de l'allèle résistant au *CYP6P9a-R* récemment observée sur le développement larvaire de *An. funestus* (Tchouakui *et al.*, 2020), ce qui entraîne une petite taille corporelle, et donc des réserves ténérales insuffisantes pour les moustiques résistants. En effet, il a été démontré que l'alimentation des larves d'anophèles dans un milieu influence fortement les traits liés aux conditions physiques des adultes, tels que la taille du corps et les réserves métaboliques ténérales (Briegel, 1990; Briegel *et al.*, 1979; Telang & Wells, 2004). Cependant, nos résultats n'ont pas corroboré l'association positive précédemment rapportée entre la taille du repas sanguin ingéré et la taille du corps du moustique (Briegel, 1990). D'autres études permettront

d'élucider la raison sous-jacente de cette corrélation entre les génotypes *CYP6P9a* et la taille des repas sanguins.

Influence de l'allèle résistant au *CYP6P9a*-R sur l'expression des gènes des glandes salivaires et conséquences sur le déroulement du repas sanguin

Pour obtenir un repas sanguin réussi, un moustique femelle doit mettre en balance le risque de mort causé par le comportement défensif de l'hôte contre les avantages de se nourrir sur une espèce hôte qui maximise la fertilité (Edman & Scott, 1987). Pour cela, le moustique utilise les propriétés pharmacologiques de certaines de ces protéines salivaires pour contrecarrer la réaction de l'hôte. Dans la présente étude, nous avons évalué le niveau d'expression des gènes codant pour des protéines salivaires connues pour leur implication dans le processus de prise de sang des moustiques. Nous nous sommes intéressés particulièrement au gènes comme l'AAPP et les membres de la famille des protéines D7 (Calvo *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2019). L'analyse comparative du niveau d'expression de ces gènes entre les différents génotypes du gène *CYP6P9a* n'a montré aucune différence significative entre les moustiques portant l'allèle résistant et ceux ayant l'allèle sensible. Ce résultat suggère que les niveaux d'expression des gènes salivaires de la famille AAPP et D7 ne seraient pas influencée par la mutation *CYP6P9a*. Cette observation est étrange car certains gènes salivaires tels que les gènes de la famille D7 ont été précédemment signalés comme étant surexprimés chez *An. funestus* résistant par rapport à la souche sensible (Elanga-Ndille *et al.*, 2019; Riveron *et al.*, 2014a; Wilding *et al.*, 2015). De plus, cette tendance a été observée à l'objectif 1 de notre travail. L'absence d'association observé avec l'expression différentielle des gènes dans la présente étude pourrait être expliquée par le fait que nos analyses dans cette étude ont été effectuées sur des moustiques obtenus après des croisements entre deux souches différentes et partageant donc le même bagage génétique, alors que d'autres études ont comparé des moustiques de terrain, résistants aux insecticides avec des souches de laboratoire sensibles avec un bagage génétique différent (Elanga-Ndille *et al.*, 2019; Riveron *et al.*, 2014a; Wilding *et al.*, 2015). Une autre hypothèse pouvant justifier l'absence d'association serait le fait que nous nous soyons intéressés à un seul marqueur de résistance alors que dans les autres cas, c'était de la résistance phénotypique et par conséquent plusieurs marqueurs et mécanismes impliqués. Plus encore, la faible taille de nos échantillons, la souche de moustique utilisée (souches de laboratoire qui ne sont pas soumises à une pression insecticide et donc le gène est probablement

beaucoup moins exprimé que chez les souches de terrain utilisées par les autres études) pourraient également justifier l'absence d'association observée.

Toutefois, l'absence d'influence du gène *CYP6P9a* sur le niveau d'expression des gènes des glandes salivaires impliqués dans le processus de prise de sang observée dans la présente étude, semble indiquer que l'association trouvée entre ce marqueur et la taille du repas sanguin pris par *An. funestus* ne serait pas liée à l'expression des protéines qui interviennent dans le processus du **repas sanguin**.

Conséquence de la modulation de l'expression des protéines salivaires par la résistance aux pyréthriinoïdes sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires chez *Anopheles funestus*

Les protéines salivaires, inoculées avec la salive au moment de la piqûre, peuvent également jouer un rôle important dans la transmission des pathogènes et le développement de l'infection chez l'hôte (Andrade *et al.*, 2005). Cette étape est très importante car elle est la dernière phase du développement du parasite chez le moustique avant son passage à l'homme et est par conséquent fondamentale pour évaluer le risque réel de la transmission. De nombreux travaux réalisés sur les moustiques du genre *Anopheles* ont démontré que l'invasion des plasmodiums dans les glandes salivaires nécessite une reconnaissance du composant de surface des glandes salivaires de moustiques par le parasite (Korochkina *et al.*, 2006 ; Wang *et al.* 2013). D'autres études ont décrit des protéines salivaires comme les récepteurs qui facilitent la fixation des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Il a en effet été montré qu'une protéine salivaire appelée saglin, était un récepteur sur lequel le sporozoïte va se fixer dans les glandes salivaires du moustique (Okulate M *et al.*, 2007). Dans le même ordre d'idée, la protéine salivaire CSPBP (*CSP-Binding Protein*) a été identifiée comme jouant un rôle essentiel dans l'invasion des Plasmodiums dans les glandes salivaires d'*Anopheles gambiae* (Wang *et al.*, 2013), la protéine Trio ayant des propriétés anti-hémostatiques/immunomodulatrices (Cornelie *et al.*, 2014), la protéine **PRS1** (plasmodium responsive 1) module le développement du plasmodium à la fois au niveau de l'intestin moyen et des glandes salivaires (Chertemps, 2010), la **SGS4** et **SGS5** appartenant à la superfamille des glandes salivaires chez les anophèles dont la fonction spécifique reste pas très connue mais soupçonné comme étant impliqués dans l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes du paludisme (Korochkina,2006). Cependant, nos résultats dans l'objectif 1 et comme les études de Vijay (2015) et Cornelie (2014) avec la technique de protéomique, ont montré que les protéines telles que la Sagline, la

SGS6, SGS7 pouvaient être surexprimés chez les moustiques résistants comparé aux souches sensibles.

De cette observation l'on pourrait émettre l'hypothèse que cette expression différentielle de ces protéines impacterait l'installation des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique. En effet, comme démontré par Chertemps *et al.*, (2010) lorsqu'on inhibe le gène PRS1 dans les glandes salivaires d'*An. gambiae* cela entraîne une diminution de 2 fois le nombre de sporozoïtes de *P. falciparum* chez ce dernier comparé à celui dont le gène n'a pas été inhibé. Également, Rodrigues *et al.* (2012) ont montré que l'inhibition de l'AgESP (*Anopheles gambiae* epithelial serine protease) chez les moustiques *An. gambiae* a entraîné une diminution du nombre de sporozoïtes *P. berghei* et *P. falciparum*, ce qui suggère un rôle dans l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes comparés à ceux dont le gène n'a pas été inhibé.

Les infections expérimentales réalisées avec les souches de moustiques collectés sur le terrain ont montré un taux engorgement très faible de ces moustiques (25%). Toutefois, cela était comparable à ceux obtenus au Cameroun par Ndo *et al.* (2016) et au Sénégal par Awono-Ambene *et al.* (2001), confirmant ainsi que les taux d'engorgement très faibles constituent une des limites importantes au cours des infections expérimentales des souches sauvages de *An. funestus* (Graves, 1980 ; Awono-Ambene *et al.*, 2001).

Le taux d'infection (13%) enregistré dans notre étude était inférieur à ceux observés par Ndo *et al.* (2016) au Cameroun qui ont également utilisé les souches sauvages de *An. funestus* s.s. Par contre les travaux de Xu *et al.* (2013) ont montré un taux d'infection significativement élevé variant de 62,5% à 95% lorsque les souches de *An. funestus* s.s. sauvages du Mali étaient exposés avec *P. berghei*. L'observation de cette disparité entre ses études peut être expliquée par le fait que les études antérieures se sont seulement attachées à évaluer le taux d'oocystes, tandis que notre étude s'est spécifiquement concentrée sur le stade sporozoïte, qui constitue une étape cruciale dans la transmission du paludisme. En effet, le développement sporogonique des plasmodiums chez les moustiques comporte plusieurs goulots d'étranglement où les parasites sont présents en nombre vulnérable (Hillyer *et al.*, 2007). Les sporozoïtes qui ne pénètrent pas dans le vaisseau dorsal sont transportés avec le flux d'hémolymphe dans tout le corps du moustique, et si une partie d'entre eux pénètrent probablement dans les glandes salivaires, beaucoup peuvent être trouvés piégés dans les appendices du moustique, le muscle alaire et d'autres endroits (Hillyer *et al.*, 2007 ; Golenda *et al.*, 1990). Dans le même sillage, Rosenberg *et al.* ont fait une étude comparative du nombre de sporozoïtes dans des oocystes uniques de moustiques infectés par *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* et une étude précédente

dans laquelle les sporozoïtes des glandes salivaires ont été dénombrés. Ils ont estimé que seulement 20% des sporozoïtes des oocystes réussissent à pénétrer dans les glandes salivaires (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991) ce qui justifierait bien évidemment le faible taux d'infection que nous avons observé dans notre étude ; d'où l'image plus réaliste de la compétence vectorielle de ce moustique.

N'ayant pas pu obtenir dans le cadre de nos expérimentations, des individus de moustiques infectés par *P. falciparum* et porteurs du génotype homozygote résistant du gène *L119F-GSTe2*, notre analyse s'est limitée à une comparaison entre les souches de moustique homozygote sensibles et hétérozygotes pour étudier l'impact de la résistance sur la prévalence et l'intensité d'infection des plasmodiums dans les glandes salivaires. Ainsi, bien que les différences soient non-significatives, la prévalence de sporozoïtes a semblé montrer une tendance plus élevée chez les moustiques homozygotes sensibles (SS) que chez les moustiques hétérozygotes (RS) alors que c'est la tendance inverse qui a été observée pour l'intensité de l'infection. Aussi, l'analyse des niveaux d'expression des gènes codant pour des protéines salivaires réceptrices des sporozoïtes dans les glandes salivaires a montré que la Saglin était plus exprimée chez les moustiques hétérozygotes résistants comparé aux moustiques portant le génotype homozygote sensible. La conséquence de cette expression plus élevée de la *Salivary gland Like1* (Saglin) serait que les sites récepteurs des sporozoïtes seraient plus abondants chez les moustiques portant l'allèle résistant ce qui justifie la forte intensité de l'infection chez les hétérozygotes (RS) comparé aux homozygotes sensibles (SS). Toutefois, la différence non significative pour l'ensemble des gènes pourrait être due au fait que la comparaison se limite au niveau allélique et également de la taille de l'échantillon qui était faible. Des comparaisons entre moustiques homozygotes résistant et sensibles auraient probablement été plus informatives sur l'impact ou non de la résistance sur l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

CONCLUSION
RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES

Conclusion

L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse avait pour objectif principal de fournir des informations sur l'impact de la résistance aux insecticides sur la composition du sialome et ses conséquences sur la capacité vectorielle chez *An. funestus* s.s. vecteur majeur du paludisme en Afrique subsaharienne. Ceci impliquait l'évaluation de l'impact de la résistance sur l'expression des protéines salivaires et également d'évaluer les conséquences de la modulation de l'expression de ces protéines sur la prise de repas sanguin et l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique. Il en ressort que :

- la résistance aux pyréthrinoïdes impacte significativement l'expression des gènes codant pour des protéines dans les glandes salivaires. Parmi les gènes dont l'expression était influencée par la résistance aux insecticides, nous avons dénombré ceux codant pour des protéines jouant un rôle important dans la prise du repas sanguin du moustique et l'invasion des sporozoïtes dans les glandes salivaires de ce dernier. Il s'est agi de la D7LF qui était surexprimée chez les souches « résistantes » comparé aux souches « sensibles », la Saglin (salivary gland protein 1-like) qui également était surexprimée chez les souches « résistantes » comparées aux souches « sensibles » ;
- la résistance aux pyréthrinoïdes médiée par la surexpression des gènes *CYP6P9a* et *CYP6P9b* augmenterait non seulement la probabilité pour les moustiques résistants en comparaison avec les moustiques sensibles, de prendre avec succès leur repas sanguin, mais aussi la taille du repas sanguin pris ;
- même si la différence n'était pas significative, nous avons observé que chez les moustiques porteurs de l'allèle mutant du gène *Gste2* comparés à ceux portant l'allèle sauvage, l'intensité de l'infection par les sporozoïtes des plasmodiums était plus élevée. Toutefois, ces impacts de la résistance sur le moustique n'étaient associés à la modulation de la composition des protéines dans les glandes salivaires du moustique *An. funestus*. En effet, l'expression différentielle des gènes codant pour ces protéines chez les souches de moustiques résistantes aux pyréthrinoïdes n'a pas été observée comme influençant ni le déroulement du repas sanguin et sa taille, ni l'intensité de l'infection des glandes salivaires du moustique par les sporozoïtes du *Plasmodium*. Ces observations renforcent donc la nécessité de trouver des stratégies de gestion du phénomène de résistance aux insecticides qui représente un véritable danger pour l'efficacité des différentes stratégies de lutte actuellement utilisées pour contrôler le paludisme.

RECOMMANDATIONS

Au terme de nos travaux, nous pouvons recommander aux autorités d'envisager une approche de lutte intégrée de la résistance en incluant une approche génétique qui pourrait cibler certains gènes salivaires tel que la « salivary gland protein 1-like, D7 long form salivary protein ». Aux populations, nous recommanderons l'utilisation des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action de nouvelle génération pour interrompre le contact homme vecteur. Aux chercheurs, nous recommanderons de mettre en place de nouveaux marqueurs qui permettraient de mieux étudier l'impact de la résistance aux insecticides sur les protéines salivaires et les conséquences qui peuvent en découler.

PERSPECTIVES

Nous nous proposons dans les travaux futurs de :

- ❖ Approfondir la recherche sur l'influence de la modulation des protéines salivaires par la résistance aux insecticides sur la capacité d'*An. funestus* à héberger les sporozoïtes dans les glandes salivaires ;
- ❖ étendre cette étude sur d'autres espèces vectrices du paludisme au Cameroun et à d'autres marqueurs de résistance ;
- ❖ utiliser une approche protéomique du fait que lors de l'étape de la traduction, il y a des protéines qui ne sont pas exprimées.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Agnew, P., Berticat, C., Bedhomme, S., Sidobre, C., Michalakis, Y., & Elena, S. (2004). Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution*, 58(3), 579-586.
- Alphey, L., Beard, C. B., Billingsley, P., Coetzee, M., Crisanti, A., Curtis, C. (2002). Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science*, 298(5591), 119-121.
- Andrade, B. B., Teixeira, C. R., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(4), 665-693.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Njiokou, F., Bigoga, J. D., Awono-Ambene, P., Etang, (2019). Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & Vectors*, 12, 1-23.
- Apperson, C. S. & Georghiou, G. P. (1975). Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *Journal of economic entomology*, 68 (2), 153-157.
- Awolola, T., Oduola, O., Strode, C., Koekemoer, L., Brooke, B., & Ranson, H. (2009). Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(11), 1139-1145.
- Bass, C., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L. M., & Williamson, M. S. (2004). Identification of the Rdl mutation in laboratory and field strains of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60(12), 1157-1162.
- Bejon, P., Andrews, L., Andersen, R. F., Dunachie, S., Webster, D., Walther, M. (2005). Calculation of liver-to-blood inocula, parasite growth rates, and preerythrocytic vaccine efficacy, from serial quantitative polymerase chain reaction studies of volunteers challenged with malaria sporozoites. *The Journal of infectious diseases*, 191(4), 619-626.
- Beklemishev, W. (1940). Gonotrophic rhythm as a basic principle of the biology of Anopheles. *Voprosy Fiziologii i Ekologii Malyariinogo Konara*, 1, 3-22.
- Bhatt, S., Weiss, D., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, (2015a). The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, 526(7572), 207-211.
- Bhatt, S., Weiss, D., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, (2015b). The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, 526(7572), 207.

- Björkman, A., Benn, C. S., Aaby, P., & Schapira, A. (2023). RTS, S/AS01 malaria vaccine proven safe and effective? *The Lancet Infectious Diseases*, 23 (8), e318-e322.
- Bonning, B. & Hemingway, J. (1991). The efficacy of acetylcholinesterase in organophosphorus and carbamate resistance in *Culex pipiens* L. from Italy. *Pesticide biochemistry and physiology*, 40(2), 143-148.
- Briegel, H. (1990). Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of Medical Entomology*, 27(5), 839-850.
- Briegel, H., Lea, A. O., & Klowden, M. J. (1979). Hemoglobinometry as a method for measuring blood meal sizes of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 15(3), 235-238.
- Brooke, B., Hunt, R., Matambo, T., Koekemoer, L., Van Wyk, P., & Coetzee, M. (2006). Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Medical and veterinary entomology*, 20(3), 294-299.
- Bryan, J., Di Deco, M., Petrarca, V., & Coluzzi, M. (1982). Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s. str. in the Gambia, West Africa. *Genetica*, 59(3), 167-176.
- Buxton, P. (1945). The use of the new insecticide DDT in relation to the problems of tropical medicine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(5), 367-400.
- Calvo, E., Dao, A., Pham, V. M., & Ribeiro, J. M. C. (2007). An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(2), 164-175.
- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. (2006). Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *Journal Biology Chemistry*, 281.
- Calvo, E., Mans, B. J., Ribeiro, J. M., & Andersen, J. F. (2009). Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3728-3733.
- Carter, R. & Miller, L. H. (1979). Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bulletin of the World Health Organization*, 57, 37-52.
- Casimiro, S., Coleman, M., Hemingway, J., & Sharp, B. (2014). Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. *Journal of Medical Entomology*, 43(2), 276-282.

- Champagne, D. E. (2004). Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders*, 4(4), 375-396.
- Chertemps, T., Mitri, C., Perrot, S., Sautereau, J., Jacques, J.-C., Thiery (2010). *Anopheles gambiae* PRS1 modulates *Plasmodium* development at both midgut and salivary gland steps. *PLoS One*, 5(7), e11538.
- Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J., Namane (2007). The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics*, 7, 3384–3394.
- Coetzee, M. & Fontenille, D. (2004). Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 34(7), 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.
- 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., Toto, J., 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.
- Coluzzi, M., Petrarca, V., & di Deco, M. A. (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Italian Journal of Zoology*, 52(1-2), 45-63.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., & Di Deco, M. (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), 483-497.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Cornelie, S., Rossignol, M., Seveno, M., Demetere, E., Mouchet, F., Djegbe, I. (2014). Salivary gland proteome analysis reveals modulation of anopheline unique proteins in insensitive acetylcholinesterase resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS One*, 9(8), e103816.

- Costantini, C., LI, S. G., Torre, A. D., Sagnon, N. F., 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.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K.-S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases*, *46*(2), 165-171.
- 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*, *5*(6), e11010.
- Darriet, F., Guillet, P., N'guessan, R., Doannio, J., Koffi, A., Konan, L. (1998). Impact of resistance of *Anopheles gambiae s.s.* to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial*, *58*(4), 349-354.
- Davidson, G. (1962). *Anopheles gambiae* complex. *Nature*, *196*(4857), 907-907.
- Davies, E. E. (1974). Ultrastructural studies on the early ookinete stage of *Plasmodium berghei nigeriensis* and its transformation into an oocyst. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *68*(3), 283-290.
- Dinglasan, R., Armistead, J., Nyland, J., Jiang, X., & Mao, H. (2013). Single-dose microparticle delivery of a malaria transmission-blocking vaccine elicits a long-lasting functional antibody response. *Current molecular medicine*, *13*(4), 479-487.
- Dinglasan, R. R. & Jacobs-Lorena, M. (2008). Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends in parasitology*, *24*(8), 364-370.
- Diop, M. M., Chandre, F., Rossignol, M., Porciani, A., Chateau, M., Moiroux, N. (2019). Sub-lethal insecticide exposure affects host biting efficiency of Kdr-resistant *Anopheles gambiae*. *peer community journal*, *1*, 2021.
- Djegbe, I., Cornelie, S., Rossignol, M., Demetere, E., Seveno, M., Remoue, F. (2011). Differential expression of salivary proteins between susceptible and insecticide-resistant mosquitoes of *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One*, *6*(3), e17496.
- Djogbenou, L., Chandre, F., Berthomieu, A., Dabire, R., Koffi, A., Alout, H. (2008). Evidence of introgression of the ace-1R mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae s. s.* *PLoS One*, *3*(5), e2172.
- Djouaka, R. F., Bakare, A. A., Coulibaly, O. N., Akogbeto, M. C., Ranson, H., Hemingway, J. (2008). Expression of the cytochrome P450s, *CYP6P3* and *CYP6M2* are significantly

- elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* ss. from Southern Benin and Nigeria. *BMC genomics*, 9(1), 538.
- Dongho, G. B. D., Gunalan, K., L'Episcopia, M., Paganotti, G. M., Menegon, M., Sangong, R. E.. (2021). *Plasmodium vivax* infections detected in a large number of febrile Duffy-negative Africans in Dschang, Cameroon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 104(3), 987.
- Donovan, M. J., Messmore, A. S., Scrafford, D. A., Sacks, D. L., Kamhawi, S., & McDowell, M. A. (2007). Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infection and immunity*, 75(5), 2523-2530.
- Du, W., Awolola, T., Howell, P., Koekemoer, L., Brooke, B., Benedict, M. (2005). Independent mutations in the Rdl locus confer dieltrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology*, 14(2), 179-183.
- Edman, J. D. & Scott, T. W. (1987). Host defensive behaviour and the feeding success of mosquitoes. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(4-5-6), 617-622.
- Edmond, K., Aurelie, F. D. G., Nadège, S.-C., Roland, B., Landre, D.-D., Abdou, T., & Antonio N. (2021). Efficacy of the Microbial Larvicide VectoMax® G against *Anopheles gambiae* sl and *Culex spp.* Larvae under Laboratory and Open Field Trial Experiments in the City of Yaoundé, Cameroon. *Advances in Entomology*, 10(1), 34-51.
- Elanga-Ndille, E., Nouage, L., Binyang, A., Assatse, T., Tene-Fossog, B., Tchouakui, M., Wondji, C. (2019). Overexpression of two members of D7 salivary genes family is associated with pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* s.s. but not in *Anopheles gambiae* in Cameroon. *Genes*, 10(3), 211.
- Enayati, A. & Hemingway, J. (2010). Malaria management: past, present, and future. *Annual review of entomology*, 55, 569-591.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3-8.
- Esen, M., Kremsner, P. G., Schleucher, R., Gässler, M., Imoukhuede, E. B., Imbault, N. (2009). Safety and immunogenicity of GMZ2—a MSP3–GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*, 27(49), 6862-6868.
- Favia, G., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Sidén-Kiamos, I., & Louis, C. (2001). Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.. *Insect Molecular Biology*, 10(1), 19-23.

- Ffrench-Constant, R. H. & Rocheleau, T. A. (1993). Drosophilay-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *Journal of neurochemistry*, 60(6), 2323-2326.
- Francischetti, I. M. (2010). Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*, 56(7), 1130-1144.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., & Ribeiro, J. M. (1999). Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 38(50), 16678-16685.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J. C. (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes. *Cellular microbiology*, 6(7), 687-694.
- Ghosh, A., Edwards, M., & Jacobs-Lorena, M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitology today*, 16(5), 196-201.
- Ghosh, A. K., Devenport, M., Jethwaney, D., Kalume, D. E., Pandey, A., Anderson, V. E. (2009). Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the *Plasmodium* TRAP and the Anopheles saglin proteins. *PLoS Pathogene*, 5(1), e1000265.
- Gillies, M. & Coetzee, M. (1987). A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region). *Publications of the South African Institute for Medical Research*, 55.
- Gillies, M. & De Meillon, B. (1968). The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Institute for Medical Research*, 54: 343.
- 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(1), 99-127.
- Girard, M., Osterhaus, A., Pervikov, Y., Palkonyay, L., & Kieny, M. (2007). Report of the third meeting on “influenza vaccines that induce broad spectrum and long-lasting immune responses”. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*, 3(4).
- Goodman, A. L., Epp, C., Moss, D., Holder, A., Wilson, J., Gao, G. (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 and immunity*, 78(11), 4601-4612.

- Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., Braz, G. R., Paes, M. C., Sorgine, M. H. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(4), 322-335.
- Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H., (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), 1266-1276.
- Guengerich, F. P., Thier, R., Persmark, M., Taylor, J. B., Pemble, S. E., & Ketterer, B. (1995). Conjugation of carcinogens by theta class glutathione s-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics*, 5, S103-107.
- Hamon, J. (1963). Etude de l'âge physiologique des femelles d'anophèles dans les zones traitées au DDT, et non-traitées, de la région de Bobo-Dioulasso, Haute Volta. *Bulletin of the World Health Organization*, 28(1), 83.
- Harbach, R. (1994). Review of the internal classification of the genus *Anopheles* (Diptera : Culicidae) : the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research*, 84, 331-342.
- Harbach, R. (2011). *Genus ANOPHELES Meigen, 1818 Mosquito Taxonomic Inventory*.
- Haubruge, É. & Amichot, M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., Mc Carroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653-665.
- Hemingway, J. & Karunaratne, S. (1998). Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and veterinary entomology*, 12(1), 1-12.
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 45(1), 371-391.
- Hosie, A., Sattelle, D., & Aronstein, K. (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in neurosciences*, 20(12), 578-583.
- Huang, H.-S., Hu, N.-T., Yao, Y.-E., Wu, C.-Y., Chiang, S.-W., & Sun, C.-N. (1998). Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 28(9), 651-658.

- Irving, H. & Wondji, C. S. (2017). Investigating knockdown resistance (kdr) mechanism against pyrethroids/DDT in the malaria vector *Anopheles funestus* across Africa. *BMC genetics*, *18*, 1-11.
- Ishino, C., Okumura, K., & Quéré, D. (2004). Wetting transitions on rough surfaces. *Europhysics Letters*, *68*(3), 419.
- Islam, A., Emran, T. B., Yamamoto, D. S., Iyori, M., Amelia, F., Yusuf, Y. (2019). Anopheline antiplatelet protein from mosquito saliva regulates blood feeding behavior. *Scientific reports*, *9*(1), 3129.
- James, A. & Rossignol, P. (1991). Mosquito salivary glands: parasitological and molecular aspects. *Parasitology today*, *7*(10), 267-271.
- Janzen, H. & Wright, K. (1971). The salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. *Canadian Journal of Zoology*, *49*(10), 1343-1345.
- Jariyapan, N., Choochote, W., Jitpakdi, A., Harnnoi, T., Siriyasatein, P., Wilkinson, M. C. (2007). Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *49*, 5-10.
- Jeanrenaud, A. C., Brooke, B. D., & Oliver, S. V. (2019). The effects of larval organic fertiliser exposure on the larval development, adult longevity and insecticide tolerance of zoophilic members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *PLoS One*, *14*(4).
- Klowden, M. J. & Lea, A. O. (1978). Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by *Aedes aegypti* (L.). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *27*(4), 827-831.
- Klug, D., Gautier, A., Calvo, E., Marois, E., & Blandin, S. A. (2023). The salivary protein Saglin facilitates efficient midgut colonization of *Anopheles* mosquitoes by malaria parasites. *PLoS Pathogens*, *19*(3), e1010538.
- Knight, K. & Stone, A. (1977). *A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera : Culicidae)*. Washington.
- Koekemoer, L., Kamau, L., Hunt, R., & Coetzee, M. (2002). A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *66*, 804-811.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A. I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001). Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect biochemistry and molecular biology*, *31*(4-5), 313-319.

- Lanzaro, G. C., Touré, Y. T., Carnahan, J., Zheng, L., Dolo, G., Traoré, S. (1998). Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14260-14265.
- Lehane, M. & Msangi, A. (1991). Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina m. morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. *Medical and veterinary entomology*, 5(4), 495-501.
- Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T., & Raymond, M. (1999). Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature*, 400, 861-864.
- Li, A., Barmada, S. J., Roth, K. A., & Harris, D. A. (2007). N-terminally deleted forms of the prion protein activate both Bax-dependent and Bax-independent neurotoxic pathways. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 852-859.
- Lindberg, R. L. & Negishi, M. (1989). Alteration of mouse cytochrome P450 c_{oh} substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. *Nature*, 339(6226), 632.
- Louis, J. & Albert, J. (1988). Malaria in the Republic of Djibouti. Strategy for control using a biological antilarval campaign: indigenous larvivorous fishes (*Aphanius dispar*) and bacterial toxins. *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial*, 48(2), 127-131.
- Lwetoijera, D. W., Harris, C., Kiware, S. S., Dongus, S., Devine, G. J., McCall, P. J. (2014). Increasing role of *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in malaria transmission in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malaria Journal*, 13(1), 1-10.
- Lyimo, I. N., Haydon, D. T., Mbina, K. F., Daraja, A. A., Mbehela, E. M., Reeve, R. (2012). The fitness of African malaria vectors in the presence and limitation of host behaviour. *Malaria Journal*, 11(1), 425.
- Maiteki-Sebuguzi, C., Gonahasa, S., Kanya, M. R., Katureebe, A., Bagala, I., Lynd, A. (2023). Effect of long-lasting insecticidal nets with and without piperonyl butoxide on malaria indicators in Uganda (LLINEUP): final results of a cluster-randomised trial embedded in a national distribution campaign. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(2), 247-258.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M., Darriet, F., Berge, J. B., Devonshire, A. L. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology*, 7(2), 179-184.
- Mathenge, E. M., Gimnig, J. E., Kolczak, M., Ombok, M., Irungu, L. W., & Hawley, W. A. (2001). Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 38(4), 531-536.

- McCarroll, L. & Hemingway, J. (2002). Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1345-1351.
- Mitchell, S. N., Stevenson, B. J., Müller, P., Wilding, C. S., Egyir-Yawson, A., Field, S. G. (2012). Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6147-6152.
- Mouchet, J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*: John Libbey Eurotext.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde* (J. Libbey Ed.). Paris.
- Ndo, C., Kopya, E., Menze-Djantio, B., Toto, J. C., Awono-Ambene, P., Lycett, G. (2016). High susceptibility of wild *Anopheles funestus* to infection with natural *Plasmodium falciparum* gametocytes using membrane feeding assays. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-8.
- Okoye, P., Brooke, B., Hunt, R., & Coetzee, M. (2007). Relative developmental and reproductive fitness associated with pyrethroid resistance in the major southern African malaria vector, *Anopheles funestus*. *Bulletin of entomological research*, 97(6), 599-605.
- Okulate, M., Kalume, D., Reddy, R., Kristiansen, T., Bhattacharyya, M., Chaerkady, R. (2007). Identification and molecular characterization of a novel protein Saglin as a target of monoclonal antibodies affecting salivary gland infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Insect molecular biology*, 16(6), 711-722.
- Osoro, J. K., Machani, M. G., Ochomo, E., Wanjala, C., Omukunda, E., Githeko, A. K.. (2022). Insecticide resistant *Anopheles gambiae* have enhanced longevity but reduced reproductive fitness and a longer first gonotrophic cycle. *Scientific reports*, 12(1), 8646.
- Owusu, H. F., Chitnis, N., & Müller, P. (2017). Insecticide susceptibility of *Anopheles* mosquitoes changes in response to variations in the larval environment. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- 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.
- Pitman, R. M. (1971). Transmitter substances in insects: a review. *Comparative and general pharmacology*, 2(7), 347-371.
- Poirié, M. & Pasteur, N. (1991). La résistance des insectes aux insecticides. *Recherche (Paris, 1970)*, 22(234), 874-882.

- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J., Wang, X., Hemingway, J., & Collins, F. (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.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., & Chevillon, C. (2001a). Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*, 112, 287-296.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., & Chevillon, C. (2001b). Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Microevolution Rate, Pattern, Process* (pp. 287-296): Springer.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N., & Chevillon, C. (2001). Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Microevolution Rate, Pattern, Process*. Springer, 287-296.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M. (1986). Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of economic entomology*, 79(6), 1452-1458.
- Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews*, 34(1-2), 83-448.
- Ribeiro, J. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual reviews entomology*, 32, 463-478.
- Ribeiro, J. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious agents and disease*, 4(3), 143-152.
- Ribeiro, J. (2000). Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Medical and veterinary entomology*, 14(2), 142-148.
- Ribeiro, J. & Nussenzveig, R. H. (1993). The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of experimental biology*, 179(1), 273-287.
- Ribeiro, J., Rossignol, P., & Spielman, A. (1985). Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes. *Journal of insect physiology*, 31(9), 689-692.
- Ribeiro, J., Schneider, M., & Guimaraes, J. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, 308(1), 243-249.

- Ribeiro, J. M. & Francischetti, I. M. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review Entomology*, 48.
- Rickman, L. S., Jones, T. R., Long, G. W., Paparello, S., Schneider, I., Paul, C. F. (1990). *Plasmodium falciparum*-infected *Anopheles stephensi* inconsistently transmit malaria to humans: *American journal of Medicine and Tropical Hygiene*, 43 (5), 441-445.
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A. F., & Gandon, S. (2010). Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathogens*, 6(8).
- Riveron, J. M., Irving, H., Ndula, M., Barnes, K. G., Ibrahim, S. S., Paine, M. J. (2013). Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *National Academy Sciences U S A*, 110(1), 252-257.
- Riveron, J. M., Yunta, C., Ibrahim, S. S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B. D. (2014a). A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biology*, 15(2), R27.
- Riveron, J. M., Yunta, C., Ibrahim, S. S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B. D. (2014b). A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol*, 15(2), R27.
- Robert, V., Read, A., Essong, J., Tchuinkam, T., Mulder, B., Verhave, J.-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), 621-624.
- Rodhain, F. & Perez, C. (1985). *Precis d'entomologie medicale et veterinaire; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs*. Elsevier Masson, 1-458.
- Rosenberg, R. et Rungsiwongse, J. (1991). The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 45(5), 574-577.
- Saeae, L., Phumala Morales, N., Komalamisra, N., & Vargas, R. M. (2011). Antioxidative systems defense against oxidative stress induced by blood meal in *Aedes aegypti*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(3), 542.
- 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(1), 163.

- Schneider, B. S. & Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(5), 400-408.
- Scott, J. A., Brogdon, W. G., & Collins, F. H. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 49(4), 520-529.
- Scott, J. G., Liu, N., & Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1-3), 147-155.
- Sheehy, S. H., Duncan, C. J., Elias, S. C., Choudhary, P., Biswas, S., Halstead, F. D. (2012). ChAd63-MVA–vectored blood-stage malaria vaccines targeting MSP1 and AMA1: assessment of efficacy against mosquito bite challenge in humans. *Molecular Therapy*, 20(12), 2355-2368.
- Simard, F., Fontenille, D., Lehmann, T., Girod, R., Brutus, L., Gopaul, R. (1999). High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(6), 1000-1009.
- Sinka, M., Bangs, M., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, 69.
- Spillings, B., Brooke, B., Koekemoer, L., Chiphwanya, J., Coetzee, M., & Hunt, R. (2009). A new species concealed by *Anopheles funestus* Giles, the major malaria vector in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 510-515.
- Sturm, A., Amino, R., Van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A.. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313(5791), 1287-1290.
- Suchel, F. (1988). Les régions climatiques du Cameroun: Les climats du Cameroun. *Travaux de Géographie Tropicale*, 5, 1-288.
- Surasombatpattana, P., Ekchariyawat, P., Hamel, R., Patramool, S., Thongrunkiat, S., Denizot, M. (2014). *Aedes aegypti* saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 134(1), 281.
- Suwanarusk, R., Cooke, B. M., Dondorp, A. M., Silamut, K., Sattabongkot, J., White, N. J. (2004). The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *The Journal of infectious diseases*, 189(2), 190-194.

- Takken, W., van Loon, J. J., et Adam, W. (2001). Inhibition of host-seeking response and olfactory responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. *Journal of insect physiology*, 47(3), 303-310.
- Tchouakui, M., Riveron, J. M., Djonabaye, D., Tchapgga, W., Irving, H., Takam, P. 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*, 9(12), 645.
- Tchouakui, M., Riveron Miranda, J., Mugenzi, L. M., Djonabaye, D., Wondji, M. J., Tchoupo, M., Wondji C.. (2020). Cytochrome P450 metabolic resistance (CYP6P9a) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Heredity*, 124(5), 621-632.
- Telang, A. & Wells, M. A. (2004). The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito. *Journal of insect physiology*, 50(7), 677-685.
- Thomson, M. C., Connor, S. J., Quinones, M. L., Jawara, M., Todd, J., & Greenwood, B. M. (1995). Movement of *Anopheles gambiae* sl malaria vectors between villages in The Gambia. *Medical and veterinary entomology*, 9(4), 413-419.
- Titus, R. & Ribeiro, J. (1990). The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitology today*, 6(5), 157-160.
- Torre, A. d., Fanello, C., Akogbeto, M., Dossou-Yovo, J., Favia, G., Petrarca, V. (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect molecular biology*, 10(1), 9-18.
- Touré, Y., Petrarca, V., Traore, S., Coulibaly, A., Maiga, H., Sankare, O. (1994). Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s. str. in Mali, West Africa. *Genetica*, 94(2-3), 213-223.
- Trevejo, R. T., Reisen, W. K., Yoshimura, G., & Reeves, W. C. (2005). Detection of chicken antibodies to mosquito salivary gland antigens by enzyme immunoassay. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(1), 39-48.
- Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M., , & Ribeiro, J. M. (1999). Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry*, 38(34), 11209-11215.
- Vijay, S., Rawal, R., Kadian, K., Raghavendra, K., , & Sharma, A. (2015). Annotated differentially expressed salivary proteins of susceptible and insecticide-resistant mosquitoes of *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, 10(3), e0119666.

- Vontas, J., Katsavou, E., & Mavridis, K. (2020). Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pesticide biochemistry and physiology*, 170, 104666.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., & Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(2), 126-131.
- Wang, J., Zhang, Y., Zhao, Y. O., Li, M. W., Zhang, L., Dragovic, S.. (2013). *Anopheles gambiae* circumsporozoite protein-binding protein facilitates *Plasmodium* infection of mosquito salivary glands. *Journal of Infectious Diseases*, 208(7), 1161-1169.
- Wanson, M., Peel, E., & Lebled, B. (1949). *Comparative Experimental Infection of Anopheles moucheti and Anopheles gambiae with Plasmodium falciparum*. Paper presented at the Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale.
- Weedall, G. D., Mugenzi, L. M., Menze, B. D., Tchouakui, M., Ibrahim, S. S., Amvongo-Adjia, N., Wondji C. (2019). A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine*, 11(484), eaat7386.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C. (2003). Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423(6936), 136-137.
- White, G. (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 278-298.
- White, N., Chapman, D., & Watt, G. (1992). The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(6), 590-597.
- WHO. (2000). World Malaria Report 2000, World Health Organization Geneva, Switzerland
- WHO. (2012). Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors.
- WHO. (2019). World Malaria Report 2019, Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. (2020). World Malaria Report 2020, World Health Organization Geneva, Switzerland
- WHO. (2022). World Malaria Report 2022, World Health Organization Geneva, Switzerland
- WHO. (2023). World Malaria Report 2023, World Health Organization Geneva, Switzerland
- Wilding, C. S., Weetman, D., Rippon, E., Steen, K., Mawejje, H., Barsukov, I. (2015). Parallel evolution or purifying selection, not introgression, explains similarity in the pyrethroid

- detoxification linked GSTE4 of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Molecular genetics and genomics*, 290(1), 201-215.
- Wondji, C., Simard, F., & Fontenille, D. (2002). Evidence for genetic differentiation between the molecular forms M and S within the Forest chromosomal form of *Anopheles gambiae* in an area of sympatry. *Insect molecular biology*, 11(1), 11-19.
- 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 and Molecular Biology*, 41(7), 484-491.
- Wondji, C. S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N. F., Collins, F. H., Hunt, R. H. (2009). Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome research*, 19(3), 452-459.
- Yoshida, S., Sudo, T., Niimi, M., Tao, L., Sun, B., Kambayashi, J. (2008). Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood*, 111(4), 2007-2014.
- Zheng, L., Benedict, M. Q., Cornel, A. J., Collins, F. H., & Kafatos, F. C. (1996). An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 143(2), 941-952.

ANNEXES

Annexe 1 : Clé d'identification des adultes d'anophèles

CLES DES ANOPHELES VECTEURS MAJEURS AU CAMEROUN (adultes)

CARACTERES COMMUNS

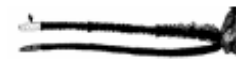
- Abdomen SANS touffes d'écaillés latérales
- Pattes postérieures SANS AUCUN tarse entièrement blanc
- Apex des palpes blancs
- Aile avec des taches blanches et noires réparties sur toute la surface

CARACTERES DISTINCTIFS

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



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



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



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



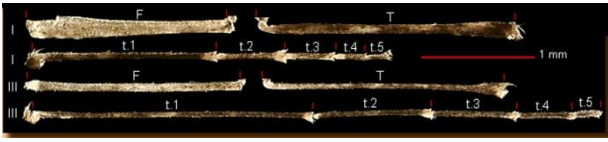


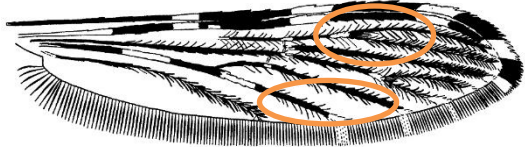

- Pattes avec bandes pâles sur l'apex de chaque tarse..... *An. m. moucheti*



AUTRES CRITERES BIOMETRIQUES

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

Annexe 2 : Principaux critères distinctifs entre les anophèles rencontrés dans nos sites d'études (*Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*) (Stade adulte femelle)

	<i>An. gambiae</i>	<i>An. funestus</i>
Taille	Taille moyenne	Petite taille
Pattes	Mouchetées 	Noire uniforme 
Ailes	Tâche blanche sur la 3ième bande noire de la nervure costale, partant de l'extrémité distale. Tâche blanche sur la 5ième nervure partant de la costa. 	
Palpes	3 taches blanches, celle proximale très fine et celle distales très large.	3 taches blanches, les deux distales de tailles identiques mais plus larges que la proximale. 

Annexe 3 : Séquences d'amorces pour le géotypage du *L119F-GSTe2*, *CYP6P9a/b*

Séquence du *L119F-GSTe2*

L119F-Fwd ATGACCAAGCTAGTTCTGTACACGCT
L119F-Rev TTCCTCCTTTTTACGATTTCGAACT

L119F-Res CGGGAATGTCCGATTTTCCGTAGAA**t**AA
L119-F-Sus CATTCTTATTCTCATTACAGGAGCGTA**a**TC

❖ **Séquence du *CYP6P9a***

RFLP6P9aF forward primer 5'- TCCCGAAATACAGCCTTTCAG-3
RFLP6P9aR reverse primer 5'-ATTGGTGCCATCGCTAGAAG-3'

❖ **Séquence du *CYP6P9b***

Forward primer 6p9brflp_0.5F 5'-CCCCCACAGGTGGTAACTATCTGAA-3'
Reverse primer 6p9brflp_0.5R 5'-TTATCCGTA ACTCAATAGCGATG-3'

Annexe 4 : Clairance éthique délivrée par le CNERSH

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2016/07/781/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 29 juillet 2016

Cnethique_minsante@yahoo.fr

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session ordinaire du 18 mai 2016, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Impact de la résistance aux insecticides sur les protéines salivaires des moustiques et ses conséquences sur la capacité vectorielle des vecteurs majeurs du paludisme au Cameroun** » soumis par le **Docteur ELANGA N'DILLE Emmanuel**, Investigateur Principal, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC).

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des mécanismes de résistance aux insecticides sur les protéines salivaires des vecteurs du paludisme et les conséquences que cela peut avoir sur la capacité vectorielle des populations naturelles de vecteurs. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. Les risques liés à l'étude sont présentés ainsi que les mesures prises pour les éviter et les minimiser. La notice d'information et les formulaires de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont présentes dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Ethique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

Les Investigateurs sont responsables du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devraient y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. Les investigateurs sont appelés à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations susmentionnées.

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

Ampliations

- MINSANTE

Le Président
E. Lazare KAPTUE

N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR), exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.

Annexe 5 : Liste des présentations orales à différentes conférences

Lynda NOUAGE, Emmanuel ELANGA-NDILLE, Achille BINYANG1, Magellan TCHOUAKUI, Tatiane ATSATSE, Cyrille NDO, Sévilor KEKEUNOU, Charles S. WONDJI (2020). **Impact pyrethroid resistance on salivary gland of *Anopheles funestus* major African malaria vector**; [oral presentation] *first annual conference of PAMCA Cameroon*, 6 January, 2018.

Lynda NOUAGE, Emmanuel ELANGA-NDILLE, Achille BINYANG1, Magellan TCHOUAKUI, Tatiane ATSATSE, Cyrille NDO, Sévilor KEKEUNOU, Charles S. WONDJI (2020). **Influence of GST- and P450-based metabolic resistance to pyrethroids on blood feeding in the major African malaria vector *Anopheles funestus***; [oral presentation] *6 annual conference of PAMCA Cameroon* 22 September 2019.

Annexe 6 : Posters présentés en conférences

Metabolic resistance to insecticide is associated with a high blood meal volume in the major African Malaria vector *Anopheles funestus*

Lynda NOUAGE, Emmanuel ELANGA N'DILLE, Magellan TCHOUAKUI, Achille BINYANG, Tatiane ATSATSE, Cyril NDO, Sévilor

KEKEUNOU, Charles WONDJI

Research Unit LSTM/CRID P.O. BOX 13591, Yaoundé, Cameroon Email: lnouage@gmail.com

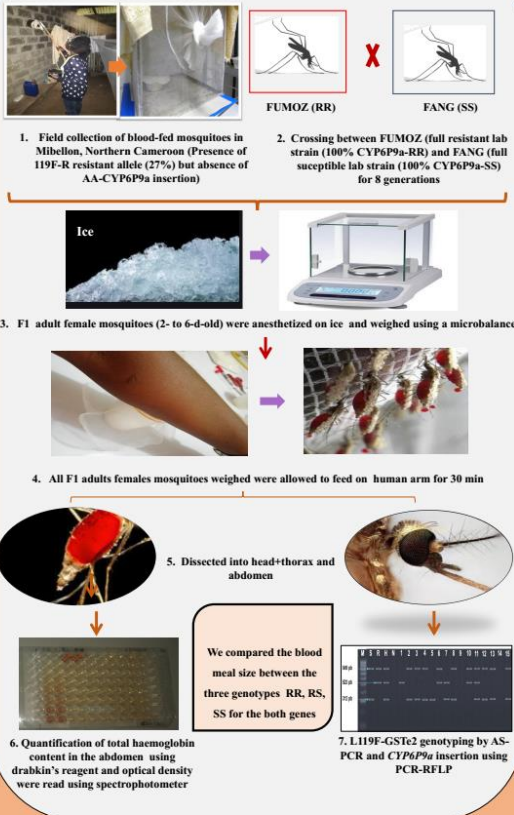


1. Introduction

- Despite the recent progress made since 2000s in reducing its burden in sub-Saharan Africa, malaria remains a major public health problem in this region (1).
- Malaria remains the most important vector borne disease in Africa and *Anopheles* mosquitoes including *Anopheles funestus* are responsible of its transmission to human when taking their blood meal (1).
- Blood meal is essential for mosquito as female require blood to obtain amino acids needed to synthesize yolk proteins for eggs maturation/ The volume of blood ingested by mosquito influences the number of female that developed eggs and the number of eggs per female (2).
- The blood meal size could be affected by numerous factors including temperature, mosquito age, parity status, gonotrophic cycle, blood feeding history and infection status (3).
- More recently, one study showed that insecticide resistance could influence the blood meal size in *An. gambiae* mosquito. Indeed, using *Kdr* marker, this study observed that mosquito bearing resistant allele take more blood than those bearing a susceptible one (4).
- Taking advantage of the recent detection of molecular markers (L119F-GSTe2 and AA-CYP6P9a) to track resistance in *Anopheles funestus* (5), this study aimed to use these markers to assess the impact of metabolic resistance on blood meal process of *An. funestus* mosquito.

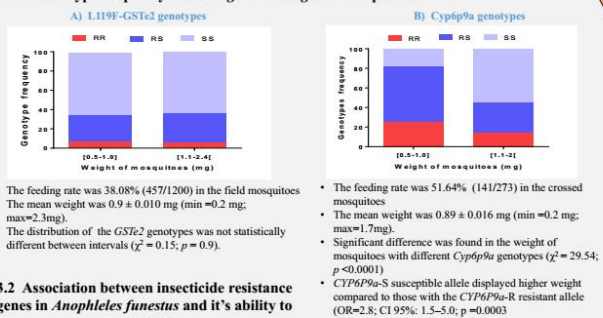
2. Methodology

Mosquitoes samples: two strains

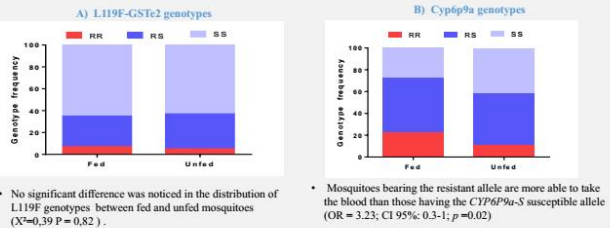


3. Results

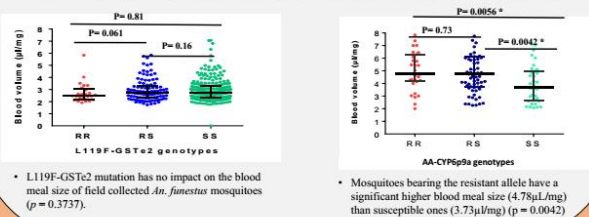
3.1 Genotype frequency according to the weight of mosquitoes



3.2 Association between insecticide resistance genes in *Anopheles funestus* and its ability to bloodfeed



3.3 Influence of insecticide resistance on the blood meal volume in *An. funestus*



4. Discussion and conclusion

- Cyp6p9a* seems to impact blood meal intake in *Anopheles funestus*
- The blood meal size seems to be influenced by the *Cyp6p9a* gene as resistant mosquitoes take more blood than susceptibles
- This represents a serious concern for disease control as it could lead to increase number of resistant and infected mosquitoes in the population, and therefore increase malaria transmission
- To confirm these preliminary results, further study need to be conducted

5. References

- WHO. 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). 2012. ISBN: 978_4_.
- Klowden MJ, Lea AO. Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by *Aedes aegypti* (L.). The American journal of tropical medicine and hygiene. 1978;27(4):827-31
- Leliane, M.J., 2005. Managing the blood meal. In: The Biology of Blood-Sucking in Insects, Cambridge, 2nd edition. Cambridge University Press, New York, NY, pp. 84-115
- Diop MM, Chandre F, Rossignol M, Porciani A, Chateau M, Mouroux N, et al. Sub-lethal insecticide exposure affects host biting efficiency of *Kdr*-resistant *Anopheles gambiae*. bioRxiv. 2019:653980.
- Riveron J M, Yunta C, Brahim S S, Djosaka R, Irving H, Menze B D, Ismail H M, Hemingway J, Ranson H, Albert A & Wondji C S. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. Genome Biol, 15, R27

6. Acknowledgement/Funding



5th Annual conference PAMCA (Zimbabwe), 23rd to 24th July 2018

Annexe 7 : Articles publiés en relation avec la thèse

Lynda NOUAGE, Emmanuel ELANGA-NDILLE, Achille BINYANG, Magellan TCHOUAKUI, Tatiane ATSATSE, Cyrille NDO, Sévilor KEKEUNOU Charles S. WONDJI (2020) Influence of GST- and P450-based metabolic resistance to pyrethroids on blood feeding in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. PLoS ONE 15(9).

Annexe 8: Gènes différemment exprimés entre R vs S

Identifiant du gène	Nom du gène	Log2FC	FC	FRD	Sens de régulation
AFUN016437	serine protease inhibitor (serpin)	-0,58601177	1,5010914	0,02947487	Sousexprimé
AFUN017712	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	-0,59402	1,5094469	0,03378503	Sousexprimé
AFUN002764	diacylglycerol kinase (ATP dependent)	-0,6024023	1,5182426	6,99E-04	Sousexprimé
AFUN009127	hormone-sensitive lipase	-0,60511094	1,5210958	0,01706428	Sousexprimé
AFUN019220	ATP-binding cassette transporter (ABC transporter) family A member	-0,60753155	1,52365	8,61E-04	Sousexprimé
AFUN018677	Fatty acyl-CoA reductase	-0,6113779	1,5277176	0,0045567	Sousexprimé
AFUN020666	thioester-containing protein	-0,615358	1,5319381	0,03404027	Sousexprimé
AFUN004210	Class B Scavenger Receptor (CD36 domain)	-0,61564004	1,5322376	0,00435871	Sousexprimé
AFUN020817	fatty acyl-CoA reductase	-0,61663026	1,5332897	0,0318081	Sousexprimé
AFUN004867	ATP-binding cassette	-0,61909497	1,5359113	0,00318726	Sousexprimé
AFUN020124	insulin receptor	-0,621113	1,5380613	0,01745369	Sousexprimé
AFUN016076	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	-0,62161154	1,5385929	0,00743661	Sousexprimé
AFUN008757	salivary gland protein	-0,62675416	1,5440872	4,17E-04	Sousexprimé
AFUN005821	diuretic hormone	-0,6271037	1,5444613	0,01149027	Sousexprimé
AFUN021180	abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	-0,63098484	1,5486218	0,00168162	Sousexprimé
AFUN000581	Protein cueball	-0,6334565	1,5512773	0,04063534	Sousexprimé
AFUN020875	HtrA serine peptidase	-0,6429938	1,5615662	0,004771	Sousexprimé
AFUN021910	lipase	-0,65243924	1,5718235	0,01065102	Sousexprimé
AFUN020242	tRNA dimethylallyltransferase	-0,65350693	1,5729872	0,02553104	Sousexprimé
AFUN009782	sodium/potassium/calcium exchanger	-0,6565694	1,5763298	0,02599527	Sousexprimé
AFUN016488	3-glucan binding protein	-0,6582603	1,5781784	0,00762541	Sousexprimé
AFUN008904	ribonuclease P/MRP protein subunit RPP1	-0,6583025	1,5782245	0,00472052	Sousexprimé
AFUN009738	odorant-binding protein	-0,6641742	1,584661	0,00472307	Sousexprimé
AFUN002681	solute carrier family 26, other	-0,6758542	1,5975424	0,00574297	Sousexprimé
AFUN010274	E3 ubiquitin-protein ligase mind-bomb	-0,68075085	1,6029738	0,04148116	Sousexprimé
AFUN022320	CLIP-domain serine protease	-0,6864977	1,6093718	0,01258743	Sousexprimé
AFUN021893	xeroderma pigmentosum group C-complementing protein	-0,691634	1,6151117	0,02532673	Sousexprimé
AFUN007401	Phosphoglucomutase	-0,6967923	1,6208968	0,00636148	Sousexprimé
AFUN016650	glucose dehydrogenase (acceptor)	-0,69896007	1,6233342	0,00138036	Sousexprimé
AFUN006705	dsRNase	-0,70770437	1,6332033	0,00250132	Sousexprimé

AFUN021791	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member	-0,71616936	1,6428143	0,00144285	Sousexprimé
AFUN006317	antennae-specific protein	-0,71734023	1,6441481	0,00382142	Sousexprimé
AFUN016187	salivary gland protein	-0,72263306	1,6501911	1,79E-04	Sousexprimé
AFUN016376	Laccase-like multicopper oxidase	-0,72349024	1,6511718	8,76E-05	Sousexprimé
AFUN010489	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	-0,7274146	1,6556693	0,00472052	Sousexprimé
AFUN017722	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	-0,7377139	1,6675314	0,00136429	Sousexprimé
AFUN018733	Innexin inx2	-0,7506473	1,6825476	0,00181909	Sousexprimé
AFUN011552	fibrinogen-related protein	-0,75258875	1,6848134	0,02971127	Sousexprimé
AFUN002240	Insulin-like peptide 2 precursor	-0,7530348	1,6853343	0,00265153	Sousexprimé
AFUN016560	peptidoglycan recognition protein (long)	-0,7558646	1,6886433	0,00412103	Sousexprimé
AFUN011446	transcription factor Sp, invertebrate	-0,7651158	1,6995064	0,00157118	Sousexprimé
AFUN021496	protein scarlet	-0,7655879	1,7000626	0,00515713	Sousexprimé
AFUN015715	Glutathione S-transferase	-0,77819324	1,7149818	0,04123448	Sousexprimé
AFUN001707	Odorant binding protein 11	-0,7798906	1,7170007	0,00974223	Sousexprimé
AFUN017631	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	-0,8073262	1,7499652	1,95E-04	Sousexprimé
AFUN002669	paired box protein 3/7	-0,83363026	1,7821642	0,01571684	Sousexprimé
AFUN016592	trypsin	-0,8353509	1,7842909	0,01303921	Sousexprimé
AFUN008255	carboxypeptidase B	-0,8383254	1,7879735	0,01891931	Sousexprimé
AFUN020678	glucose dehydrogenase (acceptor)	-0,8390997	1,7889334	0,00344871	Sousexprimé
AFUN004465	ADP-ribosylation factor-like	-0,8650802	1,8214409	0,03872959	Sousexprimé

Identifiant du gène	Nom du gène	Log₂FC	FC	FDR	Sens de régulation
AFUN017713	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	5,994547	63,75855	0,04589	Surexprimé
AFUN002167	pyrokinin	5,034651	32,77789	0,00629	Surexprimé
AFUN008615	Odorant-binding protein 1	4,212322	18,53683	0,004485	Surexprimé
AFUN010262	odorant-binding protein	3,6554098	12,60051	2,25E-04	Surexprimé
AFUN017680	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	3,6392798	12,46041	0,008407	Surexprimé
AFUN017619	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	3,2344003	9,411341	0,01517	Surexprimé
AFUN008972	corazonin	3,1630754	8,957372	6,48E-04	Surexprimé
AFUN005050	nescient helix-loop-helix protein	3,0096998	8,053968	0,020536	Surexprimé
AFUN004046	Borealin	2,9941487	7,967619	1,89E-04	Surexprimé
AFUN011825	venom allergen	2,969801	7,834281	2,58E-04	Surexprimé
AFUN002878	Bardet-Biedl syndrome 8	2,862928	7,274902	0,009239	Surexprimé
AFUN000030	fatty acid synthase, animal type	2,8450894	7,185504	5,43E-04	Surexprimé
AFUN021175	aminopeptidase	2,810003	7,012861	0,002883	Surexprimé

AFUN017765	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	2,8004022	6,966346	0,047773	Surexprimé
AFUN005856	Odorant-binding protein 2	2,7990901	6,960014	0,003335	Surexprimé
AFUN019992	T-box protein H15	2,7911973	6,92204	0,01949	Surexprimé
AFUN016169	odorant-binding protein 5	2,7651083	6,79799	0,002201	Surexprimé
AFUN009459	ionotropic receptor IR100i	2,701964	6,506871	0,003031	Surexprimé
AFUN002039	phosphatidylinositol transfer protein SEC14	2,6440597	6,250882	0,001114	Surexprimé
AFUN019352	Protein quiver	2,5926442	6,032033	5,24E-06	Surexprimé
AFUN022227	Niemann-Pick Type C-2	2,5607977	5,900338	0,01575	Surexprimé
AFUN011481	Cytochrome P450	2,5347137	5,794619	4,91E-04	Surexprimé
AFUN006330	Sarcoplasmic calcium-binding protein	2,5271	5,764119	0,020808	Surexprimé
AFUN009918	cuticular protein RR-1 family	2,5218627	5,743232	0,048532	Surexprimé
AFUN008310	pancreas-specific transcription factor 1a	2,5188313	5,731176	0,017236	Surexprimé
AFUN004091	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein	2,5011399	5,661326	0,010973	Surexprimé
AFUN016367	carboxylesterase	2,4944453	5,635116	9,12E-05	Surexprimé
AFUN011108	Kinesin-like protein	2,4884365	5,611694	0,008245	Surexprimé
AFUN005991	dehydrogenase/reductase SDR family member 11 precursor	2,4856281	5,600781	0,005534	Surexprimé
AFUN007624	pigment dispersing hormone	2,479776	5,578108	6,83E-04	Surexprimé
AFUN020037	hyaluronoglucosaminidase	2,464021	5,517524	0,011581	Surexprimé
AFUN021611	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter), member	2,4605772	5,504369	0,009927	Surexprimé
AFUN002915	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	2,4093063	5,312188	0,033586	Surexprimé
AFUN008349	Niemann-Pick C2 protein	2,4067516	5,30279	0,012105	Surexprimé
AFUN010112	Tetraspanin	2,3796628	5,204151	0,004387	Surexprimé
AFUN010331	Protein NEDD1	2,3592567	5,13106	0,025608	Surexprimé
AFUN016581	odorant-binding protein antennal	2,3249793	5,010586	0,003383	Surexprimé
AFUN015928	long wavelength sensitive opsin	2,2784932	4,851709	0,004462	Surexprimé
AFUN003303	Glutathione S-transferase	2,2432241	4,73454	0,004185	Surexprimé
AFUN016246	AMP dependent ligase	2,201964	4,601052	0,02545	Surexprimé
AFUN002684	testis-specific serine kinase	2,1499882	4,438242	0,012354	Surexprimé
AFUN008918	fatty acid synthase, animal type	2,1430073	4,416818	0,002539	Surexprimé
AFUN001187	Odorant binding protein 7	2,1128545	4,325463	0,003523	Surexprimé
AFUN009254	heme peroxidase	2,0861602	4,246164	0,001002	Surexprimé
AFUN007804	Protease, serine	2,074039	4,210639	0,002424	Surexprimé
AFUN002187	arrestin-1	2,055098	4,155719	7,09E-04	Surexprimé

AFUN008193	alpha-tocopherol transfer protein-like protein	2,0292978	4,082061	0,001189	Surexprimé
AFUN008393	Gustatory receptor	1,997256	3,9924	0,009742	Surexprimé
AFUN004365	Intraflagellar transport protein 20 homolog	1,9514327	3,867584	0,044826	Surexprimé
AFUN010651	lamin	1,9513036	3,867238	0,014684	Surexprimé

Annexe 9 : Gènes différemment exprimés entre R vs C

Identifiant du gène	Nom du gène	Log₂FC	FC	FDR	Sens de régulation
AFUN003020	solute carrier family 30 (zinc transporter), member	-0,59152	1,506832	5,18E-04	Sousexprimé
AFUN002972	Sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like)	-0,59221	1,507556	0,003861	Sousexprimé
AFUN000103	nicotinic acetylcholine receptor, beta-2 subunit	-0,59466	1,510113	0,008896	Sousexprimé
AFUN011540	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	-0,60026	1,515992	0,011432	Sousexprimé
AFUN010541	Anillin/rhotekin	-0,60103	1,516794	0,015483	Sousexprimé
AFUN000077	short wavelength sensitive opsin	-0,61043	1,526715	0,002614	Sousexprimé
AFUN019171	60S ribosomal protein L24	-0,61249	1,5289	0,030229	Sousexprimé
AFUN019750	enhancer of mRNA-decapping protein	-0,61314	1,529583	0,019065	Sousexprimé
AFUN015810	Glutathione S-transferase	-0,61884	1,535642	0,034845	Sousexprimé
AFUN016342	netrin receptor unc-5	-0,62166	1,538649	0,017291	Sousexprimé
AFUN008239	sulfotransferase (Sult)	-0,63283	1,550602	0,012409	Sousexprimé
AFUN011715	Calreticulin	-0,63699	1,555078	0,005844	Sousexprimé
AFUN016448	trypsin	-0,63777	1,555921	0,014235	Sousexprimé
AFUN008888	female reproductive tract protease GLEANR_896	-0,63862	1,556842	1,36E-04	Sousexprimé
AFUN016245	AMP dependent ligase	-0,64796	1,566955	0,041869	Sousexprimé
AFUN005949	odorant-binding protein	-0,65724	1,577064	0,019519	Sousexprimé
AFUN001632	Ser/Thr protein phosphatase/nucleotidase	-0,66067	1,580813	0,035438	Sousexprimé
AFUN009242	glutamate decarboxylase	-0,6708	1,59195	0,003537	Sousexprimé
AFUN002834	ATP-binding cassette	-0,67146	1,59268	0,018841	Sousexprimé
AFUN020021	solute carrier organic anion transporter family, member 3A	-0,68046	1,602646	0,032023	Sousexprimé
AFUN004931	low density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor	-0,68343	1,605949	1,24E-04	Sousexprimé
AFUN016382	Transporter	-0,68627	1,609119	0,009508	Sousexprimé
AFUN009558	TOLL-like receptor 11	-0,69409	1,61786	0,004557	Sousexprimé
AFUN005373	DNA mismatch repair protein MSH4	-0,69824	1,622523	0,008718	Sousexprimé

AFUN021362	sensory appendage protein	-0,70206	1,62683	0,001015	Sousexprimé
AFUN001327	solute carrier family 45, member 1/2/4 protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit	-0,70655	1,631895	0,0436	Sousexprimé Sousexprimé
AFUN021057	amiloride-sensitive sodium channel	-0,70937	1,635093	0,028476	Sousexprimé
AFUN001395	hairly and enhancer of split, invertebrate	-0,71052	1,636393	0,00139	Sousexprimé
AFUN000350	Disconnected protein	-0,71417	1,640538	0,025	Sousexprimé
AFUN001278	Acyl-coenzyme A oxidase	-0,71541	1,641948	0,038239	Sousexprimé
AFUN004054	cystinosin homolog	-0,72353	1,651215	0,018014	Sousexprimé
AFUN016660	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	-0,72857	1,657	0,016676	Sousexprimé
AFUN017609	sodium-coupled monocarboxylate transporter	-0,73629	1,665885	0,039091	Sousexprimé
AFUN021891	paired box protein	-0,73629	1,665885	0,034069	Sousexprimé
AFUN020677	Flavin-containing monooxygenase	-0,73727	1,66702	0,005736	Sousexprimé
AFUN002628	amiloride-sensitive sodium channel, other	-0,73727	1,66702	0,021481	Sousexprimé
AFUN007568	thioester-containing protein	-0,75123	1,68323	0,002897	Sousexprimé
AFUN020666	DNA polymerase theta	-0,75256	1,684785	0,03404	Sousexprimé
AFUN007783	Protein LMBR1L	-0,75564	1,688379	0,01722	Sousexprimé
AFUN020835	Polypeptide N-	-0,76086	1,694506	0,026974	Sousexprimé
AFUN016076	acetylgalactosaminyltransferase	-0,76614	1,700713	0,007437	Sousexprimé
AFUN008711	alpha-N-acetylglucosaminidase	-0,77554	1,711835	0,001847	Sousexprimé
AFUN010138	sodium-independent sulfate anion transporter	-0,79822	1,738953	0,035538	Sousexprimé
AFUN006705	dsRNase	-0,80277	1,744453	0,002501	Sousexprimé
AFUN006799	pancreatic triacylglycerol lipase	-0,80454	1,74659	0,048976	Sousexprimé
AFUN011446	transcription factor Sp, invertebrate	-0,80502	1,747175	0,001571	Sousexprimé
AFUN000912	testis-specific serine kinase	-0,81463	1,758844	6,07E-05	Sousexprimé
AFUN009255	heme peroxidase	-0,82035	1,76583	0,00777	Sousexprimé
AFUN020495	homeobox protein MSX	-0,83952	1,789459	0,03969	Sousexprimé
AFUN019121	Lariat debranching enzyme	-0,8407	1,790923	0,003159	Sousexprimé

Identifiant du gène	Nom du gène	Log₂FC	FC	FDR	Sens de régulation
AFUN008616	cuticular protein	5,8285966	56,830622	0,04268912	Surexprimé
AFUN002167	pyrokinin	4,9141226	30,1507629	0,00629027	Surexprimé
AFUN017680	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	4,537684	23,2262446	0,00840665	Surexprimé
AFUN011481	Cytochrome P450	4,53738	23,2213509	4,91E-04	Surexprimé
AFUN017536	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	4,165016	17,9388562	0,03124993	Surexprimé
AFUN017713	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	4,077435	16,8822466	0,0458899	Surexprimé
AFUN017741	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	3,9798949	15,7785738	0,00139476	Surexprimé
AFUN002915	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	3,7229943	13,2048344	0,03358613	Surexprimé
AFUN008918	fatty acid synthase, animal type	3,622747	12,3184344	0,00253853	Surexprimé
AFUN008615	Odorant-binding protein 1	3,6017425	12,1403869	0,00448494	Surexprimé
AFUN016169	odorant-binding protein 5	3,5987387	12,115136	0,00220133	Surexprimé
AFUN000030	fatty acid synthase, animal type	3,4969335	11,2896863	5,43E-04	Surexprimé
AFUN010203	carboxylesterase	3,437935	10,8373115	0,04855933	Surexprimé
AFUN017765	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	3,3183815	9,97544707	0,04777293	Surexprimé
AFUN003481	Fas-binding factor	3,1554093	8,90990037	0,04473594	Surexprimé
AFUN006330	Sarcoplasmic calcium-binding protein	2,9946115	7,97017554	0,02080762	Surexprimé
AFUN007245	odorant-binding protein	2,9944453	7,96925742	0,02030309	Surexprimé
AFUN020037	hyaluronoglucosaminidase	2,7049508	6,52035629	0,01158122	Surexprimé
AFUN004278	3-beta-hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, steroid delta-isomerase	2,6683517	6,35702473	0,0012919	Surexprimé
AFUN004365	Intraflagellar transport protein 20 homolog	2,606409	6,08985974	0,04482609	Surexprimé
AFUN009116	odorant-binding protein	2,5297556	5,77473843	0,00624929	Surexprimé
AFUN020334	mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2	2,500534	5,65894847	0,00183546	Surexprimé
AFUN010262	odorant-binding protein	2,478478	5,57309212	2,25E-04	Surexprimé
AFUN007791	odorant-binding protein antennal	2,4708195	5,54358592	0,0031708	Surexprimé
AFUN017619	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	2,4373975	5,41663734	0,01516977	Surexprimé
AFUN008310	pancreas-specific transcription factor 1a	2,4329457	5,39994869	0,01723577	Surexprimé
AFUN009917	integrin alpha-ps	2,4322097	5,39719458	0,00101136	Surexprimé
AFUN009459	ionotropic receptor IR100i	2,3665645	5,15711601	0,00303123	Surexprimé
AFUN010694	DNA replication complex GINS protein pSF2	2,3361335	5,04947536	0,01223675	Surexprimé

AFUN005243	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	2,327464	5,01922284	0,00149018	Surexprimé
AFUN000679	glucosyl/glucuronosyl transferases	2,2914667	4,89553557	0,00923261	Surexprimé
AFUN011825	venom allergen	2,2658834	4,80948827	2,58E-04	Surexprimé
AFUN002684	testis-specific serine kinase	2,201964	4,60105276	0,01235363	Surexprimé
AFUN005856	Odorant-binding protein 2	2,1924303	4,57074806	0,00333538	Surexprimé
AFUN015955	cuticular protein RR-1 family	2,1845896	4,54597453	0,00295615	Surexprimé
AFUN019463	Envelysin	2,1759808	4,51892872	0,04897968	Surexprimé
AFUN021117	membrane dipeptidase	2,1650934	4,48495466	0,002813	Surexprimé
AFUN017720	Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	2,1374578	4,39986055	0,01175262	Surexprimé
AFUN007458	chchd10	2,1032753	4,29683775	0,04242931	Surexprimé
AFUN015830	Cytochrome P450	2,0675383	4,19170823	0,00876605	Surexprimé
AFUN005257	Mitogen-activated protein kinase	2,0576785	4,16315854	0,00242657	Surexprimé
AFUN008972	corazonin	2,0514817	4,1453149	6,48E-04	Surexprimé
AFUN011420	Glutathione S-transferase	1,9725844	3,92470549	0,0232842	Surexprimé
AFUN011246	Insulin-like peptide	1,9118687	3,76296195	0,00428326	Surexprimé
AFUN003966	Class B Scavenger Receptor (CD36 domain).	1,8838654	3,69062563	0,01527278	Surexprimé
AFUN016367	carboxylesterase	1,8838651	3,69062486	9,12E-05	Surexprimé
AFUN019921	dachs	1,8136947	3,51541424	0,00995214	Surexprimé
AFUN007971	tropomyosin	1,811982	3,51124338	0,02217615	Surexprimé
AFUN002209	dUTP pyrophosphatase	1,7925122	3,46417593	0,00820263	Surexprimé
AFUN021839	dummy-like protein	1,7635301	3,39527893	0,01370454	Surexprimé

Annexe 10 : Genès différemment exprimé entre C vs S

Identifiant du gène	Nom du gène	Log₂FC	FC	Valeur de p ajusté	Sens de régulation
AFUN010842	Outer segment 2	-0,58823717	1,503409	0,03358422	Sousexprimé
AFUN004437	N-acylneuraminate cytidyltransferase	-0,5921758	1,507519	0,0103208	Sousexprimé
AFUN020019	3-glucan binding protein	-0,5923878	1,50774	0,00336733	Sousexprimé
AFUN019641	Glilotactin	-0,5966161	1,512166	0,02411387	Sousexprimé
AFUN016404	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M1	-0,59839785	1,514034	2,81E-04	Sousexprimé
AFUN020482	Tropomyosin	-0,6002076	1,515935	0,00211882	Sousexprimé
AFUN008638	chromatin assembly factor 1 subunit B	-0,60067767	1,516429	0,0495263	Sousexprimé
AFUN001838	transformer-2 protein	-0,60956526	1,525799	0,00706295	Sousexprimé
AFUN022315	lipase	-0,61171055	1,52807	8,04E-04	Sousexprimé
AFUN009045	methyltransferase	-0,6117228	1,528083	2,78E-04	Sousexprimé
AFUN009224	sodium-coupled monocarboxylate transporter	-0,61531705	1,531895	0,03710077	Sousexprimé
AFUN008017	dTMP kinase	-0,61636466	1,533007	0,01558255	Sousexprimé
AFUN001276	chromatin assembly factor 1 subunit A	-0,6178753	1,534613	7,80E-04	Sousexprimé
AFUN018685	fibrinogen-related protein	-0,6210453	1,537989	0,00383522	Sousexprimé
AFUN021733	outer membrane lipoprotein BLC precursor	-0,6212772	1,538236	0,02454096	Sousexprimé
AFUN005256	cyclin-dependent kinase	-0,62273014	1,539786	0,00200575	Sousexprimé
AFUN000248	beta-1,4-mannosyltransferase egghead protein	-0,6232694	1,540362	0,01548964	Sousexprimé
AFUN007205	sister chromatid cohesion protein DCC1	-0,62358457	1,540699	0,00660161	Sousexprimé
AFUN010274	E3 ubiquitin-protein ligase mind- bomb	-0,6237647	1,540891	0,04148116	Sousexprimé

AFUN005160	N-acetyltransferase	-0,6257796	1,543044	7,07E-04	Sousexprimé
AFUN003663	E3 ubiquitin protein ligase	-0,62717915	1,544542	9,08E-04	Sousexprimé
AFUN021612	deoxyribonuclease II	-0,6278665	1,545278	0,0319525	Sousexprimé
AFUN011027	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain-containing protein 1B	-0,63109905	1,548744	0,00262267	Sousexprimé
AFUN010096	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	-0,6331743	1,550974	0,02599527	Sousexprimé
AFUN019321	potassium inwardly-rectifying channel subfamily J	-0,63429195	1,552176	4,81E-04	Sousexprimé
AFUN021317	kinesin family member 20/23	-0,6353332	1,553296	0,03055451	Sousexprimé
AFUN005259	ATP-binding cassette	-0,63913345	1,557393	0,03562178	Sousexprimé
AFUN016560	peptidoglycan recognition protein (long)	-0,6425298	1,561064	0,00412103	Sousexprimé
AFUN019377	vacuolar protein sorting 37B	-0,64265156	1,561196	0,01417906	Sousexprimé
AFUN006385	chitinase	-0,64393175	1,562582	0,04793519	Sousexprimé
AFUN004783	ATP-dependent DNA helicase Q4	-0,64514303	1,563894	0,00702643	Sousexprimé
AFUN017597	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	-0,6494219	1,56854	0,00574297	Sousexprimé
AFUN000030	fatty acid synthase, animal type	-0,65184414	1,571175	5,43E-04	Sousexprimé
AFUN016537	CLIP-domain serine protease	-0,6538528	1,573364	0,00235046	Sousexprimé
AFUN004365	Intraflagellar transport protein 20 homolog	-0,65497625	1,57459	0,04482609	Sousexprimé
AFUN009782	sodium/potassium/calcium exchanger	-0,6565694	1,57633	0,02599527	Sousexprimé
AFUN009606	hairy and enhancer of split, invertebrate	-0,66157234	1,581806	0,00507	Sousexprimé
AFUN009667	replication factor C subunit 3/5	-0,6633954	1,583806	0,00343252	Sousexprimé
AFUN021989	leucine-rich immune protein (Coil-less)	-0,6659425	1,586605	0,00498378	Sousexprimé
AFUN009296	Copper-zinc superoxide dismutase 1	-0,67443794	1,595975	4,62E-04	Sousexprimé
AFUN007522	odorant receptor	-0,676414	1,598162	0,00738438	Sousexprimé
AFUN022209	secretory phospholipase A2	-0,681026	1,60328	0,03187188	Sousexprimé

AFUN019759	mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B	-0,6833005	1,605809	0,00353792	Sousexprimé
AFUN016382	Transporter	-0,6846523	1,607315	0,00950775	Sousexprimé
AFUN020817	fatty acyl-CoA reductase	-0,68627185	1,60912	0,0318081	Sousexprimé
AFUN015876	Adipokinetic hormone 1	-0,6879139	1,610952	0,00163884	Sousexprimé
AFUN001070	39S ribosomal protein L42, mitochondrial	-0,6879313	1,610972	4,03E-04	Sousexprimé
AFUN021115	membrane dipeptidase	-0,6915209	1,614985	0,00119324	Sousexprimé
AFUN015739	Cytochrome P450	-0,69360673	1,617322	2,49E-04	Sousexprimé
AFUN009246	Actin-related protein 2/3 complex subunit	-0,6979431	1,62219	0,00450335	Sousexprimé

Identifiant du gène	Nom du gène	Log₂FC	FC	Valeur de p ajusté	Sens de régulation
AFUN008898	Sphingomyelin phosphodiesterase	5,459862	44,0131279	0,03732865	Surexprimé
AFUN022251	CLIP-domain serine protease	4,595771	24,1804804	0,03582017	Surexprimé
AFUN004046	Borealin	3,9387217	15,3346326	1,89E-04	Surexprimé
AFUN004091	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein	3,756473	13,5148444	0,01097289	Surexprimé
AFUN022131	facilitated glucose transporter (solute carrier family 2)	3,2678523	9,63211288	0,01771208	Surexprimé
AFUN008393	Gustatory receptor	3,0656798	8,37262378	0,00974223	Surexprimé
AFUN005050	nescient helix-loop-helix protein	2,9574337	7,76741043	0,02053561	Surexprimé
AFUN007466	trypsin alpha-4	2,949412	7,72434178	0,0285048	Surexprimé
AFUN007064	nervous fingers	2,8855217	7,38973024	0,04848015	Surexprimé
AFUN022227	Niemann-Pick Type C-2	2,7476478	6,71621214	0,01575018	Surexprimé
AFUN016350	homeobox protein caudal	2,6417685	6,24096231	3,14E-04	Surexprimé
AFUN000077	short wavelength sensitive opsin	2,5495396	5,85447418	0,00261417	Surexprimé
AFUN004120	leucine-rich immune protein (Short)	2,5461445	5,84071302	0,0059153	Surexprimé
AFUN008193	alpha-tocopherol transfer protein- like protein	2,4909189	5,62135879	0,00118884	Surexprimé
AFUN002834	ATP-binding cassette	2,3755698	5,1894074	0,01884099	Surexprimé
AFUN005949	odorant-binding protein	2,307221	4,94928802	0,01951927	Surexprimé

AFUN016245	AMP dependent ligase	2,2773678	4,84792641	0,04186884	Surexprimé
AFUN006189	nucleoside-diphosphate kinase	2,2741592	4,83715645	0,03154852	Surexprimé
AFUN008957	Envelysin	2,2642508	4,80404878	0,04973163	Surexprimé
AFUN021496	protein scarlet	2,2300372	4,69146077	0,00515713	Surexprimé
AFUN015956	Cytochrome P450	2,2081776	4,62091195	0,04761268	Surexprimé
AFUN019992	T-box protein H15	2,1991801	4,59218289	0,01948965	Surexprimé
AFUN010138	sodium-independent sulfate anion transporter	2,1563666	4,45790725	0,03553752	Surexprimé
AFUN020058	Antp family, other	2,1148424	4,33142699	0,01392323	Surexprimé
AFUN004054	Acyl-coenzyme A oxidase	2,0916862	4,26245972	0,01801393	Surexprimé
AFUN008349	Niemann-Pick C2 protein	2,0678303	4,19255671	0,01210469	Surexprimé
AFUN002187	arrestin-1	1,9737645	3,92791715	7,09E-04	Surexprimé
AFUN006868	homeobox protein abdominal-A homolog	1,9580374	3,8853307	4,03E-04	Surexprimé
AFUN020907	Protease m1 zinc metalloprotease	1,9317064	3,81506173	0,01083233	Surexprimé
AFUN017713	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	1,9171116	3,77666181	0,0458899	Surexprimé
AFUN021887	F-box protein	1,907504	3,75159476	0,01215552	Surexprimé
AFUN009268	hairy and enhancer of split related with YRPW motif	1,8179911	3,52589888	0,04889308	Surexprimé
AFUN005675	cuticular protein RR-1 family	1,7504338	3,3645972	0,00670282	Surexprimé
AFUN005400	odorant receptor 1	1,7481802	3,35934555	0,03432911	Surexprimé
AFUN007419	Tektin-2	1,7456912	3,35355485	0,00352281	Surexprimé
AFUN004601	cuticular protein RR-1 family	1,7178893	3,28954785	8,18E-04	Surexprimé
AFUN002878	Bardet-Biedl syndrome 8	1,6791482	3,20238819	0,00923873	Surexprimé
AFUN003068	eupolytin	1,6767446	3,1970573	0,01892141	Surexprimé
AFUN020256	LIM homeobox protein 2/9	1,676282	3,19603233	0,00337031	Surexprimé
AFUN017305	Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	1,6602559	3,16072584	0,00217448	Surexprimé
AFUN006505	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, amino acid) member 5/7/	1,6472238	3,13230305	0,04917907	Surexprimé
AFUN001327	solute carrier family 45, member 1/2/4	1,6429741	3,1230899	0,04359996	Surexprimé
AFUN002514	carboxylesterase	1,590451	3,01143475	0,00951568	Surexprimé

AFUN021417	antigen 5 related protein	1,5318711	2,89160622	5,79E-04	Surexprimé
AFUN010651	lamin	1,5298624	2,88758297	0,01468378	Surexprimé
AFUN010331	Protein NEDD1	1,5232394	2,87435728	0,02560794	Surexprimé
AFUN011108	Kinesin-like protein	1,5158143	2,85960187	0,00824528	Surexprimé
AFUN001395	amiloride-sensitive sodium channel	1,5109551	2,84998653	0,00138962	Surexprimé
AFUN007606	SIFamide	1,4978523	2,82421966	0,0012264	Surexprimé
AFUN008455	protein phosphatase	1,4767919	2,78329128	0,00104192	Surexprimé

RESEARCH ARTICLE

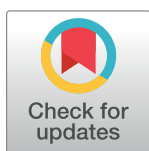
Influence of GST- and P450-based metabolic resistance to pyrethroids on blood feeding in the major African malaria vector *Anopheles funestus*

Lynda Nouage^{1,2}*, Emmanuel Elanga-Ndille¹*, Achille Binyang^{1,2}, Magellan Tchouakui^{1,2}, Tatiane Atsatse^{1,2}, Cyrille Ndo^{3,4}, Sévilor Kekeunou², Charles S. Wondji^{1,5}

1 Department of Medical Entomology, Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), Yaoundé, Cameroon, **2** Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon, **3** Department of Parasitology and Microbiology, Centre for Research in Infectious Diseases (CRID), Yaoundé, Cameroon, **4** Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, Douala, Cameroon, **5** Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom

* These authors contributed equally to this work.

* emmsdille@yahoo.fr, emmanuel.elanga@crid-cam.net (EEN); lnouage@gmail.com (LN)



OPEN ACCESS

Citation: Nouage L, Elanga-Ndille E, Binyang A, Tchouakui M, Atsatse T, Ndo C, et al. (2020) Influence of GST- and P450-based metabolic resistance to pyrethroids on blood feeding in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. PLoS ONE 15(9): e0230984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984>

Editor: Basil Brooke, National Institute for Communicable Diseases, SOUTH AFRICA

Received: March 26, 2020

Accepted: August 26, 2020

Published: September 18, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984>

Copyright: © 2020 Nouage et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Abstract

Insecticide resistance genes are often associated with pleiotropic effects on various mosquito life-history traits. However, very little information is available on the impact of insecticide resistance on blood feeding process in mosquitoes. Here, using two recently detected DNA-based metabolic markers in the major malaria vector, *An. funestus*, we investigated how metabolic resistance genes could affect the blood meal intake. After allowing both the field F1 and lab F8 *Anopheles funestus* strains to feed on the human arm for 30 minutes, we assessed the association between key parameters of blood meal process including, probing time, feeding duration, blood feeding success, blood meal size, and markers of glutathione S-transferase (*L119F-GSTe2*) and cytochrome P450 (*CYP6P9a_R*)—mediated metabolic resistance. None of the parameters of blood meal process was associated with *L119F-GSTe2* genotypes. By contrast, for *CYP6P9a_R*, homozygous resistant mosquitoes were significantly more able to blood-feed than homozygous susceptible (OR = 3.3; CI 95%: 1.4–7.7; P = 0.01) mosquitoes. Moreover, the volume of blood meal ingested by *CYP6P9a-SS* mosquitoes was lower than that of *CYP6P9a-RS* (P<0.004) and of *CYP6P9a-RR* (P<0.006). This suggests that *CYP6P9a* gene is inked with the feeding success and blood meal size of *An. funestus*. However, no correlation was found in the expression of *CYP6P9a* and that of genes encoding for salivary proteins involved in blood meal process. This study suggests that P450-based metabolic resistance may influence the blood feeding process of *Anopheles funestus* mosquito and consequently its ability to transmit malaria parasites.

Funding: This study was funded by a Wellcome Trust Training fellowship (109930/Z/15/Z) awarded to EEN.

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

Introduction

Malaria remains a major public health scourge in sub-Saharan Africa despite significant progress made since the 2000s in reducing its burden [1]. This disease is caused by a *Plasmodium* parasite transmitted by *Anopheles* mosquito species while taking a blood meal from humans. Blood feeding is essential for female mosquito's fecundity [2] as *Anopheles* species like all anautogenous female mosquitoes, require a blood meal to obtain amino acids needed to synthesize yolk proteins for eggs maturation [3, 4]. The blood feeding success of mosquitoes is facilitated by the biochemical properties of salivary gland proteins [5]. Indeed, some salivary proteins such as anopheline antiplatelet protein (AAPP), apyrase, gambiae Salivary Gland protein 6 (gSG6) and members of D7 family have been identified as vasodilators, anti-coagulants and inhibitors of platelet aggregation allowing mosquitoes to overcome host haemostatic mechanisms and to have a successful blood meal [5–8]. Mosquito fecundity was shown to vary by source and size of the blood meal with a difference of these two parameters resulting in significant variations of the number of eggs laid by each female mosquito [4, 8]. It has been shown that the number of eggs laid per female is positively associated to the amount of blood ingested as larger blood meals resulted to an increase of the number of females that developed eggs and the number of eggs per female [9, 10]. The volume of blood taken by a mosquito could be affected by a range of intrinsic (host immunity) and extrinsic factors including ambient temperatures, mosquito age, parity status, gonotrophic cycle, blood feeding history and infection status [10]. More recently, it was reported that exposure to pyrethroids could also significantly influence the process of taking a blood meal and the blood meal volume ingested by Kdr-resistant *Anopheles gambiae* females [11]. Pyrethroids (PY) are the insecticide class mostly used in the last two decades through ITNs and IRS strategies to control malaria transmission [12]. Unfortunately, the widespread use of these insecticides has favoured the development of resistance in malaria vector species [13, 14]. Resistance to pyrethroids involves two main mechanisms: (i) metabolic resistance, due to the increase expression level of detoxifying enzymes, belonging to three families: the cytochrome P450 monooxygenases, the glutathione S-transferases and the carboxylesterases; and (ii) target-site resistance due to mutations in the voltage sodium channels known as knock-down (kdr) mutations [15, 16]. Although resistance mechanisms help mosquitoes to survive under continuous insecticide pressure, these actions are costly and may negatively affect mosquito's fitness including body size, adult longevity, larval development time, fecundity, fertility, mating competitiveness and blood feeding capability [17–19]. For target-site resistance, a decreased longevity and an increased larval development time have been reported in *kdr*-pyrethroid-resistant mosquitoes [20, 21]. Moreover, a recent study suggested that *kdr*-based resistance could impact blood feeding with heterozygote (*kdr*-RS) and susceptible (*kdr*-SS) mosquitoes taking higher blood volume than homozygote (*kdr*-RR) resistant individuals [11]. In some cases, resistant mosquitoes displayed a significant advantage compared to their susceptible counterparts as shown recently for female longevity [22] and vectorial capacity [23]. However, little is known on the impact of metabolic resistance as DNA-based markers were not previously available for this mechanism; thereby limiting the ability to investigate its physiological impact on the blood feeding process in mosquitoes. However, taking advantage of the identification of the first DNA-based metabolic marker in *An. funestus* mosquito, one study reported that a GST-based metabolic resistance caused by a leucine to phenylalanine amino acid change at codon 119 in the glutathione S-transferase epsilon 2 (*L119F-GSTe2*) [24], has a detrimental impact on *An. funestus* fitness. The authors reported that field-resistant mosquitoes exhibited a reduced fecundity and slower larval development but an increased adult longevity [22]. On the other hand, a new DNA-based assay was recently designed for cytochrome P450-mediated resistance (the *CYP6P9a*-R) in *An. funestus*. This

marker showed that mosquitoes carrying this P450-resistant allele survived and succeeded in blood feeding more often than did susceptible mosquitoes when exposed to insecticide-treated nets [25]. The design of assays for both GST- and P450-based resistance now offers a great opportunity to explore how the blood feeding process is influenced by metabolic resistance mechanisms in malaria vectors and further assess how resistance may impact the vectorial capacity of mosquitoes to transmit malaria in the natural environment.

Here, we investigated the effect of metabolic resistance to pyrethroids on the blood feeding process in *An. funestus*, using the two DNA-based metabolic resistance markers: *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a-R* [24, 25]. Specifically, we assessed the association between the genotypes of these metabolic resistance markers and key parameters of blood feeding including mosquito probing time, feeding duration and the blood meal size.

Material and methods

Mosquito collection and rearing

Experiments were carried out using both field and lab strains of *An. funestus*. Field mosquitoes (F_1) were generated from indoor resting female (F_0) collected in Mibellon ($6^{\circ}46'N$, $11^{\circ}70'E$), a village located in a rural area of the savanna-forest region in Cameroon, Central Africa where the *L119F-GSTe2* has been reported [26]. Blood-fed field collected females were kept in paper cups and transported to the insectary of the Centre for Research in Infectious Diseases (CRID) in Yaoundé where they were kept for 4–5 days until they became fully gravid and were then induced to lay eggs using the forced eggs-laying method [27]. The eggs were placed in paper cups containing water to hatch, after which the larvae were transferred into trays and reared to adults. To assess the effect of *CYP6P9a* marker, F_8 progenies were generated from crosses established between the pyrethroid susceptible laboratory strain (FANG) and the resistant (FUMOS-R) lab strain. These two *An. funestus* lab strains were colonized from mosquitoes collected in Southern Africa region. FUMOS is a pyrethroid resistant strain established in the insectary from wild-caught *An. funestus* mosquito species from southern Mozambique [28]. The previous study reported that the over-expression of two duplicated P450 genes, *CYP6P9a* and *CYP6P9b*, constitute the main mechanism driving pyrethroid resistance in this strain [29, 30] for which the *L119F-GSTe2* allele is absent [24]. The FANG strain is completely susceptible to pyrethroids colonized from Calueque in southern Angola [28].

Blood feeding experiments and blood meal size quantification

Blood feeding process. Since blood meal volume has previously been reported to correlate with mosquito size [2], individuals used for blood feeding experiments were firstly starved for 24h then grouped according to their size. Mosquito size was determined by weighing (using an analytical micro-scale, SARTORIUS, Goettingen, Germany). Each starved individual (adult females aged 3–7 days) was immobilized by chilling for 2 minutes at $5^{\circ}C$. Each mosquito was then placed in paper cups covered with black sheet for about an hour before given a blood meal. In order to evaluate the association between metabolic resistant markers on blood meal size, mosquitoes were allowed to bite for 30 min on the bare forearm of a single human volunteer and then genotyped for *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a*. Ethical clearance was obtained from the National Ethics Committee of Cameroon's Ministry of Public Health (N°2018/04/1000/CE/CNERSH/SP) in conformity to the WMA Declaration of Helsinki. Informed verbal consent was obtained from household owners for using their houses for mosquito collection.

The duration of probing and blood feeding was assessed using a batch of 120 F_1 female field-collected mosquitoes. For this purpose, mosquitoes were individually transferred in polystyrene plastic cups covered with netting. They were allowed to rest for 15 min before

observations began. During the blood intake, each mosquito was filmed with a Digital HD Video Camera (Canon PC2154, Canon INC, Japan) placed beside the plastic cup. At the end of the time allowed for feeding, the film for each mosquito was analysed and the parameters such as probing time (defined as the time taken from initial insertion of the mouthparts in the skin until the initial engorgement of blood) [5] and total feeding duration, were recorded, using a digital timer. Due to the low density of female mosquitoes obtained at F₈ generation from crosses of the lab strain mosquitoes, experiments to estimate the probing and the feeding duration of this strain were not investigated.

To determine the blood meal size for both strains, batches of 25 mosquitoes grouped according to their weight were allowed to bite on a human arm. In this case, neither the probing time nor the feeding duration was recorded. After the trial, the whole abdomen of successfully fed mosquitoes (evident by red-coloration engorgement of the abdomen) was extracted and stored in an individual 1.5 ml microtube at -20°C to measure the blood meal size. The rest of the carcasses as well as unfed mosquitoes were kept individually in a microtube containing RNA-later and stored at -20°C.

Blood meal size quantification

To compare the volume of blood ingested between resistant and susceptible mosquitoes, the volume of blood ingested by each mosquito was determined by quantifying the haemoglobin amount, as previously described [31]. Briefly, abdomens of blood fed mosquitoes were homogenized in 0.5 ml of Drabkin's reagent (containing 1.0g of sodium bicarbonate, 0.1g potassium carbonate, 0.05g potassium cyanide, 0.2g potassium ferricyanide all diluted in 1L of distilled water). This reagent converts the haemoglobin into haemoglobin cyanide (HiCN). After 20 minutes at room temperature and the addition of 0.5 ml of chloroform solution, samples were centrifuged at 5600 rpm (3512 rcf) for 5 min. The aqueous supernatant containing HiCN was transferred in a new 1.5 ml microtube. An aliquot of 200µl from each sample was transferred to a microplate and the optical density (OD) read at a wavelength of 620nm in a spectrophotometer (EZ Read 400, biochrom, Cambridge, UK). OD for each sample were read in duplicate and the average value between the two replicates was considered as OD value of the sample. In parallel, OD read on various amounts of human volunteer blood added to Drabkin's reagent in individual microtubes were used as control to generate calibration curves and the regression line used to assess the relationship between OD and blood volume. For each sample, the blood meal size was estimated according to the weight by dividing the blood volume estimated using the regression line by the average weight of each batch of mosquitoes constituted after the weighing. The blood meal size was then expressed in µL of blood per mg of weight.

Molecular species identification

To determine the species composition of *An. funestus* group among the samples, genomic DNA (gDNA) was extracted from both blood-fed and unfed mosquitoes using the Livak protocol [32]. Instead of using the whole body as done for unfed mosquitoes, DNA was extracted from the carcasses of fed mosquitoes after removing the abdomen for blood volume quantification. The concentration and purity of the extracted gDNA were subsequently determined using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) before storage at -20°C. An aliquot of gDNA extracted from field-collected strain was used for molecular identification by a polymerase chain reaction [33].

Genotyping of *L119F-GSTe2* mutation in field-collected strain

The *L119F-GSTe2* mutation was genotyped using gDNA extracted from carcasses of field-collected strains following an allele-specific PCR diagnostic assay previously described [22]. The primers sequences are given in S1 Table. PCR was performed in Gene Touch thermal cycler (Model TC-E-48DA, Hangzhou, 310053, China), in a reaction volume of 15 μ l 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, Wilmington, MA, USA) and 1 μ l of genomic DNA as template. The cycle parameters were: 1 cycle at 95 °C for 2 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were size separated on a 2% agarose gel stained with Midori Green Advance DNA Stain (Nippon genetics Europe GmbH) and visualised using a gel imaging system. The size of the diagnostic band was 523 bp for homozygous resistant (RR) and 312 bp for homozygous susceptible (SS), while heterozygous (RS) showed the two bands.

Genotyping of *CYP6P9a-R* allele in lab strain mosquitoes

The *CYP6P9a* resistance marker was genotyped using the protocol recently described in [25]. A PCR-RFLP were carried out using gDNA extracted from the carcasses of F₈ generation individuals obtained from the reciprocal crosses between FANG and FUMOZ strains used for blood feeding. Briefly, a partial *CYP6P9a* upstream region was amplified in a final volume of 15 μ l PCR mixture containing 10X Kapa Taq buffer A (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), 5 U/ μ l KAPA taq, 25 μ M dNTP, 25 μ M MgCl₂, 10 mM of each primer, 10.49 μ l of dH₂O and 1 μ l of genomic DNA. The PCR cycle parameters were as follows: the initial denaturation step at 95 °C for 5 minutes followed by 35 cycles of 94 °C for 30 seconds, 58 °C for 30 seconds and 72 °C for 45 seconds and a final extension step of 72 °C for 10 minutes. The PCR products were size separated on a 1.5% agarose gel stained with Midori Green Advance DNA Stain (Nippon genetics Europe GmbH) and visualised using a gel imaging system to confirm the product size (450bp). Then, the PCR product was incubated at 65 °C for 2 hours. This was done in 0.2ml PCR strip tubes using 5 μ l of PCR product, 1 μ l of cutSmart buffer, 0.2 μ l of 2 units of Taq1 enzyme (New England Biolabs, catalog: ER0672) and 3.8 μ l of dH₂O. Size separation was performed on a 2.0% agarose gel stained with Midori Green Advance DNA Stain at 100V for 30 minutes. The gel was visualised using an ultraviolet light transilluminator.

Gene expression profiling of major salivary genes encoding proteins involved in blood meal process

The expression profiles of a set of salivary genes encoding for proteins involved in blood meal process was compared between *CYP6P9a-RR*, *CYP6P9a-RS* and *CYP6P9a-SS* *An. funestus* mosquitoes. For each gene, two pairs of exon-spanning primers was designed for each gene using Primer3 online software (v4.0.0; <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) and only primers with PCR efficiency between 90 and 110% determined using a cDNA dilution series obtained from a single sample, were used for qPCR analysis. Taking into account this criteria of efficiency, only the AAPP and four members of D7 family genes (D7r1, D7r2, D7r3, and D7r4) were used for this analysis. Primers are listed in S1 Table. Total RNA was extracted from three batches of 10 whole females of 3–5 days old from *CYP6P9a-RR*, *CYP6P9a-RS* and *CYP6P9a-SS* mosquitoes. RNA was isolated using the RNAeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNA quantity was assessed using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (Thermo Fisher) and 1 μ g from each of the three biological replicates for each batch of mosquitoes was used as a template for cDNA synthesis using the SuperScript III (Invitrogen),

Waltham, Massachusetts, USA) with oligo-dT20 and RNase H, following the manufacturer's instructions. The qPCR assays were carried out in a MX 3005 real-time PCR system (Agilent, Santa Clara, CA 95051, United States) using Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent). A total of 10 ng of cDNA from each sample was used as template in a three-step program involving a denaturation at 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 10 s at 60 °C and a last step of 1 min at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 95 °C. The relative expression and fold-change of each target gene in CYP6P9a-RR and CYP6P9a-RS relative to CYP6P9a-SS was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method incorporating PCR efficiency after normalization with the housekeeping RSP7 ribosomal protein S7 (VectorBase ID: AFUN007153) and the actin 5C (vectorBase ID: AFUN006819) genes for *An. funestus*.

Statistical analysis

All analyses were conducted using GraphPad Prism version 7.00 software (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). We estimated a Fisher's exact probability test and the odds-ratio of *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a* genotypes (homozygous resistant = RR, heterozygote resistant = RS and homozygous resistant = SS) and both susceptible (S) and resistant (R) alleles. This allowed to the assessment of the association between a) insecticide resistance and mosquito's weight by comparing the proportions of the genotypes of both genes in each group established after weighing; b) blood feeding success and insecticide resistance by comparing the proportion of each genotype in both fed and unfed mosquitoes. The feeding duration was grouped into four intervals with 1 minute (60s) amplitude for each interval. The duration of probing and feeding was analysed by comparing the proportion of mosquitoes (for *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a*) with different genotypes in each defined intervals using chi-square test. After estimating the median of weighted blood meal for each genotype, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare the differences between more than two groups and between two groups, respectively as Shapiro-Wilks test showed non-normal distribution.

Results

Metabolic resistance genes and *An. funestus* mosquito's weight

A total of 1,200 (F_1 generation) field strains and 273 (F_8 generation) female mosquitoes were weighed. The mean weight of a mosquito was 0.9 ± 0.010 mg (minimum = 0.2 mg; maximum = 2.3mg) and 0.89 ± 0.016 mg (minimum = 0.2 mg; maximum = 1.7mg) for field and lab strain respectively. No significant difference was found between the mean weights of two strains ($p = 0.18$). For all the analyses, we arbitrarily grouped mosquitoes according to their weight values, into two different classes as followed: [0–1.0] mg and [1.1–2.3] mg. Analysis of the distribution of *L119F-GSTe2* mutation genotypes in each class of field strain mosquitoes showed no association between the mosquito's weight and *L119F-GSTe2* genotypes ($\chi^2 = 0.15$; $p = 0.9$; OR = 1.2, 95%CI: 0.3742–4.176, for RR vs RS; OR = 1.1, 95%CI: 0.3659–3.606 for RR vs SS; OR = 0.9, 95%CI: 0.4943–1.709 for RS vs SS) (Fig 1 and Table 1). This absence of correlation between the *L119F-GSTe2* genotypes and the weight of mosquitoes was confirmed at the allele level (OR = 1; 95% CI: 0.5–2.0; $p = 0.5$) showing that the L119F mutation may not associated with the weight of this *An. funestus* field population (Table 1). In contrast, a significant association was observed between *CYP6P9a* genotypes and the weight of mosquito ($\chi^2 = 29.54$, $p < 0.0001$). Indeed, proportions of RR and RS genotypes were higher than that of SS in the lowest weight class, whereas, for larger weight, mosquitoes with SS genotype were more abundant (67.2%). This association is further supported by odds ratio estimates showing that proportions of homozygote resistant (RR) (OR = 5.4; CI 95%: 2.3–12.7; $p < 0.0001$) and

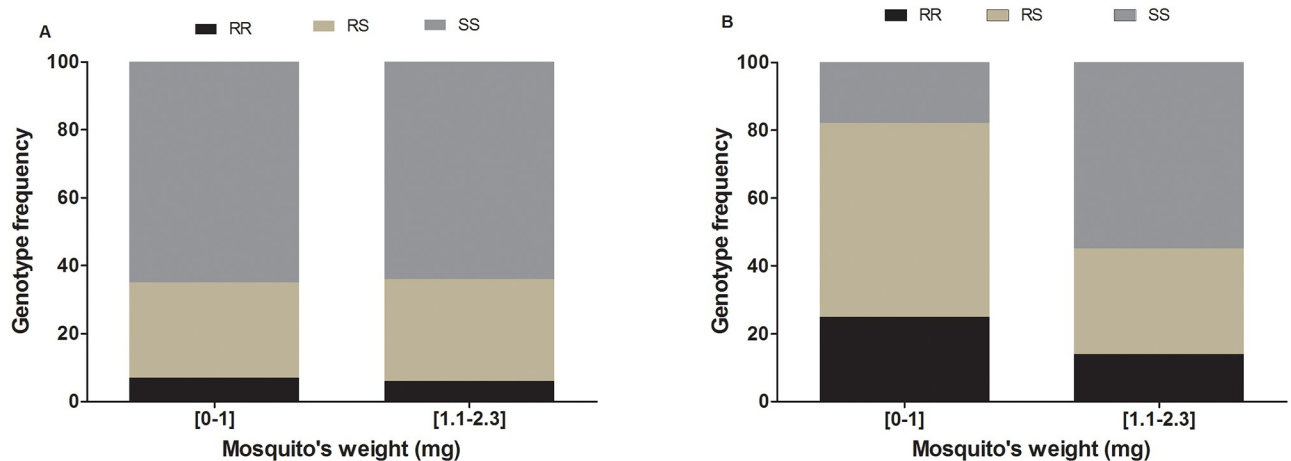


Fig 1. Effect of metabolic resistance on *An. funestus* mosquito weight. Distribution of genotypes of *L119F-GSTe2* (A) and *CYP6P9a-R* (B) markers according to the weight.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984.g001>

heterozygote (RS) (OR = 5.6; CI 95%: 2.8–11.1; $p < 0.0001$) mosquitoes are significantly higher in lowest weight class than the larger one when compared to homozygote susceptible mosquitoes (Table 1). Overall, mosquitoes harbouring the *CYP6P9a-S* susceptible allele displayed higher weight compared to those with the *CYP6P9a-R* resistant allele (OR = 2.8; CI 95%: 1.5–5.0; $p = 0.0003$ (Table 1) suggesting that over-expression of the *CYP6P9a* gene is reducing the weight of pyrethroid resistant *An. funestus* mosquitoes.

Influence of *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a* mutations on *An. funestus* blood feeding success

L119F-GSTe2. Out of the 1,200 individuals from field strain mosquitoes that were allowed to take a blood meal, 457 (39.6%) successfully fed whereas 743 did not. Among blood-fed mosquitoes, a total of 360 were successfully genotyped and 7% (24/360) were homozygous resistant (RR), 28% (103/360) were heterozygous resistant (RS) and 65% (233/360) were homozygous susceptible (SS) (Fig 2a). On the other hand, out of the 300 unfed mosquitoes randomly selected for genotyping, 5% (15/300), 32% (62/300) and 63% (189/300), were homozygous resistant, heterozygotes and homozygote susceptible, respectively (Fig 2a). However, the distribution of L119F genotypes was not statistically different between blood-fed and unfed mosquitoes ($\chi^2 = 0.63$, $p = 0.7$). Furthermore, the estimation of odds ratio (OR = 1; CI 95%: 0.5–2.0;

Table 1. level of association of *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a-R* genotypes with mosquito weight by comparing low (0–1.0mg) and high (1–2.4mg) weight samples.

Genotypes	<i>L119F-GSTe2</i>		<i>CYP6P9a-R</i>	
	Odds ratio	<i>p</i> -value	Odds ratio	<i>p</i> -value
RR vs SS	1.1 (0.4–3.6)	0.5	5.4 (2.3–12.7)	< 0.0001
RS vs SS	0.9 (0.5–1.7)	0.4	5.6 (2.8–11.1)	< 0.0001
RR vs RS	1.2 (0.4–4.1)	0.5	1.0 (0.5–2.3)	0.5
S vs R	1 (0.5–2.0)	0.5	2.8 (1.5–5.0)	0.0003

SS: homozygote susceptible; RR: homozygote resistant; RS: heterozygote;

* significant difference $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984.t001>

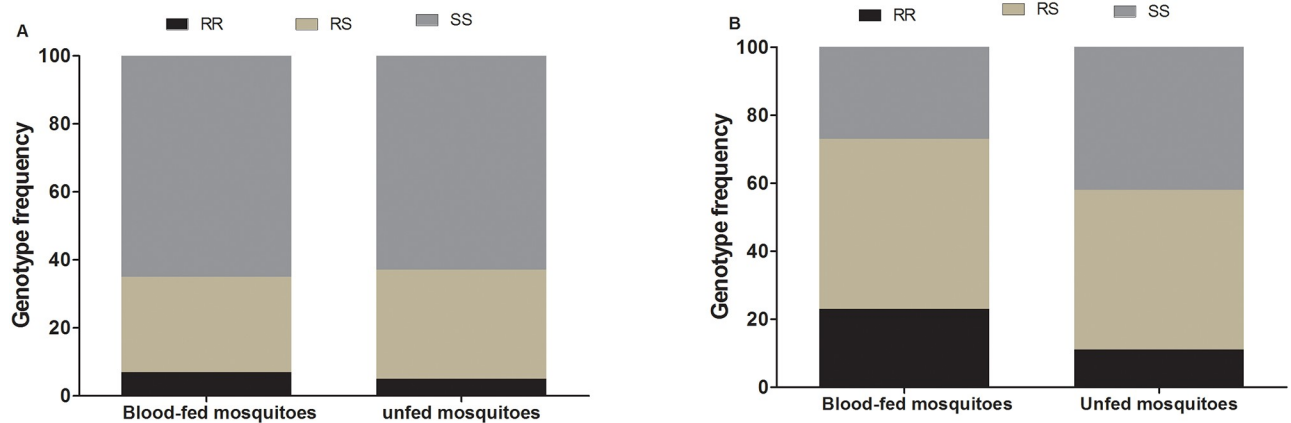


Fig 2. Association between resistance markers and bloodfeeding. Distribution of *L119F-GSTe2* (A) and *CYP6P9a-R* (B) genotypes between blood-fed and unfed *An. funestus* mosquitoes.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984.g002>

$p = 0.6$) showed overall that mosquitoes bearing the 119F-R resistant allele have the same chance to have a successful blood feeding than those with the 119F-S susceptible alleles (Table 2). This suggests that the ability to take blood is not associated with the *L119F-GSTe2* mutation in *An. funestus*.

CYP6P9a-R. Among a total of 273 mosquitoes that were offered a blood meal 140 successfully fed (51.3%) whereas, 133 did not. Out of the 140 mosquitoes that blood-fed, 134 were successfully genotyped for *CYP6P9a-R* allele revealing that 23% (31/134), 50% (67/134) and 27% (36/134) were homozygote resistant *CYP6P9a-RR*, heterozygotes *CYP6P9a-RS* and homozygote susceptible *CYP6P9a-SS*, respectively (Fig 2b). Among the unfed mosquitoes, 11.3% (15/133) were homozygote resistant *CYP6P9a-RR*, 47.4% (63/133) heterozygotes and 41.3% (55/133) were homozygote susceptible *CYP6P9a-SS*. The estimation of odds ratio showed that homozygote resistant *CYP6P9a-RR* mosquitoes are significantly more able to blood feed than homozygote susceptible (OR = 3.33; CI 95%: 1.4–7.7; $p = 0.01$). No difference was observed between heterozygote and homozygote resistant *CYP6P9a-RR* (OR = 1.9, 95%CI: 0.9–4.4; $p = 0.1$) neither with homozygote susceptible *CYP6P9a-SS* (OR = 1.7, 95%CI: 0.9–3.1; $p = 0.1$) mosquitoes (Table 2). Moreover, it was overall observed that mosquitoes with the *CYP6P9a-R* resistant allele have a greater chance to blood feed than those bearing the susceptible allele (OR = 1.9; CI 95%: 1.03–3.2; $p = 0.04$) (Table 2).

Table 2. Assessment of the association of *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a-R* mutations with *An. funestus* mosquito blood feeding.

Genotypes	<i>L119F-GSTe2</i>		<i>CYP6P9a-R</i>	
	Odds ratio	<i>p</i> -value	Odd ratio	<i>p</i> -value
RR vs SS	0.7 (0.2–2.4)	0.4	3.3 (1.4–7.7)	0.01
RS vs SS	1.1 (0.62–2.1)	0.4	1.7 (0.9–3.1)	0.1
RR vs RS	0.6 (0.2–2.3)	0.3	1.9 (0.9–4.4)	0.1
R vs S	1 (0.5–2.0)	0.6	1.8 (1.1–3.2)	0.04

SS: homozygote susceptible; RR: homozygote resistant; RS: heterozygote;

* significant difference $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984.t002>

Association between the *L119F-GSTe2* mutation and probing/ blood feeding duration

Out of the 120 mosquitoes that were individually filmed to assess the influence of insecticide resistance genes on the probing and feeding duration, 7 (6.14%), 40 (35.08%) and 67 (58.77%) were genotyped as homozygous resistant 119F/F-RR, heterozygous L119F-RS and homozygous susceptible L/L119, respectively. Overall, regardless of the genotype, the median value of mosquito's probing duration was 49.5 seconds (minimum = 4s and maximum = 290s). No difference was observed in the probing time of resistant mosquitoes 119F/F-RR (Median = 53 seconds) and heterozygotes L119F-RS (Median = 52s) compared to the homozygote susceptible L/L119 (Median = 52s).

Regarding the blood feeding duration, it was observed that the median and mean time for a mosquito to have a full blood meal was 249.5 seconds and 303 ± 181 seconds respectively, with a minimum = 68 seconds and a maximum = 772 seconds. The feeding duration was longer (median = 269s) in L/L119 mosquitoes compared to L119F-RS (229.5s) and 119F/F-RR (214s) but the difference was not statistically significant ($p = 0.19$, Kruskal-Wallis test).

Effect of *L119F-GSTe2* and *CYP6P9a-R* mutations on the blood meal size of *An. funestus*

L119F-GSTe2. From 457 individuals that took a full blood meal it was observed that the average weighted blood meal of a mosquito regardless of the *L119F-GSTe2* genotype was 3.4 ± 1.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (minimum = 1.2 $\mu\text{l}/\text{mg}$; maximum = 9.2 $\mu\text{l}/\text{mg}$). However, the weighted blood meal was not significantly different ($P = 0.17$; Kruskal-Wallis test; Fig 3a) in homozygote susceptible L119-SS (3.0 $\mu\text{l}/\text{mg}$) compared to homozygote resistant L119-RR (2.8 $\mu\text{l}/\text{mg}$) and heterozygote L119F-RS (3.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$) mosquitoes. This result suggests that the *L119F-GSTe2* mutation is not associated with the volume of blood meal ingested by *An. funestus*.

CYP6P9a-R. The influence of the *CYP6P9a-R* mutation on the volume of blood meal taken by *An. funestus*, was assessed using the 134 blood fed mosquitoes that were successfully genotyped for *CYP6P9a-R* allele. Overall, irrespective of the genotype, the mean weighted blood volume ingested by a mosquito was 4.8 ± 2 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (minimum = 2 $\mu\text{l}/\text{mg}$; maximum = 13.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$). However, the weighted blood meal volume of CYP6P9a-SS mosquitoes (Median = 3.71 $\mu\text{l}/\text{mg}$) was lower than that of CYP6P9a-RS (Median = 4.73 $\mu\text{l}/\text{mg}$) and of CYP6P9a-RR (Median = 4.78 $\mu\text{l}/\text{mg}$) (Fig 3; $p < 0.004$ for RS vs SS and $p < 0.006$ for RR vs SS,

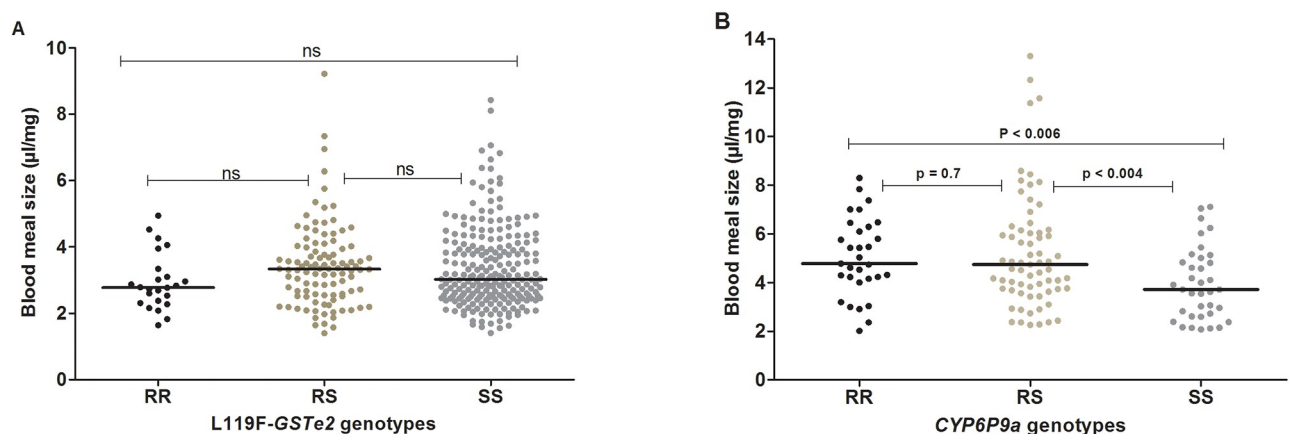


Fig 3. Influence of metabolic resistance on blood meal size of *An. funestus* mosquitoes. Effect of *L119F-GSTe2* (A) and *CYP6P9a-R* (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984.g003>

Mann-Whitney test). No difference in the volume of the blood meal was observed between CYP6P9a-RR and CYP6P9a-RS mosquitoes ($P = 0.7$; Mann-Whitney test). This result suggests that the over-expression of *CYP6P9a* gene is associated with an increase of the volume of the blood meal ingested by *An. funestus*.

Expression profile of AAPP and D7 family salivary genes according to *CYP6P9a*-R genotypes

Due to the association observed between the *CYP6P9a*-R genotypes and blood feeding, an attempt was made to assess whether the genotypes of this gene could be possible associated with the expression profile of key salivary genes. The expression level of AAPP and 4 members of the D7 family salivary genes (D7r1, D7r2, D7r3 and D7r4) was analysed and compared between homozygous resistant (*CYP6P9a*-RR), heterozygous (*CYP6P9a*-RS) and homozygous susceptible genotype (*CYP6P9a*-SS) mosquitoes. No significant difference in the expression level of these genes was observed between the three types of mosquitoes although D7 family genes appeared slightly over-expressed in *CYP6P9a*-RR and *CYP6P9a*-RS when compared to *CYP6P9a*-SS (Fig 4). This result suggests that *CYP6P9a*-R genotypes do not influence the expression profile of both AAPP and D7 family genes in the salivary glands of *An. funestus* mosquitoes.

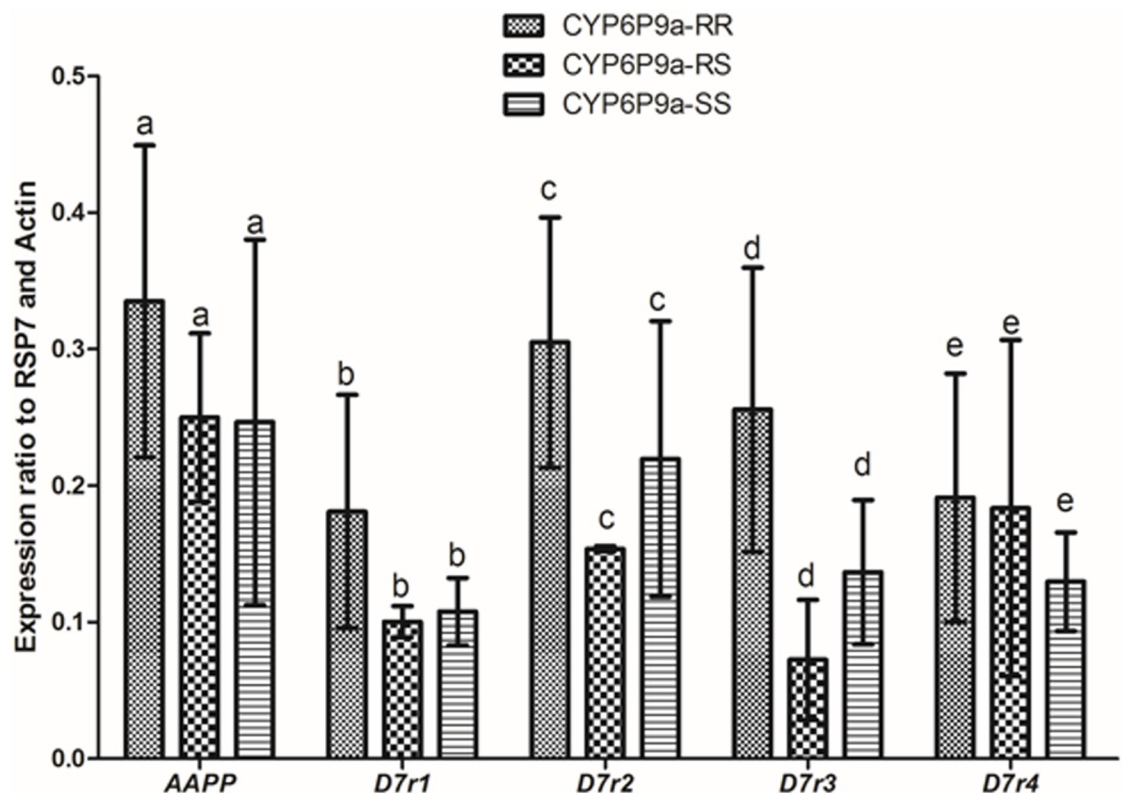


Fig 4. Comparative expression of salivary genes between *CYP6P9a* genotypes. Expression level of AAPP and some members of D7 family genes in *CYP6P9a*-RR and *CYP6P9a*-RS mosquitoes in comparison with *CYP6P9a* susceptible mosquitoes. The normalized relative expression of each gene against two housekeeping genes (RSP7 and Actin) is represented on the vertical axis. Letters a, b, c, d, e indicates the absence of significant difference in the expression level of each gene between the three types of mosquitoes.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230984.g004>

Discussion

Recently, mutations in the *GST* epsilon 2 and in the promoter region of the cytochrome P450 *CYP6P9a*, were described as robust molecular markers for tracking metabolic resistance in pyrethroids resistant populations of *An. funestus* [24, 25]. Using these two key markers, this study assess the possible association of GST- and P450-based metabolic resistance to pyrethroids on the feeding process and blood meal volume of *An. funestus*.

Association of metabolic resistance on blood feeding success

The present study revealed that *CYP6P9a* but not the *L119F-GSTe2* mutation could impact the blood feeding success of *An. funestus* mosquito as possessing the *CYP6P9a* resistant allele increased the likelihood of being successful in blood-feeding. Such selective advantage of *CYP6P9a* resistance allele was also previously reported in a semi-field study in experimental hut trial which observed that homozygous *CYP6P9a*-RR mosquitoes were significantly more likely to blood feed than susceptible SS [25]. This result suggests that *CYP6P9a*-mediated metabolic resistance might influence the ability of *An. funestus* mosquito to blood feed. In contrast, the absence of association observed here for the *L119F-GSTe2* mutation needed to be confirmed by further studies as the low sample of *L119F*-RR homozygous resistance mosquitoes might have biased our analysis. This low number of *L119F*-RR mosquitoes could itself be linked to unsuccessfully genotyping of this marker in approximately 20% of samples analysed in this study. This important point highlights the need for further studies to improve the optimization of the protocol used in this study for the genotyping of the *L119F-GSTe2* mutation. On the other hands, the mechanism whereby *CYP6P9a*-R resistant allele could influence mosquito feeding is unknown and was not investigated in the present study. One hypothesis to explain this association could be related to the motivation of mosquito to blood feed. In fact, it has been reported that some mosquito individuals that emerged with insufficient teneral reserves require an initial blood meal to compensate for insufficient teneral reserves rather than for egg development during their first gonotrophic cycle [34–36]. This phenomenon is mostly observed in smaller female mosquitoes that emerge with insufficient reserve [2]. Thus, we can presume that *CYP6P9a* resistant mosquitoes which were found significantly smaller than susceptible in the present study were more motivated to blood feed as they were probably the ones requiring more to compensate for their insufficient teneral reserves. However, it's important to note that it was surprising and unusual to observed *CYP6Pa*-SS mosquitoes bigger than *CYP6Pa*-RR ones since previous studies often reported larger mosquitoes tend to be more tolerant of insecticides, or that resistant phenotypes are associated with larger body sizes [37, 38]. This unusual observation could be explained by the fact that, instead of using dead dried and unfed mosquito as usually done, in the present study the weight was estimated using alive fresh mosquitoes which were fed with sugar solution until 24 hours before being weighted. With this approach, mosquito's body weight may have been influenced by water and/or elements of sugar digestion that are eliminated when the mosquito is dried. Also, although mosquitoes in the present study were reared in the same tanks (at the larval stage) or cages (in adult stage), pooled regardless their genotype, some important parameters such as larval density, amount of food were not strictly controlled. So we could not exclude that this absence of controlled rearing conditions have significantly influenced mosquito growing and consequently its bodyweight. Overall, it is important to note that the unusual body weight of *An. funestus* mosquito observed here represents one important limitation of our study. This point highlight the need to perform further studies working for instance with dried mosquitoes before confirm our hypothesis about the association of teneral reserve and *CYP6P9a* mutation. One other approach could be to carry out calorimetric assays comparing teneral reserve

between CYP6Pa-SS and CYP6Pa-RR mosquitoes. We could also simply measure and compare the size of the wings between CYP6Pa-SS and CYP6Pa-RR mosquitoes. These further studies would certainly be more informative on the influence of metabolic resistance on the motivation of *An. funestus* mosquito to blood feed.

Influence of metabolic resistance on probing time and feeding duration

The influence of metabolic resistance on probing time and feeding duration was assessed in the present study only for *L119F-GSTe2* mutation. Results revealed no significant association of this metabolic resistance gene on the time spent by a mosquito to probe. The absence of association of insecticide resistance on mosquito probing time was also reported for the *knock-down* (*kdr*) resistance gene in *Anopheles gambiae* with no difference in the probing time noticed between genotypes (RR, RS and SS) after exposure to untreated and insecticide-treated net [11]. This seems to indicate that insecticide resistance might not impact the probing duration of *Anopheles* mosquito during blood feeding. However, this hypothesis must be taken with caution as, to our knowledge, and the exception of the present study as well as the one of Diop *et al*, very little information is available on the impact of insecticide resistance on the probing time during mosquito blood-feeding. In the other hand, even if the difference was not statistically significant, mosquitoes possessing an *L119F-GSTe2* resistant allele (both homozygous and heterozygous) spent less time taking their blood meal than susceptible. This corroborates with observation previously made for *kdr* mutation in *An. gambiae* with lower feeding duration for homozygous resistant mosquitoes than heterozygote and homozygous susceptible [11]. The non-significant result observed may be due to the low number of resistant mosquitoes in the present study. However, from the results, it could be hypothesized that *L119F-GSTe2* mutation might confer an advantage to homozygous resistant mosquitoes as it was previously reported that rapid feeding reduces the risk to be killed by the host defensive behaviour [11, 39].

Effect of metabolic resistance on blood meal volume

In this study, we observed that the volume of blood ingested by a mosquito during a single blood feeding was associated with the genotype of the P450 *CYP6P9a* but not with the *L119F-GSTe2*-based metabolic resistance. This suggests that mechanisms involved in metabolic resistance to pyrethroids in *An. funestus* might influence mosquito life-traits differently. However, as already discussed above, we cannot exclude that the absence of the influence observed for *L119F-GSTe2* gene might also be related to the low number of *L119F-RR* mosquitoes used in the present study. This latter hypothesis seems moreover reinforced by the results of previous studies showing *L119F-GSTe2* mutation [22] and *CYP6P9a-R* resistance gene [40] influencing *An. funestus* fecundity in the same way. The positive association between *CYP6P9a-R* resistant allele and the volume of blood meal is in line with the work of Okoye and collaborators reporting that pyrethroid resistance mechanism in southern African *An. funestus* cause no reduction in fitness of this mosquito [41]. Thus, our finding suggests that the over-expression of *CYP6P9a* gene might probably not compromise the volume of blood ingested of individual mosquitoes carrying the *CYP6P9a-R* resistant allele. Given that activity of P450 monooxygenases as well as blood meal digestion, have been reported to generate an excess production of reactive oxygen species (ROS) increasing oxidative stress which could induce several damages in the mosquito's system that can result to death [42, 43], it could have been expected to see *CYP6P9a-RR* mosquitoes taking lower blood to reduce negative effects of oxidative stress. This observation could certainly be explained by the ability of *Anopheles* mosquitoes to cope with oxidative damage after blood feeding by increasing the antioxidant activity

enzymes including, Cu Zn and Mn superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidases and thioredoxin reductase [44]. This suggests that association between the *CYP6P9a*-R resistant allele and mosquito's blood meal size could be an indirect consequence of some other physiological activities. For instance, because *CYP6P9a* resistant mosquitoes were significantly smaller than their susceptible counterparts, and noting that it has been demonstrated that the amount of teneral reserves is proportional to the body size of mosquito [2], we can presume that the high blood meal volume ingested by *CYP6P9a*-RR mosquitoes might be as a result of a need to compensate for the limited teneral reserves post emergence. In this case, the association observed here could be an indirect consequence of the negative association of *CYP6P9a*-R resistant allele recently observed on the larval development of *An. funestus* [40] resulting to a small body size, and by consequence to insufficient teneral reserves for resistant mosquitoes. Indeed, it was demonstrated that encountering a nutritional environment by *Anopheles* larvae strongly influences adult fitness-related traits such as body size and teneral metabolic reserves [2, 31, 45]. However, our finding did not corroborate with the positive association previously reported between the volume of ingested blood meal and mosquito body size [2]. Further studies will help elucidate the underlying reason of this correlation between *CYP6P9a* genotypes and blood meal size.

Possible association of *CYP6P9a*-R resistant allele on salivary gland genes expression

To obtain a successful blood meal, a female mosquito must balance the risk of death caused by host defensive behavior against the benefits to feed on a host species that maximize fertility [46]. Salivary components permit mosquitoes to reduce their engorgement time and increase their likelihood of survival [5]. In the present study, we assessed the level of expression of genes encoding for some salivary proteins known to be involved on blood intake process of mosquitoes such as AAPP and members of D7 family proteins [6, 47, 48]. The comparative analysis of the expression level of these genes between *CYP6P9a* genotypes showed no significant difference between mosquitoes bearing the resistant allele and those with the susceptible one. This result suggests that the expression of AAPP and D7 family salivary genes are not associated with the *CYP6P9a* mutation. This observation is intriguing as some salivary genes such as D7 family genes were previously reported to be over-expressed in resistant *An. funestus* mosquito compared to susceptible strain [24, 49–52]. The lack of significance observed with the differential expression of genes in the present study could be explained by the fact that our analyses in this study were performed on mosquitoes obtained after crosses between two different strains and therefore sharing the same background, while other studies compared insecticide resistant field /laboratory mosquitoes and susceptible laboratory strains with different genetic background [24, 49, 52]. The absence of influence of the *CYP6P9a* gene on the expression level of salivary gland genes involved in the blood-feeding process observed in the present study appears to indicate that the association found between this gene and the size of blood meal taken by *An. funestus* mosquito might not be related to the expression of these salivary genes encoding proteins which mediate the blood meal process.

This study revealed that GSTe2-mediated resistance is not associated with the blood meal intake of *An. funestus* mosquitoes, whereas *CYP6P9a*-based resistance to pyrethroids is associated with a feeding success and a higher blood meal size. However, this influence on *Anopheles funestus* blood meal intake is not associated with differential expression of major salivary gland proteins involved in blood-feeding. Given the rapid growth of insecticide resistance, it would be interesting to study how this association could affect the fecundity and the vectorial capacity of *An. funestus* mosquitoes.

Supporting information

S1 Table. List of primers used for qPCR analyses.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr Micheal KUSIMO and Mr Francis NKEMNGO; native speakers of English language for accepting to review and edit this paper.

Author Contributions

Conceptualization: Lynda Nouage, Emmanuel Elanga-Ndille, Charles S. Wondji.

Data curation: Lynda Nouage, Emmanuel Elanga-Ndille, Tatiane Atsatse.

Formal analysis: Lynda Nouage, Emmanuel Elanga-Ndille, Cyrille Ndo.

Funding acquisition: Emmanuel Elanga-Ndille, Charles S. Wondji.

Investigation: Lynda Nouage, Emmanuel Elanga-Ndille, Achille Binyang, Magellan Tchouakui, Tatiane Atsatse.

Methodology: Lynda Nouage, Emmanuel Elanga-Ndille, Achille Binyang, Magellan Tchouakui, Tatiane Atsatse, Cyrille Ndo, Sévilor Kekeunou, Charles S. Wondji.

Project administration: Emmanuel Elanga-Ndille.

Supervision: Emmanuel Elanga-Ndille, Sévilor Kekeunou, Charles S. Wondji.

Validation: Emmanuel Elanga-Ndille, Cyrille Ndo.

Visualization: Achille Binyang.

Writing – original draft: Lynda Nouage, Emmanuel Elanga-Ndille.

Writing – review & editing: Emmanuel Elanga-Ndille, Achille Binyang, Magellan Tchouakui, Cyrille Ndo, Sévilor Kekeunou, Charles S. Wondji.

References

1. WHO (2019) World Malaria Report 2019, Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Briegel H (1990) Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: *Culicidae*), vectors of malaria. *Journal of medical entomology* 27: 839–850. <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.5.839> PMID: 2231621
3. Hurd H (2003) Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual review of entomology* 48: 141–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112722> PMID: 12414739
4. Roitberg BD, Gordon I (2005) Does the *Anopheles* blood meal-fecundity curve, curve? *Journal of Vector Ecology* 30: 83. PMID: 16007959
5. Ribeiro J (2000) Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Medical and veterinary entomology* 14: 142–148. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00227.x> PMID: 10872858
6. Islam A, Emran TB, Yamamoto DS, Iyori M, Amelia F, et al. (2019) Anopheline antiplatelet protein from mosquito saliva regulates blood feeding behavior. *Scientific reports* 9: 3129. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39960-2> PMID: 30816309
7. Thiévent K, Hauser G, Elaian O, Koella JC (2019) The interaction between permethrin exposure and malaria infection affects the host-seeking behaviour of mosquitoes. *Malaria journal* 18: 79. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2718-x> PMID: 30871559

8. Taylor P, Hurd H (2001) The influence of host haematocrit on the blood feeding success of *Anopheles stephensi*: implications for enhanced malaria transmission. *Parasitology* 122: 491–496. <https://doi.org/10.1017/s0031182001007776> PMID: 11393821
9. Edman JD, Lynn HC (1975) Relationship between blood meal volume and ovarian development in *Culex nigripalpus* (Diptera: *Culicidae*). *Entomologia experimentalis et applicata* 18: 492–496.
10. Lehane MJ (2005) *The biology of blood-sucking in insects*: Cambridge University Press.
11. Diop MM, Chandre F, Rossignol M, Porciani A, Chateau M, et al. (2019) Sub-lethal insecticide exposure affects host biting efficiency of Kdr-resistant *Anopheles gambiae*. *bioRxiv*: 653980.
12. Bhatt S, Weiss D, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, et al. (2015) The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526: 207. <https://doi.org/10.1038/nature15535> PMID: 26375008
13. Ranson H, N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, et al. (2011) Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in parasitology* 27: 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004> PMID: 20843745
14. Strode C, Donegan S, Garner P, Enayati AA, Hemingway J (2014) The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001619> PMID: 24642791
15. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Berge JB, et al. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect molecular biology* 7: 179–184. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x> PMID: 9535162
16. Ranson H, Jensen B, Vulule J, Wang X, Hemingway J, et al. (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect molecular biology* 9: 491–497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x> PMID: 11029667
17. Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetics Research* 79: 41–47.
18. Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Walton C, Somboon P (2019) Investigation of Relative Development and Reproductivity Fitness Cost in Three Insecticide-Resistant Strains of *Aedes aegypti* from Thailand. *Insects* 10: 265.
19. Rowland M (1991) Behaviour and fitness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Medical and Veterinary Entomology* 5: 193–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00542.x> PMID: 1722728
20. Kumar K, Sharma AK, Kumar S, Patel S, Sarkar M, et al. (2011) Multiple insecticide resistance/susceptibility status of *Culex quinquefasciatus*, principal vector of bancroftian filariasis from filaria endemic areas of northern India. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 4: 426–429. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60119-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60119-3) PMID: 21771692
21. Martins AJ, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JBP (2012) Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PloS one* 7: e31889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031889> PMID: 22431967
22. Tchouakui M, Riveron JM, Djonabaye D, Tchappa W, Irving H, et al. (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* 9: 645. <https://doi.org/10.3390/genes9120645> PMID: 30572680
23. Tchouakui M, Fossog BT, Ngannang BV, Djonabaye D, Tchappa W, et al. (2019) Investigation of the influence of a glutathione S-transferase metabolic resistance to pyrethroids/DDT on mating competitiveness in males of the African malaria vector, *Anopheles funestus*. *Wellcome open research* 4. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15013.1> PMID: 31069259
24. Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, et al. (2014) A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome biology* 15: R27. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r27> PMID: 24565444
25. Weedall GD, Mugenzi LM, Menze BD, Tchouakui M, Ibrahim SS, et al. (2019) A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Science translational medicine* 11: eaat7386. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat7386> PMID: 30894503
26. Menze BD, Riveron JM, Ibrahim SS, Irving H, Antonio-Nkondjio C, et al. (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: e0163261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163261> PMID: 27723825

27. Morgan JC, Irving H, Okedi LM, Steven A, Wondji CS (2010) Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. PLoS One 5: e11872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011872> PMID: 20686697
28. Hunt R, Brooke B, Pillay C, Koekemoer L, Coetzee M (2005) Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. Medical and veterinary entomology 19: 271–275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00574.x> PMID: 16134975
29. Riveron JM, Irving H, Ndula M, Barnes KG, Ibrahim SS, et al. (2013) Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110: 252–257.
30. Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, et al. (2009) Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. Genome research 19: 452–459. <https://doi.org/10.1101/gr.087916.108> PMID: 19196725
31. Briegel H, Lea AO, Klowden MJ (1979) Hemoglobinometry as a method for measuring blood meal sizes of mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 15: 235–238.
32. Livak KJ (1984) Organization and mapping of a sequence on the Drosophila melanogaster X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis. Genetics 107: 611–634. PMID: 6430749
33. Koekemoer L, Kamau L, Hunt R, Coetzee M (2002) A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. The American journal of tropical medicine and hygiene 66: 804–811. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.804> PMID: 12224596
34. Klowden MJ, Lea AO (1978) Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by *Aedes aegypti* (L.). The American journal of tropical medicine and hygiene 27: 827–831. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.827> PMID: 686250
35. Ramasamy M, Srikrishnaraj K, Hadjirin N, Perera S, Ramasamy R (2000) Physiological aspects of multiple blood feeding in the malaria vector *Anopheles tessellatus*. Journal of insect physiology 46: 1051–1059. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(99\)00217-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(99)00217-6) PMID: 10802118
36. Takken W, van Loon JJ, Adam W (2001) Inhibition of host-seeking response and olfactory responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. Journal of insect physiology 47: 303–310. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(00\)00107-4](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(00)00107-4) PMID: 11119776
37. Jeanrenaud AC, Brooke BD, Oliver SV (2019) The effects of larval organic fertiliser exposure on the larval development, adult longevity and insecticide tolerance of zoophilic members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). PLoS one 14.
38. Owusu HF, Chitnis N, Müller P (2017) Insecticide susceptibility of *Anopheles* mosquitoes changes in response to variations in the larval environment. Scientific reports 7: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-016-0028-x> PMID: 28127051
39. Lyimo IN, Haydon DT, Mbina KF, Daraja AA, Mbehela EM, et al. (2012) The fitness of African malaria vectors in the presence and limitation of host behaviour. Malaria journal 11: 425. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-425> PMID: 23253167
40. Tchouakui M, Jacob Riveron M, Mugenzi LMJ, Djonabaye D, Wondji MJ, et al. (2020) Cytochrome P450 metabolic resistance (CYP6P9a) to pyrethroids imposes a fitness cost in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. Genetics Society.
41. Okoye P, Brooke B, Hunt R, Coetzee M (2007) Relative developmental and reproductive fitness associated with pyrethroid resistance in the major southern African malaria vector, *Anopheles funestus*. Bulletin of Entomological Research 97: 599–605. <https://doi.org/10.1017/S0007485307005317> PMID: 17997873
42. Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S (2010) Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? PLoS Pathog 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000> PMID: 20700451
43. Saeaeu L, Phumala Morales N, Komalamisra N, Vargas RM (2011) Antioxidative systems defense against oxidative stress induced by blood meal in *Aedes aegypti*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 42: 542.
44. Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, et al. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. Insect biochemistry and molecular biology 36: 322–335. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.009> PMID: 16551546
45. Telang A, Wells MA (2004) The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito. Journal of Insect Physiology 50: 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.05.001> PMID: 15234628
46. Edman JD, Scott TW (1987) Host defensive behaviour and the feeding success of mosquitoes. International Journal of Tropical Insect Science 8: 617–622.

47. Calvo E, Dao A, Pham VM, Ribeiro JMC (2007) An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.11.005> PMID: 17244545
48. Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM (2006) Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem* 281. PMID: 16301315
49. Elanga-Ndille E, Nouage L, Binyang A, Assatse T, Tene-Fossog B, et al. (2019) Overexpression of two members of D7 salivary genes family is associated with pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* ss but not in *Anopheles gambiae* in Cameroon. *Genes* 10: 211.
50. Riveron JM, Ibrahim SS, Chanda E, Mzilahowa T, Cuamba N, et al. (2014) 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 genomics* 15: 817. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-817> PMID: 25261072
51. Samb B, Konate L, Irving H, Riveron JM, Dia I, et al. (2016) Investigating molecular basis of lambda-cyhalothrin resistance in an *Anopheles funestus* population from Senegal. *Parasites & vectors* 9: 449.
52. Wilding C, Weetman D, Rippon E, Steen K, Mawejje H, et al. (2015) Parallel evolution or purifying selection, not introgression, explains similarity in the pyrethroid detoxification linked *GSTE4* of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Molecular genetics and genomics* 290: 201–215. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0910-9> PMID: 25213601