

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail - Patrie

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTES DES SCIENCES

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

B.P : 812, Yaoundé, Cameroun

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work - Fatherland

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

P.O. Box: 812 Yaoundé, Cameroon

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496

CENTRE FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES – CRID, Yaoundé

ET

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE MOLECULAIRE ET DE RECHERCHE SUR LES  
MALADIES A TRANSMISSION VECTORIELLE, Centre de Biotechnologie

# Rôle des nouvelles mutations V402L et I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthrinoides chez *Anopheles coluzzii* au Cameroun

Mémoire présenté comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master Recherche en  
Biochimie

Option : Biotechnologie et Développement

Présenté par :

**MBAKAM LEUZE Patrick Bertrand**

Licencié ès-sciences

Matricule : 04U081



Superviseur :

**MBACHAM Wilfred**

Professeur

Université de Yaoundé 1,

Cameroun

Superviseur :

**WONDJI Charles**

Professeur

Liverpool School of Tropical Medicine,

Angleterre

Academic year 2023/2024

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail - Patrie

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTES DES SCIENCES

\*\*\*\*\*

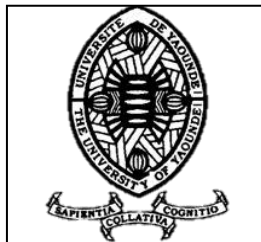
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

B.P : 812, Yaoundé, Cameroun

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work - Fatherland

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

\*\*\*\*\*

FACULTY OF SCIENCE

\*\*\*\*\*

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

P.O. Box: 812 Yaoundé, Cameroon

Tel : (00237)22225659

Fax : (00237)22334496

CENTRE FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASES – CRID, Yaoundé

ET

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE MOLECULAIRE ET DE RECHERCHE SUR LES  
MALADIES A TRANSMISSION VECTORIELLE, Centre de Biotechnologie

# Rôle des nouvelles mutations V402L et I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthrinoides chez *Anopheles coluzzii* au Cameroun

Mémoire présenté comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master Recherche en  
Biochimie

Option : Biotechnologie et Développement

Présenté par :

**MBAKAM LEUZE Patrick Bertrand**

Licencié ès-sciences

Matricule : 04U081

**Superviseur :**

**MBACHAM Wilfred**

Professeur

Université de Yaoundé 1,  
Cameroun

**Superviseur :**

**WONDJI Charles**

Professeur

Liverpool School of Tropical Medicine,  
Angleterre

Academic year 2023/2024

## **DEDICACE**

*À ma famille.*

## REMERCIEMENTS

Le présent travail est le fruit d'une collaboration fructueuse entre l'Université de Yaoundé I et le « *Center for Research in Infectious Diseases* » (CRID) de Yaoundé. Il a bénéficié du soutien financier de la Wellcome Trust Senior Fellowship attribuée au Professeur Charles Wondji.

Ce projet n'aurait pas pu se concrétiser sans l'appui inestimable de nombreuses personnes, auxquelles je souhaite exprimer ma profonde gratitude :

- **Pr Charles S. WONDJI**, pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire de recherche et m'avoir permis d'effectuer mon initiation à la recherche en biologie moléculaire. Je suis honoré d'avoir travaillé à ses côtés et d'avoir bénéficié de ses compétences scientifiques ainsi que de son encadrement.
- **Pr Wilfred MBACHAM**, qui, malgré ses nombreuses responsabilités, a accepté de co-diriger ce travail. Ses conseils avisés, son encadrement, ses orientations et sa disponibilité tout au long de ce projet, ainsi que sa patience et ses encouragements, ont été déterminants dans l'avancement de mes recherches.
- **Au Chef du Département, L'ensemble du corps enseignant** de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, pour la qualité des enseignements que j'ai reçus.
- **Drs. Léon MUGENZI, Magellan TCHOUAKUI, Sougal FREITAS et Yvan FOTSO-TOGUEM** du CRID, pour leur suivi attentif et leurs précieux conseils tout au long de ce travail.
- **L'équipe technique du CRID**, en particulier à Mme Murielle WONDJI, chef de laboratoire, pour sa formation, sa patience et la confiance qu'elle m'a témoignée.
- **Mes collègues du laboratoire**, pour leur soutien et leur accompagnement.
- **Mes amis et camarades de promotion**, qui ont contribué à rendre cette expérience enrichissante.
- **Ma mère, Charlotte MBAKAM**, pour tout le soutien, l'assistance, l'amour et l'accompagnement qu'elle m'a offerts durant les travaux et la rédaction de ce mémoire ainsi que tout au long de mes études.
- **Ma sœur et mes frères**, pour leur amour, leurs conseils et leur soutien financier tout au long de ce travail et de mes études.
- Enfin, à **ma famille, mes ami(e)s et à tous ceux qui**, de près ou de loin, ont apporté leur soutien pendant mes études et la réalisation de ce projet.

## TABLE DE MATIERE

|   |             |
|---|-------------|
| <b>DEDICACE</b> .....   | <b>i</b>    |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....  | <b>ii</b>   |
| <b>TABLE DE MATIERE</b> .....   | <b>iii</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....  | <b>vi</b>   |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....   | <b>vii</b>  |
| <b>LISTE DES ANNEXES</b> .....  | <b>vii</b>  |
| <b>RÉSUMÉ</b> .....   | <b>viii</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>ix</b>   |
| <b>INTRODUCTION</b> .....   | <b>1</b>    |
| <b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....   | <b>4</b>    |
| I.1. Le Paludisme .....   | 5           |
| I.1.1. Définition et épidémiologie du paludisme.....  | 5           |
| I.1.2. Le parasite : <i>Plasmodium</i> .....  | 5           |
| I.1.3. Les vecteurs de paludisme : <i>Anopheles</i> .....                                     | 7           |
| I.1.4. Biologie du parasite chez le vecteur et chez l’homme .....                             | 9           |
| I.1.5. Méthodes de lutte antivectorielle.....   | 10          |
| I.1.5.1. Lutte contre les larves d’ <i>Anopheles</i> .....                                    | 13          |
| I.1.5.2. Lutte contre les adultes d’ <i>Anopheles</i> .....                                   | 13          |
| I.2. Mécanismes de résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides .....                | 14          |
| I.2.1. Résistance comportementale .....   | 15          |
| I.2.2. Résistance cuticulaire .....   | 15          |
| I.2.3. Résistance métabolique .....   | 16          |
| I.2.4. La résistance par modification de la cible de l’insecticide.....                       | 18          |
| I.3. Intérêt de l’étude.....  | 21          |
| <b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b> .....  | <b>23</b>   |
| II.1. Description des sites d’étude.....  | 24          |
| II.2. Matériel et méthodes .....  | 26          |
| II.2.1. Origine des moustiques collectés .....  | 26          |
| II.2.2. Identification moléculaire des moustiques du genre <i>Anopheles gambiae</i> s.l. .... | 28          |

|   |           |
|---|-----------|
| II.2.3. Génotypage des nouvelles mutations V402L(T) et I1527T selon le protocole de LNA PCR chez <i>Anopheles coluzzii</i> .....  | 32        |
| II.2.4. Exploitation et analyses des données .....  | 35        |
| <b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>   | <b>36</b> |
| III.1. Résultats.....   | 37        |
| III.1.1. Échantillonnage des moustiques de la Bio-banque.....   | 37        |
| III.1.2. Identification moléculaire des moustiques de l'espèce <i>Anopheles coluzzii</i> dans les populations étudiées .....  | 38        |
| III.1.3. Distribution spatiale des mutations V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans les populations <i>Anopheles coluzzii</i> au Cameroun.....                         | 39        |
| III.1.3.1. Mutation V402L (T) sur le gène VGSC .....  | 39        |
| III.1.3.2. Mutation I1527T sur le gène VGSC .....   | 40        |
| III.1.4. Distribution spatio-temporelle des mutation V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans les populations <i>Anopheles coluzzii</i> au Cameroun .....                | 41        |
| III.1.4.1. Mutation V402L (T) sur le gène VGSC .....  | 41        |
| III.1.4.2. Mutation I1527T sur le gène VGSC .....   | 42        |
| III.1.5. Implication des nouvelles mutations V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez <i>Anopheles coluzzii</i> au Cameroun ..... | 43        |
| III.1.5.1. Implication de la mutation V402L (T) sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthriinoïdes .....   | 43        |
| III.1.5.2. Implication de la mutation I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthriinoïdes.....   | 46        |
| III.2. Discussion .....   | 49        |
| <b>CONCLUSION PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>REFERENCES.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>  | <b>67</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>ACE 1 :</b>               | Acétyle cholinestérase 1  |
| <b>ADN :</b>                 | Acide désoxyribonucléique                                       |
| <b>Allèle R/S :</b>          | Allèle Résistant/Sensible ou Susceptible                        |
| <b>A.:</b>                   | <i>Anopheles</i>  |
| <b>COEs :</b>                | Co-enzymes  |
| <b>CRID :</b>                | "Centre for Research in Infectious Diseases"                    |
| <b>Deltaméthrine 1X :</b>    | Deltaméthrine 0,05%   |
| <b>DEM :</b>                 | Diéthyl maléate   |
| <b>dNTPs :</b>               | di-nucléotides tri-phosphate                                    |
| <b><i>E. coli</i> :</b>      | <i>Escherichia coli</i>   |
| <b>GABA :</b>                | Acide Gamma-aminobutyrique                                      |
| <b>GSTs :</b>                | Glutathions S-Transférases                                      |
| <b>Kdr :</b>                 | Knock down resistance   |
| <b>ITS :</b>                 | Internal Transcribed Spacer (Espace transcrit interne)          |
| <b>IGS :</b>                 | Intergenic Spacer (Espace inter génique)                        |
| <b>MII :</b>                 | Moustiquaire imprégnée d'insecticide                            |
| <b>MILDA :</b>               | Moustiquaire imprégnée à longue durée d'action                  |
| <b>OMS :</b>                 | Organisation Mondiale de la Santé                               |
| <b>P. :</b>                  | <i>Plasmodium</i>   |
| <b>Perméthrine 1X ; 5X :</b> | Perméthrine 0,75% ; 3,75%                                       |
| <b>PBO :</b>                 | Pypéronyl butoxide  |
| <b>PCR :</b>                 | "Polymerase chain reaction" (Réaction en chaîne par polymérase) |
| <b>PID :</b>                 | Pulvérisation intra-domiciliaire                                |
| <b>PNLP :</b>                | Programme National de Lutte contre le Paludisme                 |
| <b>RPM :</b>                 | Révolution par minute   |
| <b>s.l. :</b>                | " <i>sensu lato</i> " (sens large)                              |
| <b>s.s. :</b>                | " <i>sensu stricto</i> " (sens stricte)                         |
| <b>TAE :</b>                 | Tris Acétate d'éthylènediaminetétraacétique                     |
| <b>TBE :</b>                 | Tris Borate d'éthylènediaminetétraacétique                      |
| <b>VGSC :</b>                | Voltage Gated Sodium Channel                                    |
| <b>WHO :</b>                 | World Health Organization.                                      |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Répartition de l'incidence du paludisme dans le monde. ....  | 5  |
| <b>Figure 2</b> : Carte de la distribution des espèces majeures d'anophèles dans le monde. ....  | 7  |
| <b>Figure 3</b> : Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> (Ookyste = Oocyste, Oocinète =<br>Ookinète) (Source : Pascal Combemorel et al., 2019.)..... | 10 |
| <b>Figure 4</b> : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides. ....   | 15 |
| <b>Figure 5</b> : Les différentes étapes possibles du métabolisme des xénobiotiques .....  | 17 |
| <b>Figure 6</b> : Les Représentation schématique du gène VGSC avec ses domaines et quelque<br>mutation en point rouge .....                                | 21 |
| <b>Figure 7</b> : Sites d'étude d' <i>A. coluzzii</i> .....  | 26 |
| <b>Figure 8</b> : Organisation générale des gènes des ADNr chez les Eucaryotes.....  | 30 |
| <b>Figure 9</b> : Schéma des différentes réactions biochimiques d'un cycle d'amplification de PCR<br>.....   | 31 |
| <b>Figure 10</b> : Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes).....   | 33 |
| <b>Figure 11</b> : Photographie de l'électrophorégramme montrant l'identification moléculaire<br>d' <i>A. gambiae</i> s.l. ....                            | 38 |
| <b>Figure 12</b> : Fréquence génomique et allélique spatiale de la mutation V402L (T). ....  | 39 |
| <b>Figure 13</b> : Fréquence génomique et allélique spatiale de la mutation I1527T. ....   | 40 |
| <b>Figure 14</b> : Fréquence génomique et allélique spatio-temporelle de la mutation V402L (T).....  | 42 |
| <b>Figure 15</b> : Fréquence génomique et allélique spatio-temporelle de la mutation I1527T. ....  | 43 |
| <b>Figure 16</b> : Fréquence génomique et allélique de la mutation V402L(T) et association avec<br>le phénotype de résistance à la Deltaméthrine 1X. ....  | 44 |
| <b>Figure 17</b> : Fréquence génomique et allélique de la mutation V402L(T) et association avec<br>le phénotype de résistance à la Perméthrine 1X. ....    | 45 |
| <b>Figure 18</b> : Fréquence génomique et allélique de la mutation V402L (T) et association avec<br>le phénotype de résistance à la Perméthrine 5X. ....   | 46 |
| <b>Figure 19</b> : Fréquence génomique et allélique de la mutation I1527T et association avec le<br>phénotype de résistance à la Deltaméthrine 1X. ....    | 47 |
| <b>Figure 20</b> : Fréquence génomique et allélique de la mutation I1527T et association avec le<br>phénotype de résistance à la Perméthrine 1X. ....      | 48 |
| <b>Figure 21</b> : Fréquence génomique et allélique de la mutation I1527T et association avec le<br>phénotype de résistance à la Perméthrine 5X. ....      | 49 |

## **LISTE DES TABLEAUX**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau I</b> : Amorces et sondes utilisées dans les diagnostics moléculaires LNA.....                                      | 34 |
| <b>Tableau II</b> : Récapitulatif des échantillons collectés dans la Bio-banque et taux de mortalité aux Pyréthriinoïdes ..... | 37 |

## **LISTE DES ANNEXES**

|   |    |
|---|----|
| <b>Annexe 1</b> : Clés d'identification des anophèles .....   | 67 |
| <b>Annexe 2</b> : Structure chimique et mécanisme d'action des pyréthriinoïdes, de l'acide nucléique verrouillé ..... | 68 |
| <b>Annexe 3</b> : Clairance éthique .....   | 69 |

## RÉSUMÉ

La résistance croissante aux pyréthrinoïdes, insecticides de premier plan contre les vecteurs du paludisme, constitue une menace significative pour la santé publique. Les mutations L995F et L995S du gène des canaux sodiques voltage-dépendants (VGSC) sont bien établies comme étant liées à cette résistance et sont fréquemment détectées dans les programmes de gestion des résistances. Récemment de nouvelles mutations, V402L et I1527T, ont été identifiées et associées à la résistance dans d'autres espèces de moustiques. Cette étude explore le rôle de ces mutations dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. coluzzii* au Cameroun. Après collecte d'échantillons dans la bio-banque du CRID, l'identification moléculaire a été confirmée par SINE PCR. Une méthode de qPCR utilisant des acides nucléiques verrouillés (LNA) a été développée pour génotyper les mutations VGSC V402L et I1527T, afin d'évaluer leur distribution spatio-temporelle et leur association dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez cette espèce. *A. coluzzii* s'est révélée être l'espèce dominante dans les localités étudiées, avec des allèles mutants 402L(T) et 1527T présents en 2022 à des fréquences variables. Ces mutations prédominent dans l'Extrême-Nord (Simatou 52% et 53%) et le Nord (Gounougou 54% et 55%) du Cameroun, tandis que leur fréquence est significativement plus faible dans les régions littorales (Bonaberi ; Njombe 10% et 8%), au Centre (Pont de la Gare 5% et 7% ; Mbalmayo 11% et 11%) et au Sud (Kribi 11%). L'analyse spatio-temporelle indique que ces allèles mutants sont devenus dominants en 2022, avec une présence notée depuis 2018-2019 : Simatou (42% et 45%), Gounougou (17% et 25%), Bonaberi (14% et 12%). Les moustiques exposés aux pyréthrinoïdes présentent des variations significatives selon les marqueurs génétiques : pour VGSC V402L(T), le génotype homozygote RR (9% uniquement chez les vivants) montre une survie supérieure à la deltaméthrine 1X, avec des valeurs p significatives indiquant qu'il pourrait permettre une survie à cet insecticide (RR vs SS :  $p=0,0013$  et RR vs RS :  $p=0,0083$ ). Le génotype RS est observé uniquement chez les vivants exposés à la perméthrine 1X à 18%, ce qui représente 9% de l'allèle R, dominant chez les vivants exposés. Les analyses statistiques révèlent que le génotype RS confère une meilleure survie à la perméthrine 1X avec une valeur p significative ( $<0,0001$ ), tandis que la présence de l'allèle R permet également une résistance significative à cette dose ( $p=0,0032$ ). Le génotype homozygote RR (4% uniquement chez les vivants) montre une survie supérieure à la perméthrine 5X, avec une valeur p significative indiquant qu'il pourrait permettre une survie à cette dose plus élevée ( $p=0,0414$ ). Concernant VGSC I1527T, le génotype hétérozygote RS (21% chez les vivants) montre une survie supérieure à la deltaméthrine 1X, avec une valeur p significative indiquant qu'il pourrait permettre une survie à cet insecticide (RS vs SS :  $p=0,0273$ ). Les génotypes RR et RS sont uniquement présents chez les vivants exposés à la perméthrine 1X (12% et 6%), affichant une survie significative par rapport au génotype SS (RR vs SS :  $p=0,0001$  et RS vs SS :  $p=0,0096$ ) et l'allèle R confère une résistance significative par rapport à S ( $p<0,0001$ ). Pour la perméthrine 5X, les génotypes RS et RR présentent des valeurs p significatives indiquant qu'ils peuvent survivre à cette exposition plus élevée par rapport au génotype SS ( $p=0,0029$  pour RS vs SS ;  $p=0,0002$  pour RR vs RS). En conclusion, les substitutions V402L et I1527T confèrent une résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. coluzzii* au Cameroun. Leur présence en tant qu'allèles résistants pourrait offrir un avantage sélectif par rapport aux mutations classiques, rendant essentiel le génotypage à ce locus pour une gestion adaptative de la résistance aux insecticides.

**Mots clés :** VGSC V402L(T) et I1527T, Résistance aux Pyréthrinoïdes, Pyréthrinoïdes, Deltaméthrine 1X, Perméthrine 1X et 5X, *Anopheles coluzzii*, Paludisme, qPCR LNA

## ABSTRACT

The growing resistance to pyrethroids, the leading insecticides against malaria vectors, poses a significant threat to public health. The L995F and L995S mutations in the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene are well established as being linked to this resistance and are frequently detected in resistance management programmes. Recently, new mutations, V402L and I1527T, have been identified and associated with resistance in other mosquito species. This study explores the role of these mutations in pyrethroid resistance in *A. coluzzii* in Cameroon. After collecting samples from the CRID bio-bank, molecular identification was confirmed by SINE PCR. A qPCR method using locked nucleic acids (LNA) was developed to genotype the VGSC V402L and I1527T mutations, in order to assess their spatio-temporal distribution and their association in pyrethroid resistance in this species. *A. coluzzii* was found to be the dominant species in the localities studied, with mutant alleles 402L(T) and 1527T present in 2022 at variable frequencies. These mutations predominate in the Far North (Simatou 52% and 53%) and North (Gounougou 54% and 55%) of Cameroon, while their frequency is significantly lower in the littoral regions (Bonaberi; Njombe 10% and 8%), in the Centre (Pont de la Gare 5% and 7%; Mbalmayo 11% and 11%) and in the South (Kribi 11%). Spatio-temporal analysis indicates that these mutant alleles became dominant in 2022, with their presence noted since 2018-2019: Simatou (42% and 45%), Gounougou (17% and 25%), Bonaberi (14% and 12%). Mosquitoes exposed to pyrethroids show significant variations according to genetic markers: for VGSC V402L(T), the homozygous RR genotype (9% only in the alive) shows superior survival to deltamethrin 1X, with significant p-values indicating that it could allow survival to this insecticide (RR vs SS:  $p=0.0013$  and RR vs RS:  $p=0.0083$ ). The RS genotype was observed only in the alive exposed to permethrin 1X at 18%, representing 9% of the R allele, which is dominant in the exposed alive. Statistical analysis revealed that the RS genotype conferred better survival to permethrin 1X with a significant p-value ( $<0.0001$ ), while the presence of the R allele also conferred significant resistance to this dose ( $p=0.0032$ ). The RR homozygous genotype (4% only in the alive) showed superior survival to permethrin 5X, with a significant p-value indicating that it could allow survival at this higher dose ( $p=0.0414$ ). For VGSC I1527T, the heterozygous RS genotype (21% in the alive) showed superior survival to deltamethrin 1X, with a significant p-value indicating that it could allow survival to this insecticide (RS vs SS:  $p=0.0273$ ). The RR and RS genotypes were only present in live animals exposed to permethrin 1X (12% and 6%), showing significant survival compared with the SS genotype (RR vs SS:  $p=0.0001$  and RS vs SS:  $p=0.0096$ ) and the R allele conferred significant resistance compared with S ( $p<0.0001$ ). For permethrin 5X, the RS and RR genotypes showed significant p-values indicating that they could survive this higher exposure compared to the SS genotype ( $p=0.0029$  for RS vs SS;  $p=0.0002$  for RR vs RS). In conclusion, substitutions V402L and I1527T confer resistance to pyrethroids in *A. coluzzii* in Cameroon. Their presence as resistant alleles could offer a selective advantage over classical mutations, making genotyping at this locus essential for adaptive management of insecticide resistance.

**Key words:** VGSC V402L(T) and I1527T, Pyrethroid resistance, pyrethroids, Deltamethrin 1X, Permethrin 1X and 5X, *Anopheles coluzzii*, Malaria, qPCR LNA

## **INTRODUCTION**

Le paludisme demeure la principale maladie à transmission vectorielle, malgré les efforts déployés pour sa lutte (WHO, 2017). En 2022, 249 millions de nouveaux cas ont été enregistré dans le monde soit 3 millions de cas supplémentaire par rapport à l'année 2021. Cependant, la pandémie de COVID-19 a eu un impact significatif sur les programmes de lutte antipaludique, entraînant 13,4 millions de cas supplémentaires entre 2019 et 2021 (WHO, 2023). L'Afrique subsaharienne a été particulièrement touchée, avec environ 233 millions de cas estimés en 2022, représentant près de 94 % des cas mondiaux (WHO, 2023). Au Cameroun, l'incidence du paludisme reste préoccupante, notamment dans les régions de l'Est, de l'Adamaoua et du Centre, où plus de 130 cas de paludisme confirmés sont recensés pour 1000 habitants par an (PNLP, 2022).

La lutte contre cette maladie repose sur trois axes principaux : la chimiothérapie, la vaccination et la lutte antivectorielle. Cette dernière constitue actuellement le moyen le plus efficace de prévention contre cette parasitose. Elle inclut des méthodes basées sur l'utilisation d'insecticides, telles que les pulvérisations intra-domiciliaires (PID) et les moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA), qui contribuent à réduire la morbidité et la mortalité associées à cette maladie. Cependant, on observe une recrudescence des cas de paludisme au cours des dernières décennies, attribuée à l'émergence de la résistance aux insecticides (Townson *et al.*, 2005; WHO, 2018).

La résistance aux insecticides peut être classée en trois mécanismes principaux : la résistance métabolique, la résistance cuticulaire et la résistance par modification des sites cibles. L'OMS recommande plusieurs classes d'insecticides, parmi lesquelles les pyréthrinoides, souvent en association avec d'autres pour l'imprégnation des moustiquaires. Toutefois, des cas de résistance à ces insecticides ont été rapportés chez les principaux vecteurs du paludisme, tels qu'*Anopheles gambiae* s.l. et *Anopheles funestus* s.l. en Afrique subsaharienne. Des études ont mis en évidence cette résistance dans divers pays comme l'Afrique du Sud (B. D. Brooke *et al.*, 2001), le Mozambique (Cuamba, Morgan, Irving, Steven, & Wondji, 2010), le Kenya (Mulamba *et al.*, 2014), le Sénégal (Gueye *et al.*, 2020), le Ghana (Mugenzi *et al.*, 2022), le Congo (Nguiffo-Nguete *et al.*, 2023), l'Ouganda (Tchouakui *et al.*, 2021) ainsi qu'au Malawi (Wondji *et al.*, 2012), avec une situation particulièrement préoccupante au Cameroun (C. Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015; Menze *et al.*, 2016; Menze *et al.*, 2018).

Parmi les principaux mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles gambiae* s.l. au Cameroun se trouve la modification des sites cibles sur le gène des canaux sodiques dépendants du voltage (VGSC) (A. Enayati & Hemingway, 2010; Janet Hemingway & Ranson, 2000). Des recherches récentes sur les variations génomiques—y compris les polymorphismes de nucléotides simples (SNP) et les variations du nombre de copies (CNV)—chez *A. gambiae* s.s. et *A. coluzzii* en Afrique soutiennent l'importance du développement de systèmes de surveillance moléculaire pour améliorer les outils de lutte contre ces vecteurs. Ces études offrent également un aperçu précieux sur la génomique des populations et la biologie évolutive des espèces eucaryotes soumises à d'importantes pressions évolutives anthropogéniques. En particulier, les mutations L995F et L995S dans les VGSC ont été largement associées à la résistance aux pyréthrinoïdes et servent d'indicateurs critiques dans la gestion efficace de cette résistance (C. Antonio-Nkondjio *et al.*, 2015; Menze *et al.*, 2016; Tene-Fossog, Fotso-Toguem, Amvongo-Adjia, Ranson, & Wondji, 2022). En 2021, Clarkson et ses collaborateurs ont identifié de nouvelles substitutions V402L et I1527T sur VGSC associées à la résistance chez d'autres espèces telles qu'*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* et *Musca domestica* (C. S. Clarkson *et al.*, 2021). De plus, Williams et ses collaborateurs ont validé fonctionnellement la mutation V402L chez *A. gambiae* au Burkina Faso en 2022 (Williams, Cowlshaw, Sanou, Ranson, & Grigoraki, 2022). Ces résultats soulèvent des questions quant à la présence de ces mutations au Cameroun, suggérant un besoin urgent d'études supplémentaires pour évaluer leur impact sur la résistance aux pyréthrinoïdes dans ce pays.

L'objectif général de cette étude est d'examiner les nouvelles mutations Kdr V402L et I1527T dans le contexte de la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles coluzzii* au Cameroun. Plus spécifiquement comme objectifs, il s'agit de/d' :

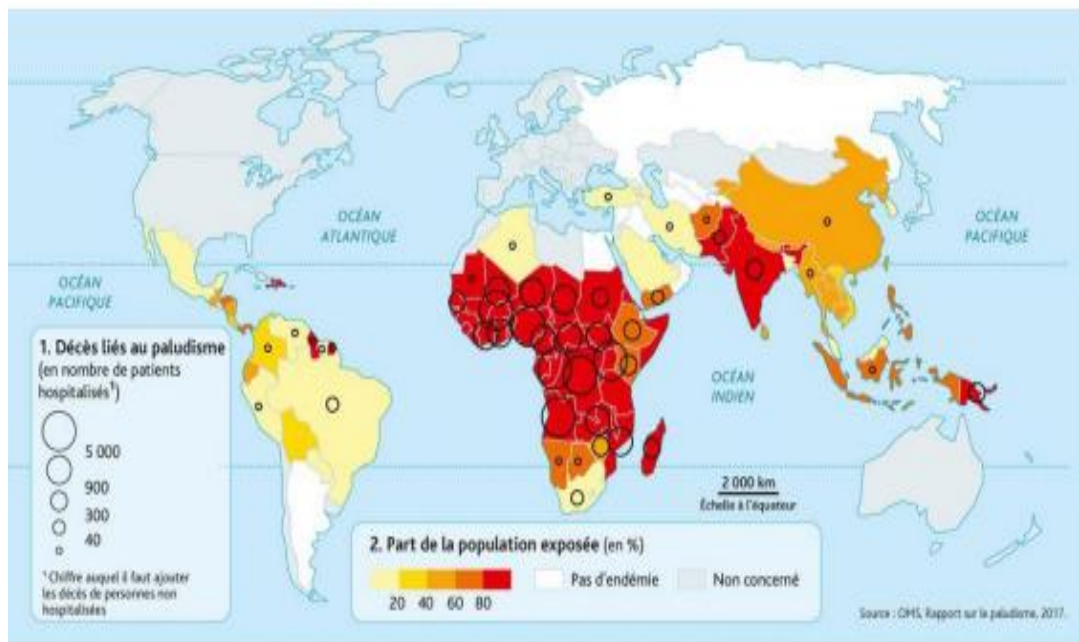
1. déterminer les fréquences génotypique et allélique des marqueurs Kdr V402L (T) et Kdr I1527T dans les échantillons de *A. coluzzii* collectés au Cameroun ;
2. évaluer la distribution spatio-temporelle des fréquences génotypique et allélique des marqueurs Kdr V402L (T) et Kdr I1527T chez *A. coluzzii* au Cameroun ;
3. établir l'implication des marqueurs Kdr V402L (T) et I1527T en associant les phénotypes aux fréquences génotypiques et alléliques liées à la résistance aux pyréthrinoïdes chez *A. coluzzii* au Cameroun.

|  |   |  |
|--|---|--|
|  | <b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE</b> |  |
|--|---|--|

## I.1. Le Paludisme

### I.1.1. Définition et épidémiologie du paludisme

Le paludisme, causé par le protozoaire *Plasmodium*, est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique anophèle femelle infecté. Bien que connu depuis le XIXe siècle et malgré des efforts de lutte, il reste un problème de santé publique majeur, en particulier en Afrique subsaharienne, avec des millions de cas et des décès chaque année (Steketee *et al.*, 2021). Selon les rapports de l'OMS de 2021, 247 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dans le monde, entraînant environ 619 000 décès. L'Afrique est la région la plus touchée, avec 95 % des cas et 96 % des décès, dont 80 % des décès concernent des enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes sont également particulièrement vulnérables à cette maladie (WHO, 2023).



© Bégin Éducation-Humensis, 2019 Géographie, 2nd, 2019  
© EdiCarto

**Figure 1** : Répartition de l'incidence du paludisme dans le monde.

(Source : WHO, 2021.)

### I.1.2. Le parasite : *Plasmodium*

Les agents pathogènes du paludisme sont des protozoaires intracellulaires du genre *Plasmodium*, découverts en 1880 par Laveran (Mouchet, 2004); Ces parasites peuvent être transmis par transfusions sanguines ou voie congénitale (Aubry, Gaüzère, & Vandroux, 2019).

Actuellement, cinq espèces du genre *Plasmodium* sont responsable du paludisme chez l'homme (Bronner, Divis, Farnert, & Singh, 2009) :

- *Plasmodium falciparum* (découvert par Welch en 1897) classé à part avec *P. reichenowi* dans le sous-genre *Laverania*, est responsable de près de 60% des accès palustres (Hay *et al.*, 2009). Présent dans les régions équatoriales et subtropicales, c'est le parasite du paludisme le plus prévalent en Afrique subsaharienne, et à l'origine de 99 % des cas de paludisme estimés en 2016 (WHO, 2017). En cas de complications, le parasite peut passer dans le système nerveux central ; on parle alors de neuro-paludisme (Mouchet, 2004). *P. falciparum* a une durée d'incubation de 7 à 15 jours et une longévité inférieure à un an.

- *Plasmodium vivax* (découvert par Grassi et Feletti en 1890) prédomine dans la région Amérique (64 % des cas) de l'OMS, et représente plus de 30 % des cas dans la région Méditerranée orientale et plus de 40 % dans la région d'Asie du Sud-est de l'OMS (WHO, 2017). Il est beaucoup plus rarement observé en Afrique du fait que les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif (observé chez la majorité des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest) ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax* (ANOFEL, 2014). *P. vivax* a une durée d'incubation de 15 jours et peut s'étendre jusqu'à 7 mois.

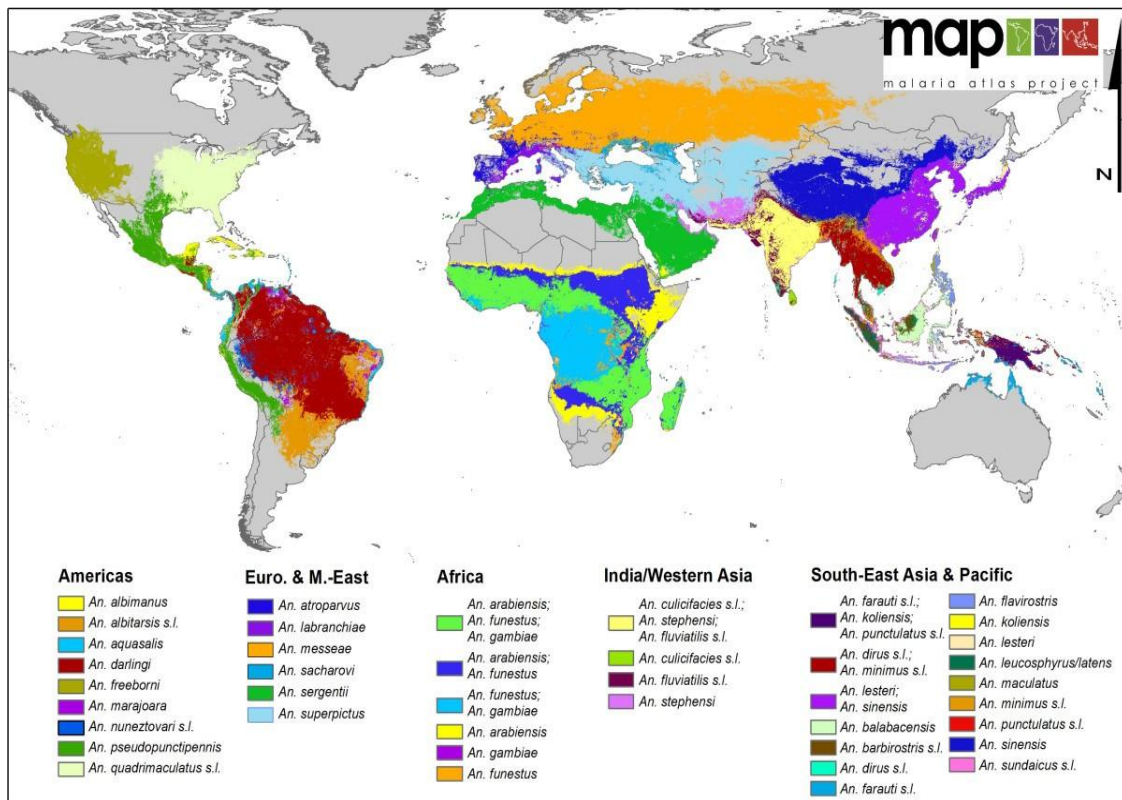
- *Plasmodium malariae* (découvert par Laveran en 1881) : c'est le seul parasite commun à l'homme et au chimpanzé ; il infecte l'homme dans les régions d'Afrique et d'Asie (Swierczynski & Gobbo, 2008). Il est généralement plus fréquent dans les zones forestières. *P. Malariae* a une longévité d'environ 21 jours et s'attaque principalement aux hématies vieilles.

- *Plasmodium ovale* (découvert par Stephens en 1922) a une localisation essentiellement africaine. Longtemps confondue à la précédente, il a été décrit comme remplaçant *P. vivax* chez les sujets Duffy négatifs (Molineaux, Storey, Cohen, & Thomas, 1980). Avec une longévité de 15 jours, on note les rechutes pouvant durer 5 ans, dues à la présence d'hypnozoïtes hépatites (Carnevale & Mouchet, 1990; Mouchet, 2004).

- *Plasmodium knowlesi* (découvert par Knowles en 1932) sévit en Asie du Sud-est, en zone forestière et de prédominance des singes macaques, son hôte habituel (ANOFEL, 2014). Ses infections chez l'humain ont pendant longtemps été attribuées par erreur à *P. malariae* dont il est morphologiquement proche (Singh *et al.*, 2004).

### I.1.3. Les vecteurs de paludisme : *Anopheles*

Les *Anopheles* sont les seuls vecteurs du paludisme humain dans le monde (Rodhain & Perez, 1985). En 1818, elles ont été établies comme un genre de moustique par l'entomologiste Allemand Johann Wilhelm Meigen. La Figure 2 montre la répartition mondiale des espèces majeures de ces dernières.



**Figure 2 :** Carte de la distribution des espèces majeures d'anophèles dans le monde.

(Source : Sinka *et al.*, 2012.)

Au Cameroun, six espèces sont des vecteurs majeurs responsables de la transmission du paludisme. Il s'agit de : *A. gambiae* s.s., *A. coluzzii*, *A. funestus* s.s, *A. arabiensis*, *A. nili* et *A. moucheti* (Barron *et al.*, 2019; Fontenille & Simard, 2004). Certaines espèces telles qu'*A. paludis*, *A. pharoensis*, *A. hancocki*, *A. ovengensis* n'ont qu'une importance locale car présentes juste dans quelques régions et jouant un faible rôle dans l'épidémiologie de la transmission (Christophe Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006; Awono-Ambene, Kengne, Simard, Antonio-Nkondjio, & Fontenille, 2004; Fontenille, Wanji, Djouaka, & Awono-Ambene, 2000).

- **Le complexe *Anopheles gambiae***

Le complexe *Anopheles gambiae* est généralement considéré comme étant le complexe le plus étudié dans le monde entier (Mouchet, 2004). En tout, ce complexe comprend les 9 espèces suivantes : *Anopheles Coluzzii*, *Anopheles gambiae* s.s ; *Anopheles arabiensis* ; *Anopheles Amharicus* (Coetzee *et al.*, 2013) ; *Anopheles merus* ; *Anopheles quadriannulatus* ; *Anopheles comorensis* ; *Anopheles melas* et *Anopheles bwambae*.(Barrón *et al.*, 2019; Loughlin, 2020), donc trois sont majeurs : *A. gambiae* s.s.; *A. coluzzii* et *A. arabiensis* (Antonio-nkondjio *et al.*, 2006; Barrón *et al.*, 2019). Ces espèces sont différenciables les unes des autres uniquement sur le plan génétique. *A. gambiae* s.l. était précédemment subdivisé en deux formes moléculaires distinctes à savoir M et S, basé sur une variation nucléotidique au niveau de la séquence IGS (Intergenic Spacer) de l'ADN ribosomal (Torre *et al.*, 2001). Toutefois, cette espèce a récemment été subdivisée en deux espèces à part entière nommée *A. gambiae* s.s (anciennement forme S) et *A. coluzzii* (précédemment forme M) (Coetzee *et al.*, 2013). *A. gambiae*.et *A. coluzzii* sont considérées comme étant majoritaires dans la propagation du paludisme car elles possèdent une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent africain (Lecollinet, Fontenille, & Failloux, 2022) (figure 2).

- **Le groupe *Anopheles funestus***

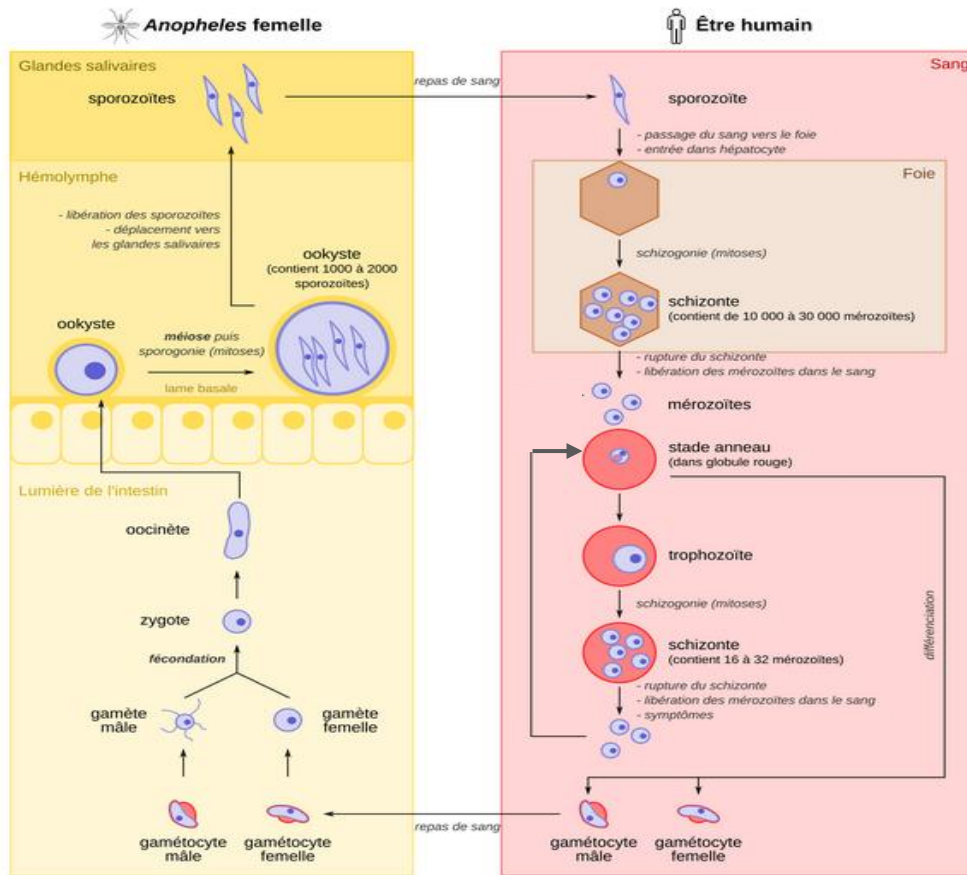
Le groupe *Anopheles funestus* est un vecteur majeur du paludisme au Cameroun. Ce groupe est composé d'au moins 11 espèces africaines très proches, raison pour laquelle il serait difficile de les différencier uniquement sur le point de vue de critères morphologiques présents sur les larves ou sur les adultes. Il est composé des espèces suivantes : *Anopheles funestus* s.s, *Anopheles parensis*, *Anopheles aruni*, *Anopheles rivulorum*, *Anopheles rivulorum-like*, *Anopheles vaneedeni*, *Anopheles brucei*, *Anopheles confusus*, *Anopheles funestuslike*, *Anopheles fucivenosus*, *Anopheles lesoni*, *Anopheles longipalpis* et *Anopheles fluviatilis* (Cohuet *et al.*, 2004; Fontenille & Simard, 2004; Mouatcho *et al.*, 2018; Spillings *et al.*, 2009). Une étude approfondie du polymorphisme génétique interspécifique de la région ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) de l'ADN ribosomal a été menée dans le but de les différencier (Cohuet *et al.*, 2004; Koekemoer *et al.*, 2002; Spillings *et al.*, 2009). *A. funestus* possède une très large distribution géographique couvrant toute la région afro-tropicale (Mouchet *et al.*, 2004). Les larves d'*A. funestus* ont la capacité de se développer uniquement dans les étendus d'eau claire, très larges et permanentes ou semi-permanentes, dont la végétation est émergente en hauteur de quelques dizaines de centimètres ce qui est suffisante pour

faire de l'ombre à la surface de l'eau (Evans, 1938). Des études antérieures ont suggéré une possible résistance croisée entre les carbamates et les pyréthrinoïdes dans les populations d'*A. funestus* (B. D. Brooke *et al.*, 2001; Wondji *et al.*, 2009). Une telle résistance croisée pourrait avoir un impact dévastateur sur les programmes de lutte contre le paludisme et limiter les options disponibles pour la gestion de la résistance.

#### **I.1.4. Biologie du parasite chez le vecteur et chez l'homme**

Le cycle du parasite plasmodium implique deux hôtes : l'homme (hôte intermédiaire) où se produit la phase asexuée et le moustique Anophèle (hôte définitif) où se déroule la phase sexuée. Chez l'homme, *Plasmodium* se développe dans les hématies en se nourrissant d'hémoglobine (Figure 3). Lorsqu'une femelle moustique pique un individu infecté, elle ingère le sang contenant nombreux *Plasmodium* sous forme de gamétocytes (mâles et femelles) qui entameront un processus de reproduction sexuée dans son estomac, qui aboutira à la formation des sporozoïtes. Ces derniers migrent vers les glandes salivaires du moustique et y restent jusqu'à sa mort. Lors de ses prochaines piqûres, le moustique injecte ces sporozoïtes dans le sang humain, initiant une nouvelle infection.

Après l'inoculation chez l'homme, les sporozoïtes pénètrent dans un capillaire sanguin et atteignent le foie, où ils se développent par un processus connu sous le nom de schizogonie pré-érythrocytaire. Dans le foie, les sporozoïtes se multiplient pour former des schizontes tissulaires contenant des milliers de mérozoïtes. Ce processus, qui varie selon les espèces, prend de 6 jours pour *P. falciparum* à 16 jours pour *P. malariae* pour la maturation. Une fois matures, les schizontes se rompent (en même temps que les hépatocytes infectés) libérant les mérozoïtes dans le sang, qui envahissent activement les érythrocytes. À l'intérieur des érythrocytes, les trophozoïtes se développent en 24 à 72 heures dépendamment des espèces, produisant des schizontes sanguins contenant 6 à 36 mérozoïtes. La rupture des érythrocytes libère de nouveaux mérozoïtes pour infecter d'autres cellules dans le sang. Certains mérozoïtes se différencient en formes sexuelles femelles (macrogamétocytes) et mâles (microgamétocytes), qui si ingérées par un moustique anophèle femelle, poursuivent le cycle sporogonique définitif. (Antinori, Galimberti, Milazzo, & Corbellino, 2012).



**Figure 3 :** Cycle de vie de *Plasmodium falciparum* (Ookyste = Oocyste, Oocinète = Ookinète)  
(Source : Pascal Combemorel et al., 2019.)

### I.1.5. Méthodes de lutte antivectorielle

Depuis 2016, le vaccin RTS, S/AS01 (RTS, S ou *Mosquirix*, GSK Vaccines) est opérationnel pour les enfants en Afrique subsaharienne. Toutefois, l'OMS recommande son utilisation chez les enfants vivants dans des zones de transmission modérée à élevée pour prévenir le paludisme à *P. falciparum* (WHO, 2023). Cependant, la lutte anti-vectorielle reste le principal moyen utilisé dans la prévention et la lutte contre le paludisme (Townson et al., 2005; WHO, 2017). Elle est une stratégie de lutte qui cible les vecteurs du paludisme dans le but de limiter le contact homme-vecteur et avec pour conséquence la diminution de la transmission des plasmodies par les anophèles (WHO, 2017). Cette lutte étant basée uniquement sur l'utilisation d'insecticides, consiste à mettre en place des traitements à grande échelle sur tout le territoire ; plus grande est l'étendue des opérations de lutte, meilleur sera l'impact des traitements aux insecticides sur le moustique. Il existe 6 grandes classes d'insecticides connues en santé publique à savoir :

- Les pyréthriinoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des pyréthrines (extrait naturel de fleurs de chrysanthème). Ces insecticides sont classés en deux groupes. Le Groupe 1, à l'exemple de la perméthrine, ne dispose pas d'un groupement cyanure en alpha de la liaison ester. Le Groupe 2 comprend entre autres, la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine, la cyfluthrine. Ils possèdent tous un groupe cyanure en alpha de la liaison ester. Les pyréthriinoïdes constituent la principale classe d'insecticide utilisée et recommandée pour l'imprégnation des moustiquaires compte tenu de leur action foudroyante (effet « knockdown »), et de leur faible toxicité pour les mammifères (J. Hemingway, Hawkes, McCarroll, & Ranson, 2004; WHO, 2023). Ils sont également les principaux insecticides utilisés en pulvérisation intra-domiciliaire à effet rémanent (PID) (Riveron *et al.*, 2013). Leur mode d'action se traduit par le maintien des canaux sodiques ouverts pendant longtemps, ce qui bloque de façon prolongée la transmission de l'influx neuromusculaire et conduit à la mort de l'insecte (Schleier III & Peterson, 2011). Au vu de cela, la résistance aux pyréthriinoïdes, la seule classe d'insecticides actuellement utilisés dans les MII, continue de se répandre au niveau mondial (WHO, 2023). Les organochlorés sont en majorité constitués de Dichloro-DiphénylTrichloroéthane (DDT). Ils ont pour cible principale les canaux sodiques voltage dépendent (CNaVD) des insectes. Le mode d'action du DDT est ciblé sur le système nerveux central et périphérique, il y a ouverture des CNaVD car les DDT empêchent leur fermeture. Ce processus entraîne un déséquilibre ou une perturbation ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane. Il en résulte donc une perturbation de la transmission de l'influx nerveux à travers le nerf, provoquant ainsi un effet de choc ou « knockdown » suivi d'une paralysie qui entraîne la mort de l'insecte (Davies, Field, Usherwood, & Williamson, 2007).
- Les organophosphorés sont les dérivés de l'acide phosphorique : le malathion, le fénitrothion, et le pirimiphos-méthyl et sont les plus utilisés en santé publique pour les aspersions intra-domiciliaires. Ils ont pour cible l'acétylcholinestérase dont ils inhibent l'activité (Lee & Barron, 2016). L'acétylcholinestérase dégrade l'acétylcholine en choline et en acétyle. L'acétylcholine agit comme neuromédiateur des synapses cholinergiques situées dans le système nerveux central de l'insecte ce processus se passe lors de la transmission de l'influx nerveux. Selon la littérature il est prouvé que la fixation

des organophosphorés sur l'enzyme provoque l'accumulation du neuromédiateur dans l'espace synaptique. Cette accumulation conduit à une paralysie et à la mort de l'insecte car le récepteur de l'acétylcholine est resté ouvert (Robert & Carnevale, 2009).

- Les carbamates sont les dérivés de l'acide carbamique. Ce sont les moins persistants dans la nature et les plus biodégradables. Le bendiocarbe et le propoxure sont les insecticides les plus courants, et sont utilisés en aspersion intra-domiciliaires pour lutter contre le paludisme (Robert & Carnevale, 2009). Ces insecticides sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase avec un processus d'action pareil à celui des organophosphorés. La résistance au carbamate peut également être conférée par un mécanisme de résistance au site cible avec des mutations sur le gène Ace-1 qui induisent habituellement une résistance aux insecticides organophosphorés (Janet Hemingway & Ranson, 2000).
- Les pyrroles sont une classe relativement nouvelle de produits chimiques de lutte contre les nuisibles qui permettent de traiter efficacement un large éventail d'infestations d'insectes. Il est un composé chimique organique utilisé comme ingrédient actif dans de nombreux produits antiparasitaires courants. Cette substance a été développée pour répondre aux infestations d'insectes qui commençaient à résister aux pyréthroïdes, une classe de produits chimiques qui imitent les effets des pyréthrines naturelles. Ils sont généralement plus efficaces lorsqu'ils sont combinés à d'autres ingrédients chimiques actifs. Le chlorfénapyr est la seule substance active actuellement disponible dans le commerce qui soit classée parmi les pyrroles. Il agit en perturbant la capacité des insectes à produire de l'énergie dans leurs mitochondries. Le manque d'énergie nouvelle empêche l'insecte d'accomplir des fonctions cruciales telles que se nourrir, se déplacer et se toiletter, et il finit par mourir. En fait, le composé pyrrole utilise le métabolisme de l'insecte contre lui, ce qui entraîne son autodestruction une fois que la substance s'est répandue dans son corps.
- Les néonicotinoïdes représentent une classe de produits chimiques conçus pour imiter les propriétés de la nicotine, un produit chimique qui crée une dépendance. En fait, le terme néonicotinoïde signifie littéralement "nouvel insecticide semblable à la nicotine". Parmi les ingrédients actifs néonicotinoïdes les plus populaires, citons entre autres : l'acétamipride, le dinotéfurane, l'imidaclopride, le thiaméthoxame. Ils se comportent comme la nicotine, en agissant sur le système nerveux central de l'insecte cible, en se

liant aux cellules nerveuses et en provoquant une surstimulation et une perturbation. Les insectes exposés aux néonicotinoïdes présentent des symptômes de spasmes et de perte de contrôle des fonctions corporelles, de paralysie et finalement de mort.

Par ailleurs, ces méthodes de lutte antivectorielle peuvent être dirigées contre différents stades de développement du vecteur.

#### **I.1.5.1. Lutte contre les larves d'*Anopheles***

Elle vise uniquement le stade larvaire des moustiques, c'est-à-dire qu'on peut traiter directement les gîtes larvaires en les aspergeant d'insecticides chimiques, assainir les milieux de telle sorte qu'il n'y a pas de l'eau stagnante aux alentours des habitations humaines. Et pour cela, il faudrait que les gîtes soient facilement identifiables et limités en termes de nombre. En milieu urbain, cette méthode de lutte à long terme est basée surtout sur la réduction des gîtes par des mesures d'assainissement. La lutte contre les larves d'*Anopheles* est cependant difficilement envisageable dans de nombreux pays tropicaux étant donné l'urbanisation et les difficultés de financement des autorités (Pruss-Ustun & Corvalan, 2007).

Par ailleurs la lutte biologique peut être également envisageable. Elle se fait par l'utilisation des prédateurs naturels (poissons qui se nourrissent uniquement de larves) ou encore les bactéries entomopathogènes telle que *Bacillus thuringiensis* (Abagli, Alavo, & Brodeur, 2014; Bawin *et al.*, 2014).

#### **I.1.5.2. Lutte contre les adultes d'*Anopheles***

Cette méthode utilise principalement la pulvérisation intra-domiciliaire (PID) et la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). Les MIIs sont les plus répandus et les plus utilisés, le but visé étant de réduire au maximum le contact entre l'homme et le vecteur, tout en éliminant ce dernier. Les moustiquaires sont reconnues par l'OMS comme le meilleur moyen de protection contre le paludisme, car les moustiques Anophèles piquent principalement la nuit. Initialement, les moustiquaires n'étaient pas imprégnées d'insecticides, offrant seulement une barrière physique. Ensuite les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) ont vu le jour et amélioré leur efficacité en provoquant un effet irritant et excito-répulsif, ainsi qu'un effet "knock-down" (kd = assommer) sur les moustiques. Enfin les moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA) ont été introduites pour offrir une solution durable, avec une efficacité de trois à quatre ans sans ré-imprégnation. Leur accessibilité et leur efficacité sont cruciales pour réduire

la transmission du paludisme et protéger les populations vulnérables, notamment les enfants et les femmes enceintes, contre cette maladie persistante (Josiane Etang *et al.*, 2007; J. Etang *et al.*, 2016; Guillet *et al.*, 2001; Robert & Carnevale, 2009; WHO, 2018). Au Cameroun les MILDA ont été distribué pour la dernière fois en 2011 (PNLP, 2018).

La pulvérisation intra domiciliaire (PID) d'insecticides à effet rémanent est une lutte « imagocide », qui vise à éliminer les vecteurs du paludisme, notamment les moustiques endophiles comme *A. funestus s.l.* et *A. gambiae s.l.* En pulvérisant des insecticides sur les murs intérieurs, cette méthode permet de tuer les moustiques pendant 6 mois à 1 an. Une gamme plus large d'insecticides peut être utilisée pour les PID à effet rémanent. Bien que la PID soit efficace contre les vecteurs du paludisme, particulièrement en cas d'épidémies, les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) sont souvent préférées pour leur durabilité. La Convention de Stockholm, entrée en vigueur en mai 2004, impose des restrictions sur les polluants organiques persistants tout en reconnaissant l'importance du DDT dans la lutte contre les vecteurs. L'OMS recommande de choisir les insecticides pour les pulvérisations en fonction de l'analyse locale, et environ la moitié des pays africains intègrent cette méthode dans leurs efforts de lutte contre le paludisme (Choi, Pryce, & Garner, 2017; Malaria, 2005).

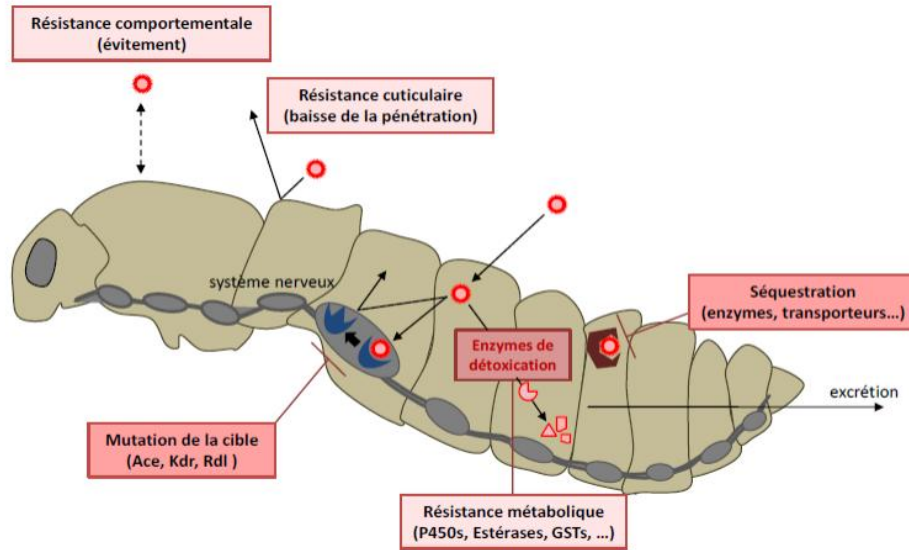
En complément, il existe : la pulvérisation spatiale qui applique des insecticides à l'extérieur des habitations (Robert & Carnevale, 2009) ; la lutte génétique qui vise à réduire les populations de moustiques par autodestruction ou modification génétique, notamment par le relâchement de mâles stériles dans certaines zones qui, après accouplement avec des femelles, empêchent la naissance de progénitures viables (Lofgren *et al.*, 1974; Robert & Carnevale, 2009).

D'autres méthodes de lutte contre les moustiques incluent l'utilisation de répulsifs anti-moustiques appliqués sur la peau, disponibles sous forme de spray, lotion, crème ou lingettes. Ces produits contiennent des substances actives, qu'elles soient synthétiques ou naturelles. Au Burkina Faso, une technique a été développée pour imprégner les rideaux et vêtements d'insectifuges et insecticides, visant à réduire significativement la transmission du paludisme et à protéger les populations vulnérables. (Pietra *et al.*, 1991).

## **I.2. Mécanismes de résistance des vecteurs de paludisme aux insecticides**

Les études aux laboratoires ont permis de montrer que la résistance aux insecticides observées dans de nombreuses populations de vecteur de paludisme peuvent être dues à plusieurs

mécanismes (Low *et al.*, 2013; Riveron *et al.*, 2013), parmi lesquels la détoxification naturelle des insecticides par les enzymes ou alors à une mutation de la cible de l'insecticide. Chacun de ses mécanismes est contrôlé par au moins un gène qui peut présenter différents allèles (A. Enayati & Hemingway, 2010). De façon générale, ces différents mécanismes sont regroupés en quatre grandes catégories.



**Figure 4 :** Principaux mécanismes de résistance aux insecticides.

(Source : Baldet, T *et al.*, 2014)

### I.2.1. Résistance comportementale

La résistance comportementale est l'un des mécanismes les plus difficile à élucidé, car son mécanisme n'est pas encore réellement démontré par rapport aux autres mécanismes de résistance (Djogbenou, Labbe, Chandre, Pasteur, & Weill, 2009). Elle repose sur le fait que lorsque le moustique ressent la présence de l'insecticide, il change immédiatement son comportement lui évitant donc tout contact avec la molécule de l'insecticide.

### I.2.2. Résistance cuticulaire

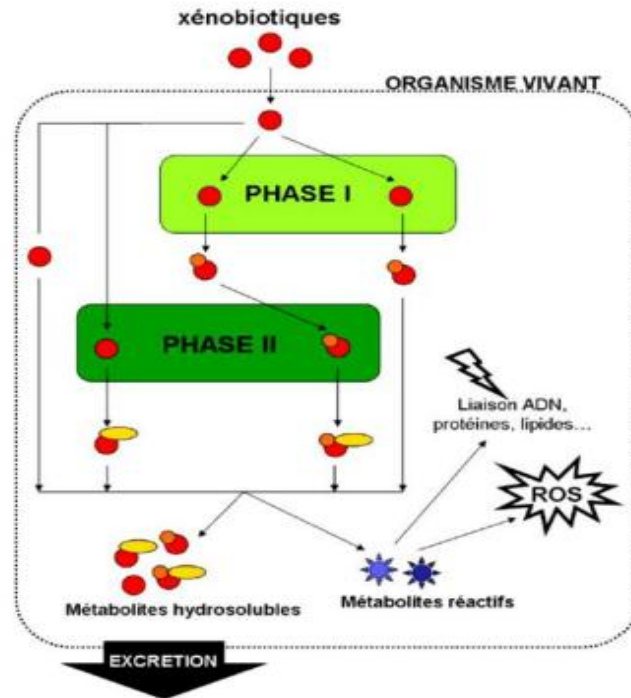
On parle de résistance cuticulaire lorsqu'il y a modification chimique de la cuticule de l'insecte entraînant une diminution de la pénétration de l'insecticide dans l'organisme et aboutissant à la survie des individus. La cuticule possède des propriétés physico-chimiques très particulières, car c'est un milieu biologique très complexe ayant notamment une très forte lipophilie. Les caractéristiques de cette résistance font d'elle un important acteur dans la résistance

aux insecticides chimiques. De ce fait, une étude des mesures par microscopie à balayage électronique a montré une plus grande épaisseur de cuticule chez une souche d'*A. funestus* s.l. résistante aux pyréthrinoïdes comparée à une souche sensible (Wood, Hanrahan, Coetzee, Koekemoer, & Brooke, 2010).

### **I.2.3. Résistance métabolique**

Chez le moustique, les insecticides subissent un processus de biotransformation en composés hydrophiles facilement excrétables. La phase I de ce processus de détoxification inactive les xénobiotiques par réactions d'oxydation, d'hydrolyse ou encore de réduction. Afin de favoriser leur excrétion, la phase II conjugue les métabolites issus de la phase I avec des substrats hydrophiles endogènes. Une augmentation de la métabolisation, soit par surproduction d'enzymes de détoxification, soit par une affinité accrue de l'enzyme pour son substrat, aboutit à une efficacité amoindrie de l'insecticide. Il s'agit là du principal mécanisme de résistance décrit chez le moustique du genre *Anopheles*. Trois superfamilles d'enzymes sont classiquement impliquées dans ces processus de résistance métabolique par désintoxication : les carboxylestérases (COEs), la super famille des cytochromes P450 et les glutathion-S-transférases (GST) (J. Hemingway *et al.*, 2004; Rubert, Guillon-Grammatico, Chandener, Dimier-Poisson, & Desoubieux, 2016). Ces enzymes ont été identifiées chez plusieurs insectes comme responsables de la résistance aux insecticides par l'intermédiaire de trois mécanismes distincts : l'amplification de gènes, la surexpression de gènes et des mutations adaptatrices dans la séquence codante des gènes (Rubert *et al.*, 2016).

- **Les monooxygénases à Cytochrome P450 (CYP450)** sont des molécules impliquées dans l'oxydation d'un nombre élevé de xénobiotiques, ils ont pour but générale de les rendre moins toxiques en augmentant leur solubilité dans l'eau et en facilitant ainsi leur élimination dans l'organisme. Les monooxygénases à cytochromes P450s sont principalement impliqués dans la résistance aux pyréthrinoïdes. C'est ainsi qu'on les retrouve chez certains moustiques tels qu'*A. funestus* s.l. et *A. gambiae* s.l. Chez *A. funestus* s.s on note une résistance aux pyréthrinoïdes dans la région du Mozambique et du Malawi, qui est principalement associée à deux gènes du cytochrome P450 dupliqués CYP6P9 et CYP6P4 (Riveron & *al.*, 2013). Deux autres gènes, le CYP6P3 et le CYP6M2 sont aussi associés à la résistance aux pyréthrinoïdes mais chez *A. gambiae* au Benin et au Nigeria (Djouaka *et al.*, 2008).



**Figure 5 :** Les différentes étapes possibles du métabolisme des xénobiotiques

(Source : Sedrati, K et *al.*, 2019)

- Les Carboxylestérases (COEs)** sont des enzymes impliquées dans la détoxification qui ont pour rôle d'hydrolyser les liaisons esters en permettant la libération d'un alcool et d'un acide carboxylique. Elles ont la possibilité de métaboliser plusieurs molécules car possèdent une faible spécificité de substrat. Les carboxylestérases sont des enzymes ubiquitaires impliquées dans le métabolisme de nombreux composés endogènes et exogènes (Montella, Schama, & Valle, 2012). Plusieurs insecticides comme les organophosphorés ou les carbamates possèdent des liaisons esters susceptibles d'être hydrolysées par les carboxylestérases. En effet, chez de nombreux insectes, ces enzymes ont été identifiés comme responsables de la résistance aux insecticides (X. Li, Schuler, & Berenbaum, 2007). Cette résistance peut être due à trois mécanismes distincts à savoir : l'amplification des gènes, la surexpression de gènes et des mutations dans la séquence codante des gènes. Les carboxylestérases ont un rôle très important dans le métabolisme des organophosphorés, des carbamates et des pyréthrinoïdes dont ils dégradent rapidement les isomères trans (J. Hemingway *et al.*, 2004). Chez les moustiques *Culex* et *Myzus persicae*, ce mécanisme de résistance a été largement étudié. Et

chez ceux du genre *Anopheles* et *Aedes* le mécanisme est très connu et étudié (J. Hemingway *et al.*, 2004).

- **Les glutathions S-transférases (GSTs)** représentent une superfamille d'enzymes multifonctionnelles et activent durant le métabolisme des xénobiotiques. Ces protéines sont retrouvées chez les vertébrés comme chez les invertébrés et sont principalement localisées au niveau de cytosol. Elles sont impliquées dans le transport intracellulaire et la biosynthèse d'hormone qui joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif (A. A. Enayati, Ranson, & Hemingway, 2005). Les GSTs sont principalement impliquées dans la résistance au DDT (J. Hemingway *et al.*, 2004). Chez *A. funestus* dans plusieurs pays d'Afrique, les GSTs ont été associées à la résistance au DDT par la mutation présente sur le gène GSTe2 (L119F) (Riveron *et al.*, 2014). On a aussi enregistré une résistance aux pyréthrinoïdes au Bénin et au Cameroun qui est due à la présence de ces GSTs (Riveron *et al.*, 2014) et à la résistance aux organophosphates (J. Hemingway *et al.*, 2004).
- **Les UDP-Glycosyltransférases (UGT)** constituent une importante superfamille d'enzymes de biotransformation et ont été trouvées dans tous les organismes vivants, y compris les virus, les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Elles catalysent le transfert (l'addition) de groupes glycosyl d'un donneur de sucre activé à une variété de produits chimiques hydrophobes nocifs, de métabolites endo- et xénobiotiques, générant des produits hydrosolubles qui peuvent être excrétés efficacement, ce qui entraîne la détoxification et l'élimination de leurs substrats, leurs conférant une implication dans la résistance aux insecticides (Grant *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2019).

#### **I.2.4. La résistance par modification de la cible de l'insecticide**

Ce mécanisme est très répandu chez les insectes. Il repose sur les modifications de la conformation de la protéine cible de l'insecticide, ce qui entraîne ainsi une réduction de la capacité de fixation de ce dernier ainsi que son effet. Les principales cibles des insecticides sont des récepteurs ou des enzymes du système nerveux tels que le récepteur à l'acétylcholinestérase (AChE) responsable de la résistance aux organophosphates et aux carbamates, le récepteur au canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) responsable de la résistance aux organochlorés et aux pyréthrinoïdes encore appelé résistance knock-down et le récepteur de l'acide gamma-

aminobutyrique (GABA) responsable de la résistance à la dieldrine (A. Enayati & Hemingway, 2010; Janet Hemingway & Ranson, 2000). Ces trois cibles réagissent de manière spécifique à ces insecticides et ainsi qu'a lieu d'action.

- **Le récepteur à l'Acétylcholinestérase**

L'acétylcholinestérase est une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine dans le but de stopper la transmission synaptique et régler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique. Cette molécule est la cible des organophosphorés et des carbamates. Grace aux sites actifs de l'acétylcholinestérase (site anionique et la triade catalytique Ser-His-Glu) qu'il y aura réaction avec l'acétylcholine qui va subir une hydrolyse. Ce qui va induire la libération de la choline et un intermédiaire acétyle-enzyme sera formé (Soreq & Seidman, 2001). Les moustiques ont développé une résistance aux insecticides organophosphorés et carbamates grâce à la mutation rencontrée chez l'acétylcholinestérase (Ibrahim, Ndula, Riveron, Irving, & Wondji, 2016; Weill, Duron, Labbe, Berthomieu, & Raymond, 2003). Deux anophèles majeurs du paludisme ont ce type de résistance aux insecticides (*An gambiae* s.l. et *A. funestus* s.l.). En ce qui concerne *A. gambiae* s.l., cette mutation est due à une substitution glycine-sérine (G119S), signalée en Afrique de l'Ouest (Weill *et al.*, 2003). Cette même mutation a également été détectée chez *Culex pipiens* (Bonning, Hemingway, Romi, & Majori, 1991; Low *et al.*, 2013). D'après des études antérieures la mutation G119S n'a pas été trouvée chez *A. funestus* s.l. (Cuamba *et al.*, 2010) ni chez *Aedes aegypti* (Vontas *et al.*, 2012). Toutefois des études récentes menées par Ibrahim et collaborateurs ont prouvé la présence d'une mutation à la position 485 du gène ACE 1, où l'on observe un changement d'asparagine à isoleucine (N485I) qui a été décrite en 2016 chez *A. funestus* s.s (Ibrahim *et al.*, 2016).

- **Le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA)**

Le récepteur du canal GABA est la cible des phénylpyrazoles et de certains organochlorés (cyclodiènes). Le GABA est la cible principale des neurotransmetteurs inhibiteurs et il joue un rôle critique dans la régulation de l'activité neuronale (hyperpolarisation membranaire) chez les vertébrés et les invertébrés. Les récepteurs des insecticides ont une composition en sous-unités très inconnues pour l'instant. De nos jours, trois sous-unités ont été clonées chez *Drosophila melanogaster*, il s'agit de RDL (résistance à la dieldrine), GRD (GABA et le récepteur de liaison glycine de *Drosophila*) et LCCH3 (Ligand-gated Chloride Channel Homologue 3) (Hosie,

Buckingham, Presnail, & Sattelle, 2001). Pour le récepteur de l'acide gamma 15 aminobutyrique, une mutation au niveau du codon 296 du gène GABA a été observée avec remplacement de l'alanine par la glycine (A296G) (Rauh *et al.*, 1997) qui est responsable de la résistance à la dieldrine chez *A. gambiae* (B. Brooke *et al.*, 2006). On observe aussi une résistance similaire chez *A. funestus* et *A. arabiensis* sur le même récepteur avec plutôt un changement d'alanine à sérine (A296S) (Du *et al.*, 2005; Wondji *et al.*, 2011).

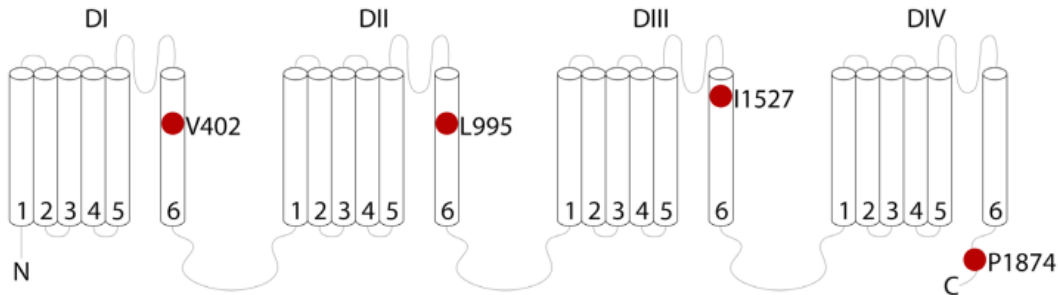
- **Le récepteur au canal sodium voltage dépendant (CNaVdp) : résistance Kdr**

Le canal sodium voltage-dépendant est la cible des pyréthrinoïdes et de certains organochlorés en particulier le DDT. Son but est de propager les potentiels d'action dans les cellules neuronales chez les vertébrés et les invertébrés. Chez les insectes, les pyréthrinoïdes et les DDT provoquent des actions successives à savoir : des mouvements de convulsion suivie de paralysie puis la mort. Ces insecticides se fixent préférentiellement sur le canal sodium ouvert qui se trouvent au niveau moléculaire. Cette fixation va alors ralentir la fermeture du canal préservant ainsi le passage d'ions Na<sup>+</sup> au travers de la membrane (Davies *et al.*, 2007) C'est ainsi que l'effet paralysant chez l'insecte qui a été produit, est appelé effet knock-down (kd = assommer les moustiques). Il a été montré que les mutations au niveau du canal sodium sont à l'origine de la résistance du type knock-down dit « Kdr » (J. Hemingway *et al.*, 2004).

Les deux mutations de type *Kdr* les plus courantes sont celle rencontrées chez *A. gambiae* s.s d'Afrique de l'Ouest. Ici, on observe à la position 995 du gène VGSC, un changement de la leucine par la phénylalanine (L995F), ce changement confère une résistance de grande intensité au DDT, à la Perméthrine et également une résistance croisée à tous les pyréthrinoïdes (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Et celle rencontrée chez *A. gambiae* s.s et *A. arabiensis* d'Afrique de l'Est, où on observe au niveau du même codon 995 du gène VGSC un changement de la leucine plutôt par la sérine (L995S), conférant aussi une résistance à la Perméthrine dans une étude menée au Kenya (Ranson & *al.*, 2000). On note tout récemment la découverte du Kdr chez *A. funestus* s.s (Odero *et al.*, 2024).

Les mutations L995F et L995S des VGSC sont depuis longtemps associées à la résistance aux pyréthrinoïdes et leur détection fait partie de la routine des programmes de gestion de la résistance aux insecticides. Récemment, un haplotype VGSC contenant deux substitutions d'acides aminés associées à la résistance chez d'autres espèces, V402L et I1527T, a été identifié. Ces deux mutations VGSC sont étroitement liées et s'excluent mutuellement des mutations classiques

L995F/S (Williams *et al.*, 2022). Les substitutions sont réparties dans l'ensemble du canal dans les quatre domaines homologues internes (DI – DIV), dans les segments S1, S5 et S6 qui traversent la membrane, dans deux des boucles intracellulaires qui relient les domaines et dans la queue C-terminale (C. S. Clarkson *et al.*, 2021).



**Figure 6 :** Les Représentation schématique du gène VGSC avec ses domaines et quelque mutation en point rouge

(Source : J. Williams *et al.*, 2021)

### I.3. Intérêt de l'étude

La lutte contre les moustiques reste un pilier central des efforts visant à réduire le fardeau du paludisme en Afrique subsaharienne. Cependant, la résistance aux insecticides et notamment ceux utilisés en santé publique, est bien établie dans les populations vectrices du paludisme. Cela pose un défi majeur pour les pays fortement touchés, qui doivent continuer leurs efforts de lutte avec des outils limités. Les stratégies mondiales de lutte contre le paludisme reposent sur la surveillance et l'intervention contre les moustiques, malgré ces obstacles croissants liés à la résistance (Janet Hemingway *et al.*, 2016; WHO, 2018).

Chez *A. gambiae* s.l., la résistance aux insecticides ont été reporté par nombreuses études et cela est médié le plus souvent par la résistance par modification du site cible associé à celle métabolique au travers des modifications au sein du génome des vecteurs (B. Brooke *et al.*, 2006; J. Hemingway *et al.*, 2004; Weill *et al.*, 2003). De même la majorité d'études de caractérisation de gènes de résistance aux insecticides dans la population des *A. gambiae* s.l se focalisent généralement sur des marqueurs L995F et L995S des VGSC qui sont depuis longtemps des marqueurs associées à la résistance aux pyréthrinoïdes et leur détection fait partie de la routine des programmes de gestion de la résistance aux insecticides (Balkew *et al.*, 2010; Fadel *et al.*, 2019; Messenger *et al.*, 2017). Récemment, l'étude menée par Williams et collaborateurs a identifié un

haplotype VGSC contenant deux nouvelles substitutions d'acides aminés (V402L et I1527T) associées à la résistance chez *A. coluzzii*, ces derniers ont mis en évidence le rôle de ces nouvelles mutations des VGSC dans la résistance aux pyréthrinoïdes au Burkina Faso (Williams *et al.*, 2022).

Dans le but d'élucider la distribution et le rôle joué par ces mutations dites nouvelles de VGSC au Cameroun, nous nous sommes proposés de mener cette étude afin d'avoir une bonne compréhension des modèles de résistance aux insecticides et de concevoir de nouveaux marqueurs de résistance utiles aux programmes de gestion de la résistance aux insecticides. Par ailleurs la répartition non uniforme des espèces vectrices du paludisme et leur profil de résistance aux insecticides varient à l'échelle nationale c'est pourquoi il serait important d'effectuer une caractérisation locale des populations selon leur évolution génomique afin de mettre en place stratégie efficace gestion de la résistance.

|  |  |  |
|--|--|--|
|  | <b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b> |  |
|--|--|--|

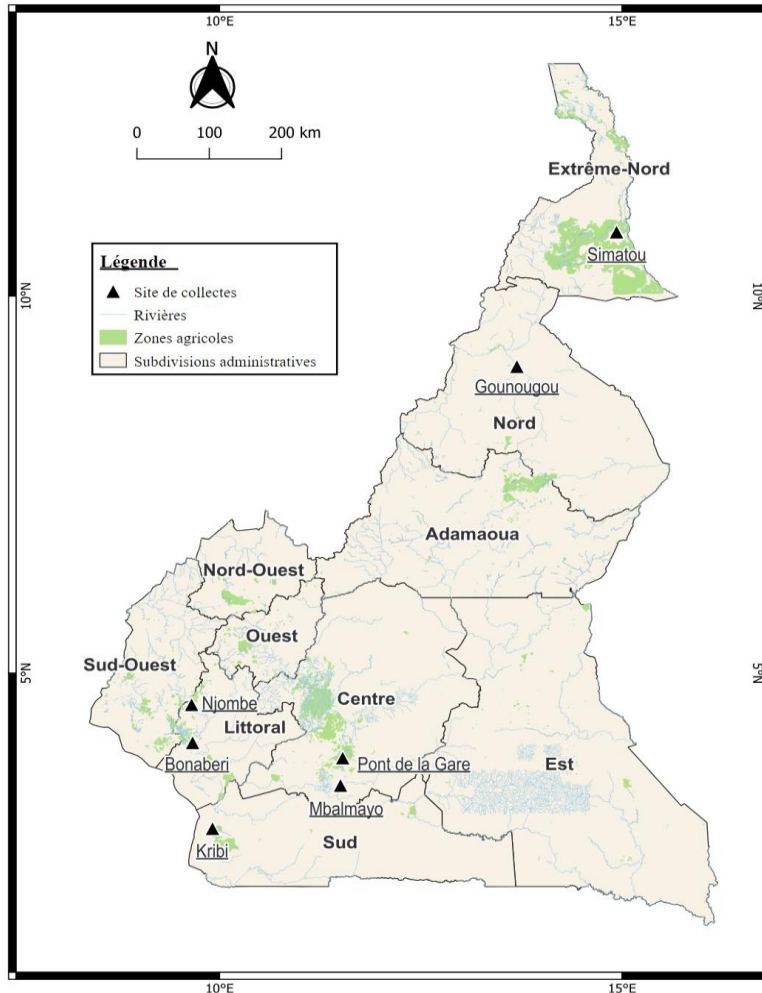
## II.1. Description des sites d'étude

Cette étude a été réalisée dans cinq régions du Cameroun, chacune présentant des caractéristiques géographiques, climatiques, végétales et socio-économiques distinctes :

- **Extrême-nord (Simatou : 10°50' 30" Nord, 14°57' 10" Est) :** Simatou, située dans la région de l'Extrême-nord du Cameroun, dans le département du Mayo-Danay et la commune de Maga, partage ses frontières avec six régions du Tchad et deux États du Nigéria. Son climat soudano-sahélien se caractérise par une saison sèche de sept mois et une saison pluvieuse de cinq mois, avec des températures oscillantes entre 25 °C et 45 °C. La végétation y est étroitement liée au climat et au régime des précipitations, avec des steppes à épineux qui apparaissent dès la plaine de Maroua. Plus au nord, on trouve les prairies périodiquement inondées du Yaéré. La région est dominée par les Monts Mandara à l'ouest et les plaines d'inondation du Logone à l'est, faisant partie du bassin endoréique du lac Tchad. Les principales activités humaines incluent l'agriculture, la pêche et le commerce, avec des limites naturelles définies par le fleuve Chari et le Logone (Sighomnou, 2004; Suchel, 1987).
- **Nord (Gounougou : 9°25' 30" Nord, 13°23' 12" Est) :** Gounougou se trouve dans la région du Nord du Cameroun, dans le département de la Bénoué et la commune de Lagdo. Cette localité bénéficie d'un climat tropical avec des saisons sèches et pluvieuses d'une durée de six mois chacune. La végétation y est similaire à celle de l'Extrême-Nord. La région est principalement connue pour ses activités agricoles, notamment la culture de céréales telles que le mil et le sorgho. En plus de l'agriculture, la pêche et l'élevage jouent un rôle important dans l'économie locale (Sighomnou, 2004; Suchel, 1987).
- **Littoral (Bonabéri : 4°4' 56" Nord, 9°39' 54" Est et Njombe 4°35' 12" Nord, 9°39' 11" Est) :** Bonabéri et Njombe sont deux localités situées dans la région du Littoral au Cameroun. Bonabéri se trouve près de Douala dans le département du Wouri, tandis que Njombe est situé dans le département du Moungo. Le climat y est équatorial et tropical de transition, marqué par des saisons sèches et pluvieuses. La végétation se compose de trois strates incluant la mangrove et la forêt littorale. Bonabéri est un quartier dynamique abritant un important port maritime ainsi que diverses activités commerciales telles que le commerce, la pêche et l'industrie. En revanche, Njombe se

concentre sur l'agriculture, l'élevage, le commerce et l'artisanat comme principales activités économiques (Sighomnou, 2004; Suchel, 1987).

- **Centre (Mbalmayo 3°30' 55" Nord, 11°30' 11" Est et Yaoundé [Pont de la Gare] 3°52' 46" Nord, 11° 31' 48" Est) :** Mbalmayo et Yaoundé (Pont de la Gare) sont situés dans la région du Centre du Cameroun, respectivement dans le département du Nyong-et-So'o et du Mfoundi. Le climat y est équatorial et tropical de transition, avec des saisons sèches et pluvieuses. La végétation dense comprend une forêt tropicale variée. Mbalmayo sert de chef-lieu administratif et commercial où l'agriculture, le commerce, l'industrie et les services publics sont essentiels. Le Pont de la Gare est un quartier animé à proximité du Carrefour Elig-Essono et d'Etoa-Meki, où les activités commerciales, de transport et de services contribuent à une économie locale dynamique (Sighomnou, 2004; Suchel, 1987).
- **Sud (Kribi 2°56' 36" ; 9°54' 46" Est) :** Kribi est une station balnéaire et portuaire située dans la région du Sud du Cameroun, bordant le Golfe de Guinée. Réputée pour ses plages de sable blanc, elle abrite un nouveau complexe portuaire en eaux profondes qui est l'un des plus importants du pays depuis 2014. Le climat équatorial côtier favorise une végétation dense composée notamment de forêts humides incluant des mangroves. Les activités économiques clés comprennent la pêche, le tourisme, l'industrie portuaire et le commerce, attirant ainsi un grand nombre de visiteurs grâce à sa beauté naturelle et à ses infrastructures modernes (Sighomnou, 2004; Suchel, 1987).



**Figure 7 : Sites d'étude d'*A. coluzzii***

(Source : Institut national de cartographie - Cameroun, 2019 modifié.)

## II.2. Matériel et méthodes

### II.2.1. Origine des moustiques collectés

Les échantillons utilisés dans cette étude proviennent de la bio-banque du « Centre for Research in Infectious Diseases » (CRID). Ces échantillons ont été collectés selon différents protocoles, détaillés ci-dessous :

- **Capture des moustiques adultes femelles :**

La technique de capture sur appât humain (HLC) est une méthode de collecte d'anophèles où des volontaires humains, servant d'appâts, s'assoient à l'intérieur et/ou à l'extérieur d'un site sélectionné pour aspirer les moustiques se posant sur leurs membres exposés tout au long de la nuit. Parallèlement, des pièges lumineux standard des Centers for Disease Control (CDC-LT) sont

placés à des emplacements stratégiques pour capturer mécaniquement les moustiques. Après identification morphologique, ces derniers étaient transférés dans les tubes Eppendorf 1,5mL contenant un dessiccateur (*Silica gel*) avant d'être transportés au laboratoire (Kilama *et al.*, 2014).

- **Capture des larves :**

La collecte des larves de moustiques se fait par la méthode du Dipping.

**Principe :** le Dipping consiste à plonger, en plusieurs endroits du gîte larvaire, un récipient de capacité connue dans le but de recueillir des larves de moustiques.

**Mode opératoire :** il se déroule comme suit :

1. Rassembler tout le matériel nécessaire : louche, flacon de collecte, pipette et stylo marqueur.
2. Une fois un habitat potentiel identifié :
  - a. Approcher lentement l'eau en faisant des pas légers pour éviter de perturber l'eau ou la végétation.
  - b. S'approcher de l'eau face au soleil pour éviter de projeter une ombre sur celle-ci.
  - c. En cas de vent fort, plonger du côté exposé au vent, où les larves et nymphes sont le plus concentrées.
  - d. Observer les larves et nymphes avant de commencer la collecte.
3. Introduire les larves dans la tête de la louche à l'aide d'une cuillère.
  - a. Plusieurs techniques peuvent être employées avec la louche ; une méthode efficace consiste à faire glisser la tête inclinée à 45 degrés et immergée d'environ 3 cm dans l'eau en ligne droite vers les larves.
  - b. Le nombre de plongées est souvent standardisé à dix par station d'échantillonnage.
  - c. Attendre au moins deux minutes entre chaque immersion pour permettre aux larves de refaire surface.
4. Compter le nombre de larves dans chaque cuvette et enregistrer les données, même en l'absence de larves ou nymphes.
  - a. Vider l'eau loin de l'habitat aquatique pour éviter toute perturbation supplémentaire.

5. Transférer les échantillons collectés dans un flacon à l'aide d'une pipette, en veillant à ne pas surcharger chaque flacon ; utiliser au moins 2mL de liquide par larve (par exemple, un flacon de 50mL peut contenir 40mL d'eau et jusqu'à 20 larves).
6. Pour le transport des larves, il est possible de les conserver dans une partie de l'eau de leur habitat d'origine. Pendant le transport, il est conseillé de les garder au frais et d'utiliser une glacière pour les protéger.
7. Les larves peuvent être euthanasiées avec de l'eau chaude provenant d'une bouilloire ou en les plaçant dans un flacon contenant de l'éthanol à plus de 70 %. Les échantillons peuvent être conservés dans de l'éthanol à 70 % sur une période prolongée ; il est crucial de ne pas diluer l'éthanol en dessous de ce seuil afin d'éviter la décomposition des moustiques, ce qui compromettrait leur identification ou leur utilité pour des analyses ultérieures.
8. Étiqueter clairement tous les flacons d'échantillons (Tanya L Russell, 2022).

### **II.2.2. Identification moléculaire des moustiques du genre *Anopheles gambiae* s.l.**

La présente étude a impliqué l'identification moléculaire des moustiques par extraction et amplification de l'ADN des échantillons collectés, selon les protocoles suivants :

#### **• Extraction de l'ADN selon le protocole de Livak 1984 :**

Le tampon de Livak pour 100mL est composé de : 1,6mL de NaCl 5M ; 5,48g de sucrose ; 1,57g de Tris ; 10,16mL de EDTA 0,5M et de 2,5mL de SDS 20%.

#### **– Principe et Mode opératoire de l'extraction d'ADN :**

- 1 **Lyse mécanique et chimique des cellules** : Après avoir chauffé au préalable le tampon Livak dans un bain-marie à 65°C, un transfert de 100µL du tampon ont été effectués dans un tube Eppendorf de 1,5mL étiqueté contenant un moustique entier. Après broyage de l'échantillon à l'aide d'un pilon stérile et d'un broyeur à moteur, l'échantillon a été incubé à 65°C pendant 30minutes afin de dénaturer les protéines, extraire l'ADN des cellules, d'augmenter la vitesse des réactions chimiques, inactiver les inhibiteurs des réactions enzymatiques.
- 2 **Précipitation des protéines** : Une micro-centrifugation rapide (10 à 15secondes) a permis de condenser le broyat. Ensuite, 14µL d'acétate de potassium 8M ont été ajoutés

à chaque échantillon pour précipiter le dodécyl sulfate de sodium (SDS) et les protéines liées au SDS, facilitant ainsi leur élimination de l'ADN. Les échantillons ont ensuite été mélangés à l'aide d'un vortex et incubés sur glace pendant 30 minutes.

- 3 **Centrifugation** : Les échantillons ont été centrifugés à 13 500tr/min pendant 20minutes à 4°C pour séparer les débris cellulaires et les protéines dénaturées de l'ADN. Le surnageant contenant l'ADN soluble a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5mL étiqueté.
- 4 **Précipitation de l'ADN** : À ce surnageant, 200µL d'éthanol absolu ont été ajoutés pour éliminer la couche de solvation entourant l'ADN, permettant ainsi à celui-ci de précipiter sous forme de granules visibles (précipité blanc). L'échantillon a été homogénéisé à l'aide d'un vortex puis centrifugé à 13 500tr/min pendant 15minutes à 4°C pour séparer les acides nucléiques des impuretés.
- 5 **Lavage du culot** : Après élimination du surnageant contenant les impuretés, le culot a été lavé avec 100µL d'éthanol à 70% glacé pour extraire l'eau des molécules d'ADN et permettre aux sels de se dissoudre tout en minimisant la solubilité de l'ADN. Le culot a ensuite été laissé sécher sur la pailleuse pendant plus d'une heure afin d'évaporer l'alcool et l'eau résiduels.
- 6 **Resolution de l'ADN** : L'ADN précipité a été résolu par ajout de 100µL d'eau moléculaire (Sigma Water) dans chaque tube, suivi d'une incubation à 65°C pendant 10minutes. L'extrait d'ADN obtenu a été homogénéisé avec un vortex et sa concentration mesurée à l'aide d'un bioanalyseur (Nanodrop, NanoPhotometer N50). Les échantillons ont ensuite été conservés à -20 °C pour des analyses futures.

• **Réaction en chaîne par polymérase (PCR) selon le protocole de SINE 200 PCR :**

– **Principe de la PCR :**

La PCR (réaction en chaîne par polymérase) est une technique enzymatique qui permet d'amplifier spécifiquement des séquences d'ADN in vitro par hybridation d'un brin d'ADN dénaturé à l'amorce correspondant permettant la synthèse de son brin complémentaire en présence d'une enzyme de polymérisation et des nucléotides libres et cela de façon répétée plusieurs fois.

Elle se déroule en trois étapes principales :

- **Dénaturation** : À une température de 94-98°C pendant 20-30 secondes, les brins d'ADN se séparent.
- **Hybridation** : À une température variante entre 50-70°C, les amorces se fixent aux simples brins d'ADN.
- **Élongation** : La Taq polymérase synthétise un brin complémentaire à partir des amorces et des oligonucléotides présents dans le milieu de réaction, complétant ainsi le cycle d'amplification.

Les SINEs (Short INterspersed Elements) sont des marqueurs génétiques co-dominants et sans homoplasie, essentiels pour étudier la génétique des populations et la spéciation chez *A. gambiae* s.l. La SINE 200, un élément répétitif d'environ 200 pb présent en plus de 3 000 copies dans le génome, permet d'analyser le polymorphisme d'insertion dans les « îlots de spéciation » entre les formes M et S. L'étude du génome des espèces *Anopheles gambiae* révèle une région IGS conservée commune et des zones non codantes variables et polymorphiques spécifiques à chaque espèce.



**Figure 8** : Organisation générale des gènes des ADNr chez les Eucaryotes

(Source : [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/2021-08/010019591.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/2021-08/010019591.pdf))

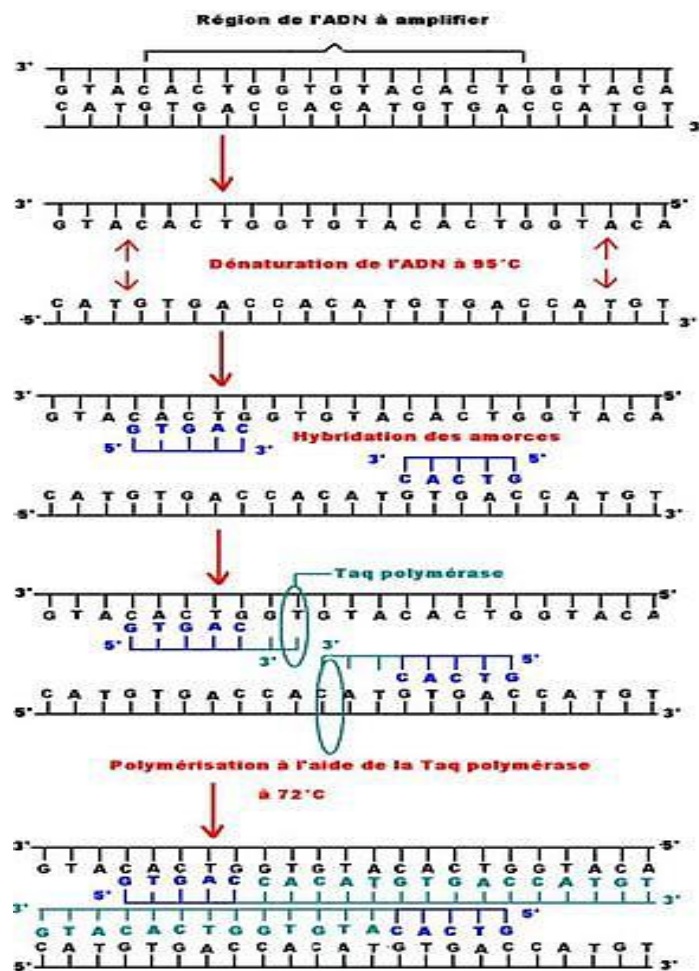
– **Mode opératoire SINE200 PCR :**

La SINE200 PCR a été effectuée sur des extraits d'ADN en utilisant deux amorces de 20 nucléotides. Une amorce universelle cible un site conservé commun à toutes les espèces, tandis que l'autre est spécifique, s'hybridant avec des régions non codantes polymorphiques. Permettant ainsi de distinguer *Anopheles gambiae* sensu stricto "GA", *Anopheles arabiensis* "AR", *Anopheles melas* "ML" et *Anopheles merus* "MR" au niveau de l'IGS polymorphique.

Les extraits d'ADN ont été amplifiés par PCR en utilisant l'amorce sens (SINE\_F) : 5'-TCGCCTTAGACCTTGCGTTA-3' et l'amorce antisens (SINE\_R) : 5'-

CGCTTCAAGAATTCGAGATAC-3'. La réaction PCR a également inclus une polymérase BenTaq contenant des nucléotides libres (dNTPs), un activateur d'enzyme MgCl<sub>2</sub> et de l'eau moléculaire dans un thermocycleur (GeneTouch Bioer). Le volume total de la réaction était de 10µL : composé de 3.32µL ddH<sub>2</sub>O (*Sigma Water*), de 0,34µL des amorces (sens et antisens) et 5µL de BenTaq et 1µL d'ADN extrait.

Les conditions de PCR comprenaient une dénaturation initiale de 5minutes à 95°C, suivie par 35cycles d'amplification (dénaturation : 30secondes à 95°C ; hybridation : 30secondes à 54°C ; extension : une minute à 72°C), puis une extension finale de 10minutes à 72°C (Santolamazza *et al.*, 2008).



**Figure 9** : Schéma des différentes réactions biochimiques d'un cycle d'amplification de PCR (Source : <https://pedagogie.ac-toulouse.fr/svt/1ere-es-la-pcr-ressource-scientifique-florence-bolognesi>)

- **Révélation de l'ADN :**

- **Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous un champ électrique. Les molécules plus petites migrent plus rapidement et plus loin que celles plus grandes au travers du gel.

- **Mode opératoire de l'électrophorèse sur gel d'agarose :**

Pour visualiser la migration des amplicons, une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% a été réalisée. Le gel a été préparé en dissolvant 2g d'agarose dans 100mL de tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) à concentration 1X, puis porté à ébullition au micro-ondes pendant environ 2 minutes. Après refroidissement, 1µL de Midori Green (Bulldog Bio Inc., Hampshire UK), un agent intercalant permettant la visualisation d'acide nucléique, a été ajouté avant le coulage de gel dans un moule avec des peignes pour former des puits. Une fois le gel solidifié, il a été placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE à concentration 1X. Trois microlitres de produit d'amplifié mélangés avec 1µL de tampon de charge (composé : de bleu bromophénol ; de xylène cyanol ; EDTA pH 7,6 et de glycérol) qui permet d'une part de densifier les amplicons en entrainant au fond des puits et d'autre part de suivre la migration, ont été déposés dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire (100bp ou Ladder IV) a également été ajouté pour estimer la taille des bandes. L'électrophorèse s'est déroulée à une tension de 90 volts et un courant de 300mA pendant environ 45 minutes. À la fin du processus, les produits de PCR ont été visualisés sous lumière ultraviolette grâce au système Enduro TM GDS G-Box pour détecter les différentes bandes correspondant aux fragments d'ADN séparés par taille (Sambrook & Russell, 2001).

### **II.2.3. Génotypage des nouvelles mutations V402L(T) et I1527T selon le protocole de LNA**

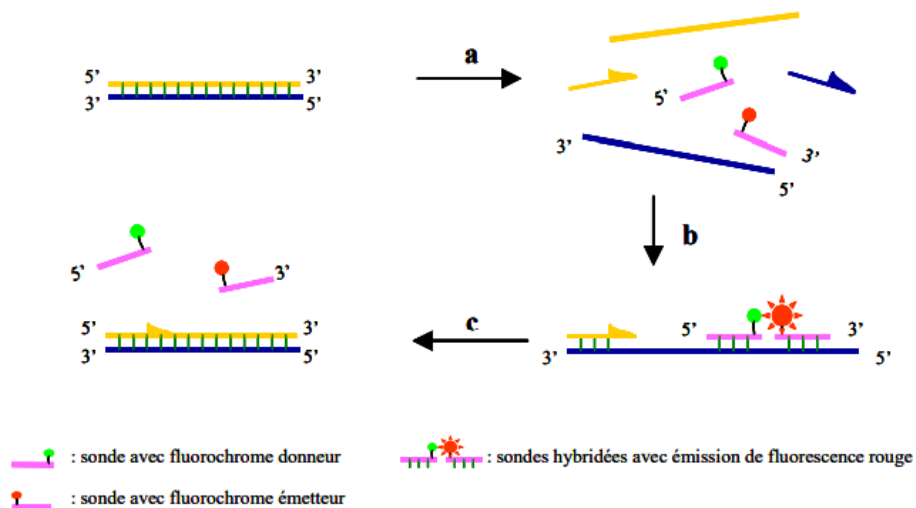
#### **PCR chez *Anopheles coluzzii***

Les acides nucléiques verrouillés (LNA), également appelés acides nucléiques pontés (BNA), sont des nucléotides d'ARN modifié où le ribose est lié par un pont supplémentaire entre l'oxygène en position 2' et le carbone en position 4'. Ce pont "verrouille" le ribose dans une conformation optimale pour la liaison Watson-Crick 3'-endo, similaire à celle observée dans les duplex d'ADN, ce qui confère une stabilité accrue contre la dégradation enzymatique. La température de fusion ( $T_m$ ) des duplex augmente de 2 à 8 °C pour chaque monomère d'ADN incorporé. Les oligonucléotides LNA maintiennent une  $T_m$  élevée même lorsqu'ils sont plus courts que les oligonucléotides d'ADN ou d'ARN, les rendant particulièrement efficaces pour détecter et

différencier des cibles d'ADN ou d'ARN de petite taille ou très similaires. La sensibilité et la spécificité des oligonucléotides peuvent être optimisées en ajustant la proportion de LNA dans un mélange avec de l'ADN ou de l'ARN. L'intégration de LNA dans les oligonucléotides améliore les performances dans diverses technologies basées sur l'hybridation, telles que la PCR, l'hybridation in situ (ISH) et les puces à ADN, augmentant ainsi leur efficacité dans les applications de recherche en génétique et en biologie (Petersen & Wengel, 2003).

– **Principe de PCR en temps réel :**

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter / émetteur » fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template).



**Figure 10 :** Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

(Source : Poitras E. & Houde A., 2002)

– **Mode opératoire de LNA PCR :**

La conception de tests de diagnostic basés sur LNA pour les mutations VGSC V402L et I1527T a été réalisée conformément aux méthodes de Jessica Williams et al. (2022). Des amorces spécifiques ont été générées avec sur Python pour amplifier une région couvrant chaque mutation,

tandis que des sondes ont été conçues avec le logiciel IDT Biophysics par la société Integrated DNA Technologies (IDT) afin de distinguer les allèles résistants 402L et 1527T des allèles sensibles V402 et I1527. Les réactions PCR ont été réalisées avec un mélange de 5µL de Luna Universal qPCR Master Mix 1X, 0,1µL de sondes à 10µM, 0,2µL d'amorces à 10µM, 3,3/3,4µL d'eau distillée et 1µL d'extrait d'ADN, totalisant un volume final de 10µL. Les tests ont été effectués dans un thermocycleur (Stratagene MXPro-MX30005P) avec les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 10minutes, suivie de 40cycles à 95°C pendant 10secondes et à 60°C pendant 45secondes. Cette approche a permis une détection précise des mutations associées à la résistance aux insecticides dans les populations de moustiques d'*A. coluzzii*.

**Tableau I** : Amorces et sondes utilisées dans les diagnostics moléculaires LNA

| Noms de l'amorce                  | 5'-<br>Modification<br>de la<br>fluorescence | Séquence                                 | 3'-<br>Modification<br>du quencher |
|-----------------------------------|--|--|------------------------------------|
| <b>V402L – Amorces et Sondes</b>  |  |  |                                    |
| Sens : 402-F                      |  | 5'-GTGTTACGATCAGCTGGACCG-3'              |                                    |
| Antisens : 402-R                  |  | 5'-CCGAAGTGCTTCTTCCTCGG-3'               |                                    |
| V402 sauvage<br>Val - sonde       | HEX  | 5'- TT + A + C + AA+G + GTAAAA+CGA-3'    | IBFQ                               |
| 402L(T)<br>Mutant Leu -<br>sonde  | FAM  | 5'- AATT+A + A + AA+G + GTAAAA+C + GA-3' | IBFQ                               |
| 402L(C)<br>Mutant Leu -<br>sonde  | CY5  | 5'-TT + A + G + AA+G + GTAAAA+CG-3'      | IBFQ                               |
| <b>I1527T – Amorces et Sondes</b> |  |  |                                    |
| Sens : 1527-F                     |  | 5'-GTCGGTAAACAGCCTATACGGG-3'             |                                    |
| Antisens :<br>1527-R              |  | 5'-TTCTAGCGATCCACCAGC-3'                 |                                    |
| I1527 sauvage<br>Iso - sonde      | HEX  | 5'-ACC + CAAA+GA + T + A + A + TAAAG-3'  | IBFQ                               |
| 1527T Mutant<br>Thr - sonde       | FAM  | 5'-C + CA AA+G A + T + A + G + TA AAG-3' | IBFQ                               |

#### **II.2.4. Exploitation et analyses des données**

La recherche des mutations V402L (C/T) et I1527T sur le gène VGSC chez *A. coluzzii* a été réalisée par PCR avec des oligonucléotides à hybridation spécifique (LNA PCR) à l'aide du logiciel MxPro-MX3005P (Agilent®). Cette méthode a permis de distinguer les allèles 402L et 1527T, associés à la résistance, des allèles V402 et I1527, sensibles.

Les tableaux et graphiques ont été organisés et générés à l'aide des logiciels Excel 2013 et GraphPad Prism version 8. Pour évaluer la signification statistique des différences entre les groupes, nous avons utilisé le test des cotes (Odd ratio) ainsi que le test exact de Fisher, tous deux réalisés avec le logiciel GraphPad Prism version 8. Les valeurs de probabilité P inférieures à 0,05 étaient considérées statistiquement significative.

|  |  |  |
|--|--|--|
|  | <b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> |  |
|--|--|--|

### III.1. Résultats

#### III.1.1. Échantillonnage des moustiques de la Bio-banque

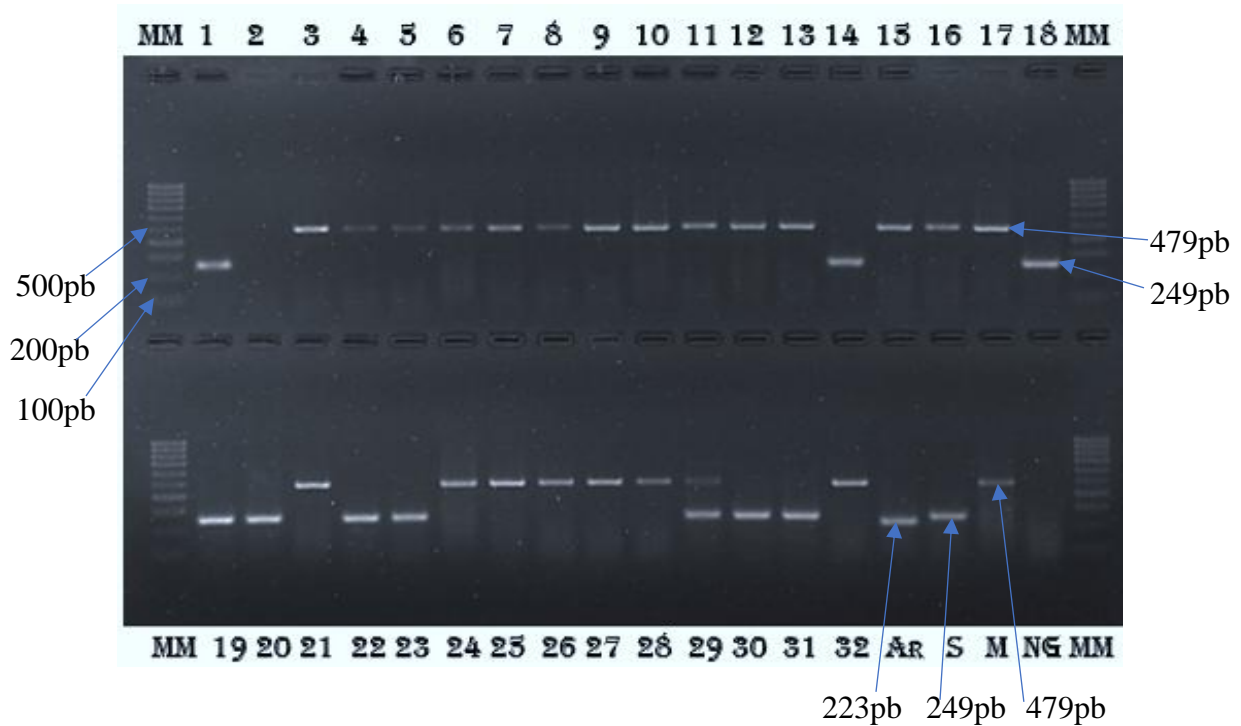
Aux total 982 moustiques ont été collectés dans la bio-banque du CRID. Ces échantillons proviennent de 7 localités situées dans 5 régions du Cameroun, à savoir : Simatou dans l'Extrême-nord, Gounougou dans le Nord, Njombé et Bonaberi dans le Littoral, Mbalmayo et Pont de la Gare dans le Centre, ainsi que Kribi dans le Sud du Cameroun. Le tableau représente la répartition de ces échantillons en fonction des années et le profil de sensibilité aux pyréthriinoïdes pour Pont de la Gare 2020 - 2021 (Tene-Fossog *et al.*, 2022).

**Tableau II** : Récapitulatif des échantillons collectés dans la Bio-banque et taux de mortalité aux Pyréthriinoïdes

| Région       | Localité de collection | Année de collection | Nombre total d'échantillons collectés | Mortalité par exposition à la Deltaméthrine 1X (en %) | Mortalité par exposition à la Permethrine 1X (en %) | Mortalité par exposition à la Permethrine 5X (en %) |
|--------------|------------------------|---------------------|---------------------------------------|---|---|---|
| Extrême-nord | Simatou                | 2018-2019           | 80                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              |                        | 2020                | 92                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              |                        | 2022                | 92                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
| Nord         | Gounougou              | 2018-2019           | 56                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              |                        | 2020                | 90                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              |                        | 2022                | 86                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
| Littoral     | Njombé                 | 2022                | 60                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              | Bonaberi               | 2018-2019           | 60                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              |                        | 2020                | 60                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              |                        | 2022                | 60                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
| Centre       | Mbalmayo               | 2022                | 46                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
|              | Pont de la Gare        | 2020 - 2021         | 34                                    | <b>20.41%</b>   | //  | //  |
|              |                        |                     | 34                                    | //  | <b>8.87%</b>  | //  |
|              |                        |                     | 26                                    | //  | //  | <b>68%</b>  |
| 2022         | 46                     | Pas exposés         | Pas exposés                           | Pas exposés   |   |   |
| Sud          | Kribi                  | 2022                | 60                                    | Pas exposés   | Pas exposés   | Pas exposés   |
| Total        |                        |                     | 982                                   | //  | //  | //  |

### III.1.2. Identification moléculaire des moustiques de l'espèce *Anopheles coluzzii* dans les populations étudiées

L'identification moléculaire par SINE PCR a confirmé *A. coluzzii* parmi les échantillons d'*A. gambiae* s.l. pour le génotypage des mutations cibles. (Figure 8).



**Figure 11** : Photographie de l'électrophorégramme montrant l'identification moléculaire d'*A. gambiae* s.l.

**Légende** : MM : marqueur de poids moléculaire ("Ladder 100bp", il est composé de 11 Fragments d'ADN (pb) respectivement à : 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 et 1500),

Les échantillons 1 ;14 ; 18 ; 19 ; 20 ; 22 ; 23 ;30 et 31 ont une bande à la taille de 249bp et correspondent à *A. gambiae* s.s,

Les échantillons 3 à13 ; 15 à 17 ; 21 ; 24 à 28 et 32 ont une bande à la taille de 479bp et correspondent à *A. coluzzii*,

L'échantillon 2 n'a aucune bande dont pas d'amplification d'ADN lors de la PCR,

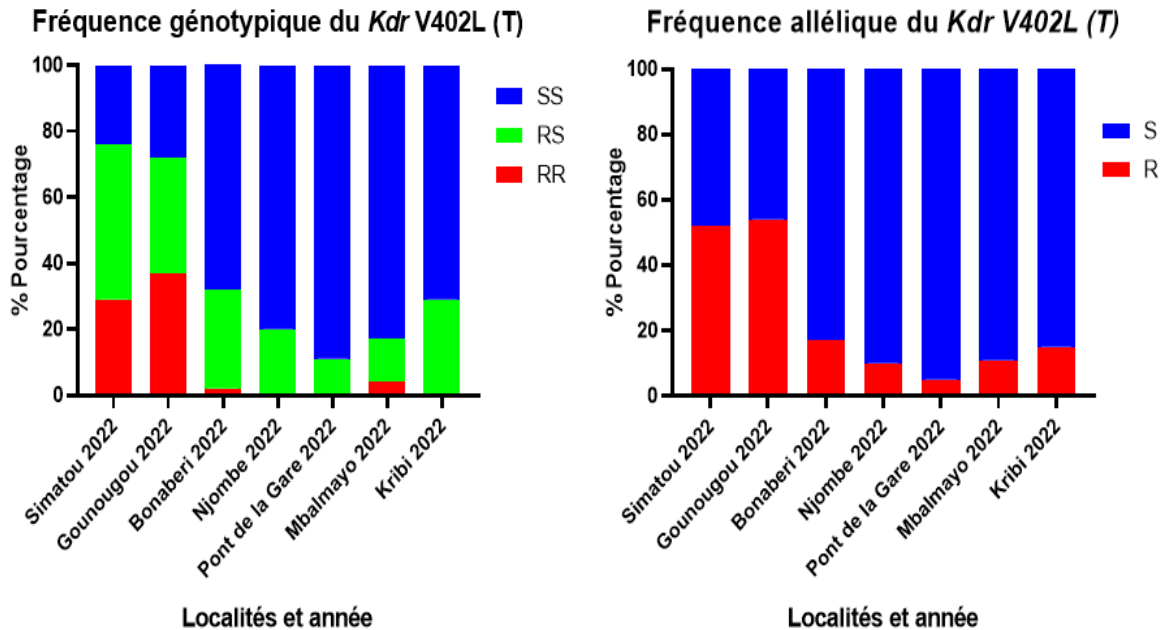
L'échantillon 29 a deux bandes aux tailles 249bp et 479bp et correspond à une espèce hybride (a la fois *A. coluzzii* et *A. gambiae* s.s.),

Les contrôles AR : arabiensis (223bp) ; S : *A. gambiae* s.s (249bp) ; M : *A. coluzzii* (479bp) et NG : contrôle négatif.

### III.1.3. Distribution spatiale des mutations V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans les populations *Anopheles coluzzii* au Cameroun

#### III.1.3.1. Mutation V402L (T) sur le gène VGSC

L'analyse de la distribution spatiale du marqueur V402L (T) révèle la présence des génotypes RR, RS et SS dans les localités étudiées. Le génotype homozygote mutant (RR) est dominant à Gounougou (41%) et Simatou (31%), mais rare à Bonabéri (2%) et Mbalmayo (4%). En revanche, le génotype homozygote sauvage (SS) est très fréquent à Pont de la Gare (89%), suivi de Mbalmayo et Njombe, tous deux à 83%. Enfin, le génotype hétérozygote (RS) présente des fréquences variables dans les différentes localités. L'allèle mutant (R) est observé dans toutes les localités, avec une dominance à Simatou (52%) et Gounougou (54%). À l'inverse, l'allèle sauvage (S) est plus fréquent à Pont de la Gare (95%), Njombe (90%) et Mbalmayo (89%), indiquant une distribution génotypique variée parmi les échantillons analysés (Figure 9).



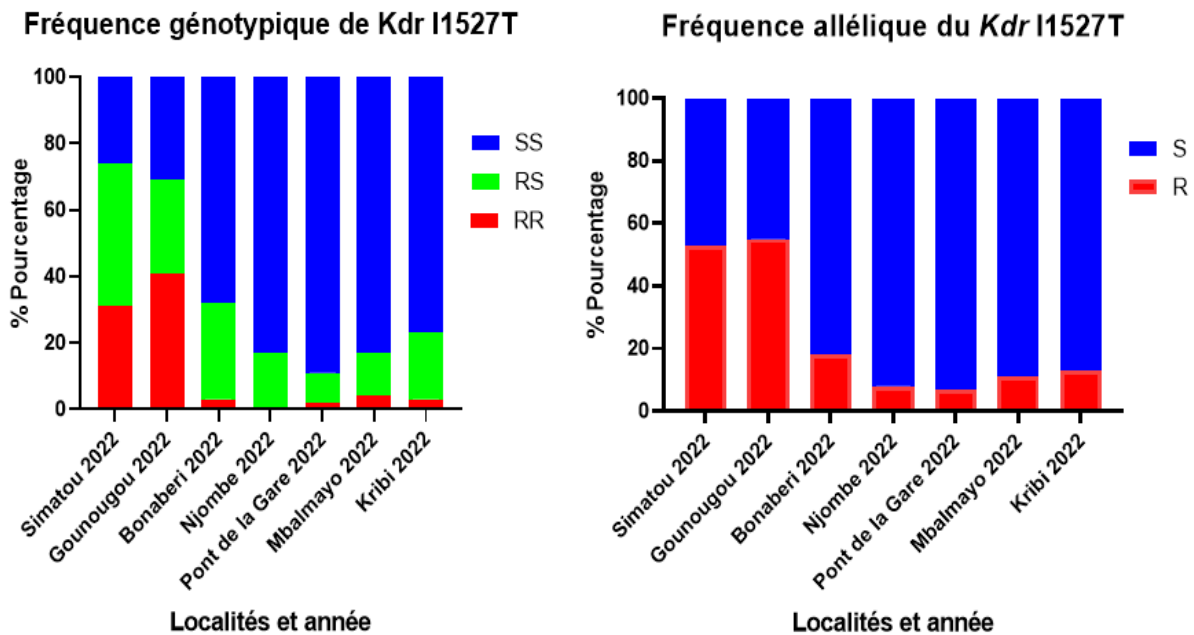
**Figure 12 :** Fréquence génomique et allélique spatiale de la mutation V402L (T).

**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

### III.1.3.2. Mutation I1527T sur le gène VGSC

L'analyse de la distribution spatiale du marqueur I1527T révèle la présence des génotypes RR, RS et SS dans les localités étudiées. Le génotype homozygote mutant (RR) est particulièrement fréquent à Gounougou (41%) et Simatou (31%), bien qu'il soit également présent à Bonabéri et Mbalmayo à des fréquences très faibles. En revanche, le génotype homozygote sauvage (SS) est dominant à Pont de la Gare (89%), suivi de Mbalmayo et Njombe (83% chacun). Le génotype hétérozygote (RS) présente des fréquences variables. Les allèles R et S sont observés dans toutes les localités, avec une dominance de l'allèle mutant (R) à Simatou (53%) et Gounougou (55%). À l'inverse, l'allèle sauvage (S) est plus présent à Pont de la Gare (93%), Njombe (92%) et Mbalmayo (89%), indiquant une distribution génotypique variée parmi les échantillons analysés (Figure 10).



**Figure 13 :** Fréquence génomique et allélique spatiale de la mutation I1527T.

**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

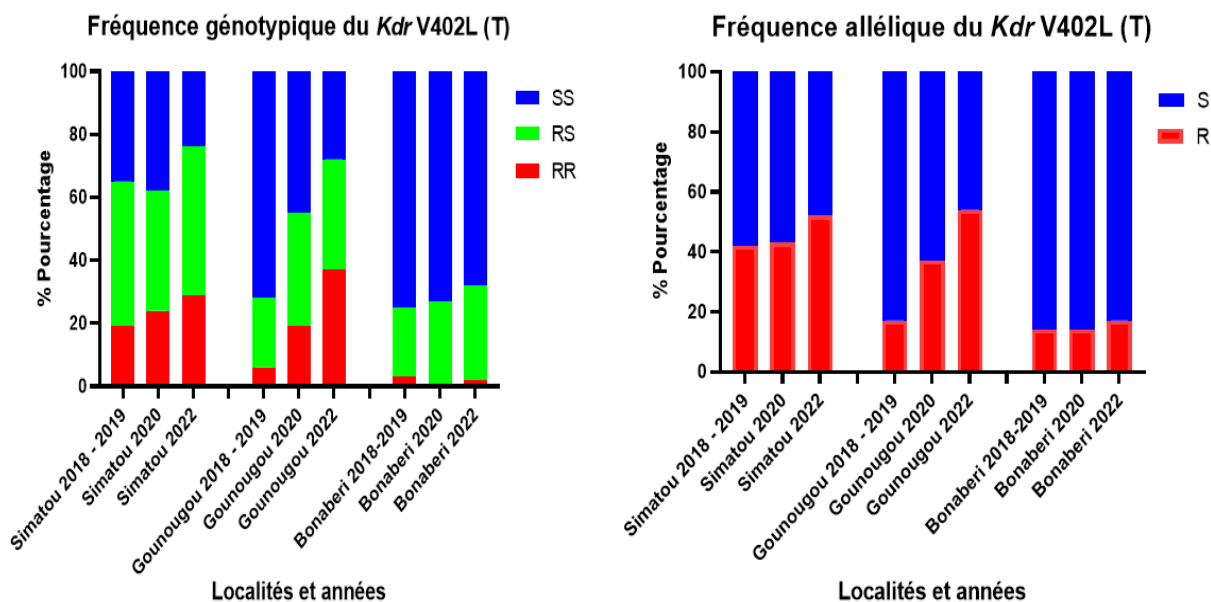
S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

### **III.1.4. Distribution spatio-temporelle des mutation V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans les populations *Anopheles coluzzii* au Cameroun**

#### **III.1.4.1. Mutation V402L (T) sur le gène VGSC**

L'analyse de la distribution spatio-temporelle du marqueur V402L (T) révèle la présence des génotypes RR, RS et SS à Simatou, Gounougou et Bonaberi depuis 2018. À Simatou, le génotype homozygote mutant (RR) montre une augmentation non significative, passant de 19 % à 24 %, puis à 29 %, avec une valeur de p de 0,2945. En revanche, à Gounougou, une augmentation significative est observée, avec des fréquences de 6 %, 19 % et 37 % respectivement, et une valeur de p inférieure à 0,0001 entre 2018 et 2022. À Bonaberi, le génotype homozygote mutant reste quant à lui stable.

Concernant l'allèle mutant (R), il est également détecté dans ces localités avec des fréquences croissantes non significatives à Simatou (42 %, 43 %, 52 %), la valeur de p de 0,2945 et des augmentations significatives à Gounougou (17 %, 37 %, 54 %), la valeur de p étant inférieure à 0,0001. À Bonaberi, aucune variation n'est notée. Ces résultats mettent en lumière des tendances évolutives notables en matière de résistance génétique, ainsi que des variations significatives dans la distribution des génotypes et des allèles au sein des populations étudiées (Figure 11). Ces observations soulignent l'importance d'une surveillance continue des génotypes et allèles afin de mieux comprendre les dynamiques de résistance au sein des populations d'*A. coluzzii*. L'augmentation significative du génotype homozygote mutant à Gounougou pourrait indiquer une pression sélective accrue due à l'utilisation d'insecticides ou d'autres facteurs environnementaux. En revanche, la stabilité de ce génotype à Bonaberi suggère une possible saturation ou un équilibre dans la dynamique de résistance qui mérite d'être exploré davantage.



**Figure 14 :** Fréquence génomique et allélique spatio-temporelle de la mutation V402L (T).

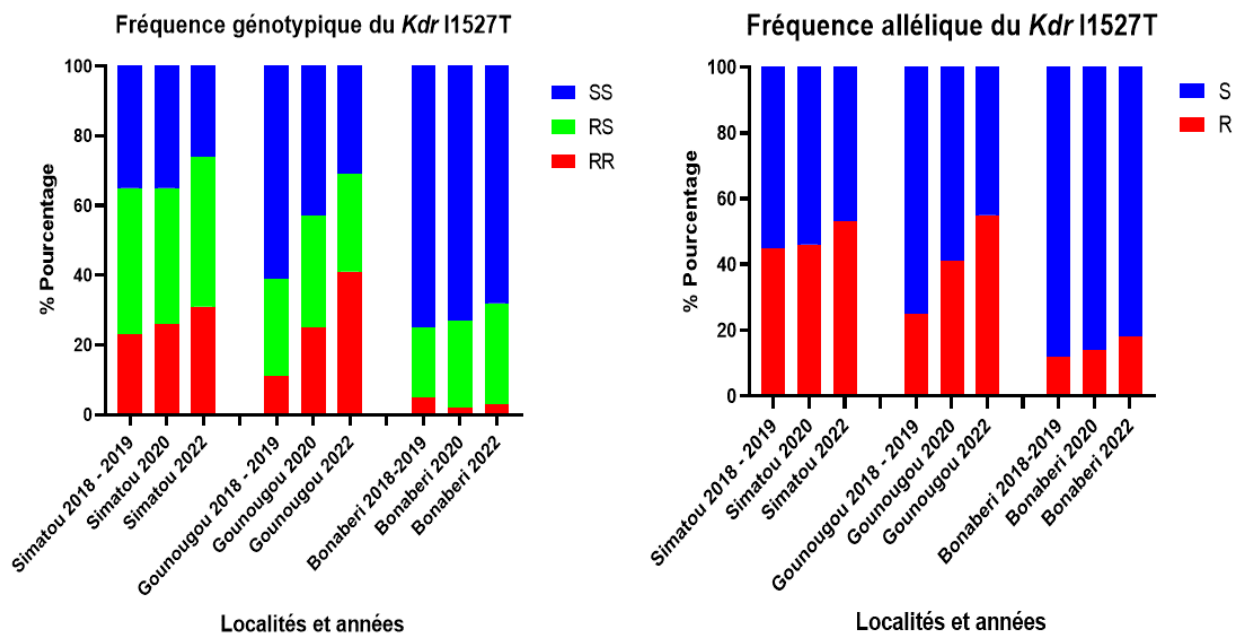
**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

### III.1.4.2. Mutation I1527T sur le gène VGSC

Tout comme l'analyse de la mutation VGSC V402L (T), l'analyse de la distribution spatio-temporelle du marqueur I1527T met en exergue la présence des génotypes RR, RS et SS à Simatou, Gounougou et Bonabéri depuis 2018. À Simatou, le génotype homozygote mutant (RR) présente une augmentation non significative ( $P = 0,4672$ ) avec des fréquences respectives de 23 %, 26 % et 31 % entre 2018 et 2022. En revanche, à Gounougou, cette augmentation est significative ( $P < 0,0001$ ), passant de 11 % en 2018 à 25 % en 2020, puis à 41 % en 2022. À Bonabéri, le génotype homozygote mutant demeure relativement constant au cours de la période d'étude.

Concernant l'allèle mutant (R), sa présence a également été observée dans ces localités depuis 2018, avec une augmentation progressive non significative ( $P = 0,4671$ ) à Simatou (45 %, 46 %, 53 %) et une augmentation significative à Gounougou (25 %, 41 %, 55 %) ( $P < 0,0001$ ). À Bonabéri, aucune variation notable n'a été enregistrée pour cet allèle durant la même période. Ces résultats mettent en évidence des variations significatives dans la distribution des génotypes et des allèles au fil des ans, comme illustré dans la Figure 12.



**Figure 15 :** Fréquence génomique et allélique spatio-temporelle de la mutation I1527T.

**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

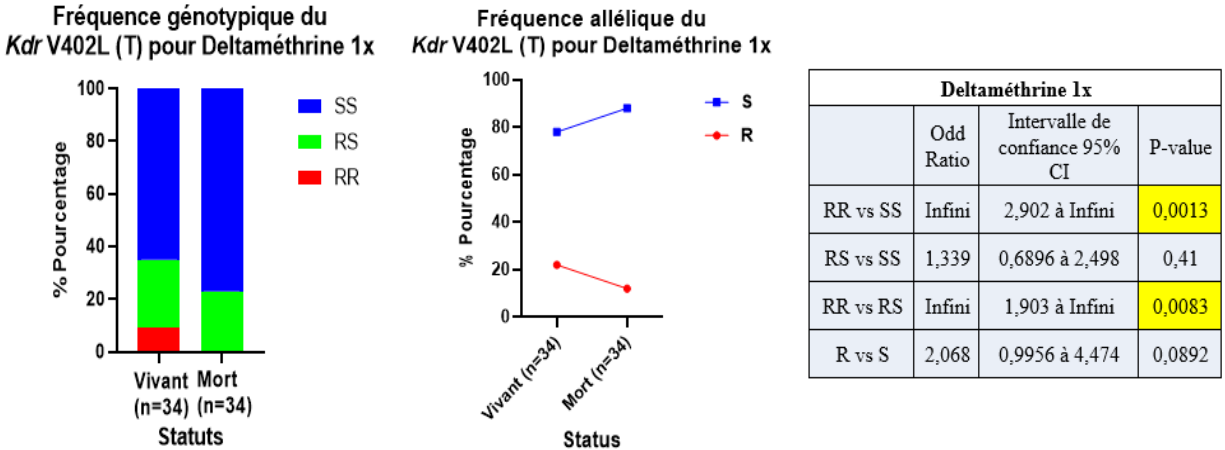
S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

### III.1.5. Implication des nouvelles mutations V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthrinoïdes chez *Anopheles coluzzii* au Cameroun

#### III.1.5.1. Implication de la mutation V402L (T) sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthrinoïdes

L'analyse des fréquences génomiques et alléliques met en évidence une association forte entre la présence de l'allèle mutant (R) et la résistance à la Deltaméthrine 1X, avec un Odds Ratio de 2,068 pour R par rapport à S. Dans cette population d'anophèles, l'allèle mutant était présent chez 22 % des moustiques survivants au test de sensibilité à la Deltaméthrine 1X, contre seulement 12 % chez ceux qui ont succombé, ce qui représente une différence de 10 %. De plus, l'analyse génomique révèle que l'homozygote mutant (RR) est fortement associé à la survie des moustiques face à la Deltaméthrine 1X. En effet, les Odds Ratios pour les comparaisons RR vs SS et RR vs RS sont infinis, indiquant une absence totale de moustiques sensibles dans le groupe homozygote résistant. Les valeurs P associées à ces comparaisons sont significatives, s'élevant respectivement

à 0,0013 et 0,0083 (Figure 13). Ces résultats soulignent le rôle crucial de la mutation V402L (T) dans le développement de la résistance aux pyréthriinoïdes chez *A. coluzzii*.



**Figure 16 :** Fréquence génomique et allélique de la mutation V402L(T) et association avec le phénotype de résistance à la Deltaméthrine 1X.

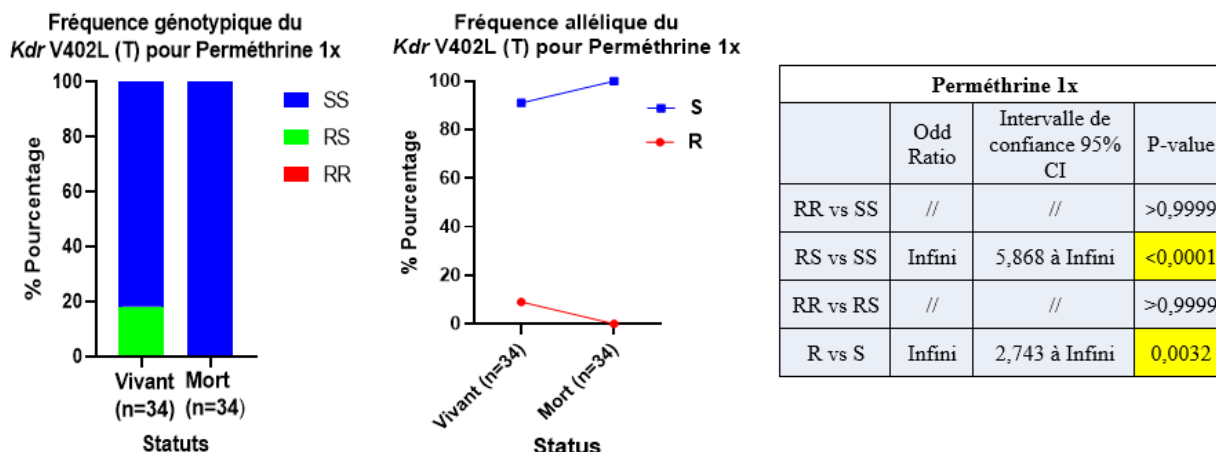
**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

Odd Ration (Rapport de cote) : mesure de l'association entre une exposition et un résultat,

P-value : probabilité d'obtenir des résultats d'essai au moins aussi extrême que les résultats réellement observés.

La distribution des fréquences génotypiques et alléliques révèle une association significative entre la présence de l'allèle mutant R et la résistance à la Perméthrine 1X, avec un Odd Ratio infini et une valeur de P significative de 0,0032 pour la comparaison R vs S. Dans cette population d'anophèles, l'allèle mutant R n'était détecté que chez les moustiques ayant survécu au test de sensibilité à la Perméthrine 1X à 9%. L'analyse génotypique indique que l'hétérozygote (RS) est fortement associé à la survie de ces moustiques face à la Perméthrine 1X, affichant un Odd Ratio infini pour RS vs SS et une valeur de probabilité très significative ( $P < 0,0001$ ) (Figure 14). Ces résultats suggèrent que la présence de l'allèle mutant R et le génotype hétérozygote RS pourraient jouer un rôle crucial dans la résistance aux insecticides dans cette population.



**Figure 17** : Fréquence génomique et allélique de la mutation V402L(T) et association avec le phénotype de résistance à la Perméthrine 1X.

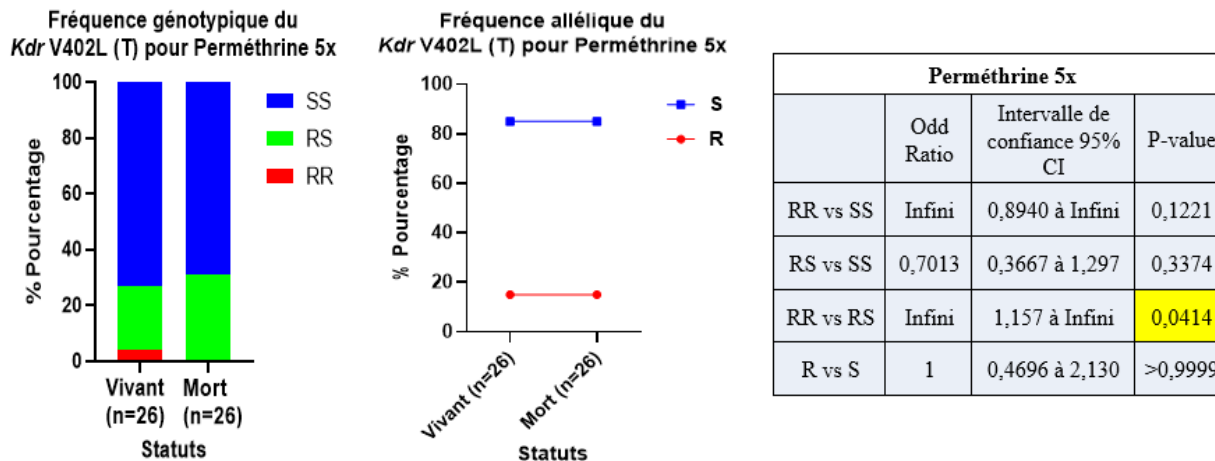
**Légende** : SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

Odd Ration (Rapport de cote) : mesure de l'association entre une exposition et un résultat,

P-value : probabilité d'obtenir des résultats d'essai au moins aussi extrême que les résultats réellement observés.

La distribution des fréquences génotypiques et alléliques révèle une proportion équivalente de l'allèle mutant R, qui s'élève à 15 % tant chez les moustiques survivants que chez ceux décédés lors du test de sensibilité à la perméthrine 5X. L'analyse génotypique met en évidence que l'homozygote mutant RR est significativement associé à la survie des moustiques exposés à la perméthrine 5X. En effet, un Odd Ratio infini a été observé pour le génotype homozygote RR par rapport au génotype hétérozygote RS, accompagné d'une valeur p significative de 0,0414 (Figure 15). Ces résultats suggèrent que la présence de l'allèle mutant R confère un avantage sélectif aux moustiques homozygotes mutants, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle la résistance à la perméthrine est un facteur déterminant dans la survie des populations de moustiques face aux insecticides.



**Figure 18 :** Fréquence génomique et allélique de la mutation V402L (T) et association avec le phénotype de résistance à la Perméthrine 5X.

**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

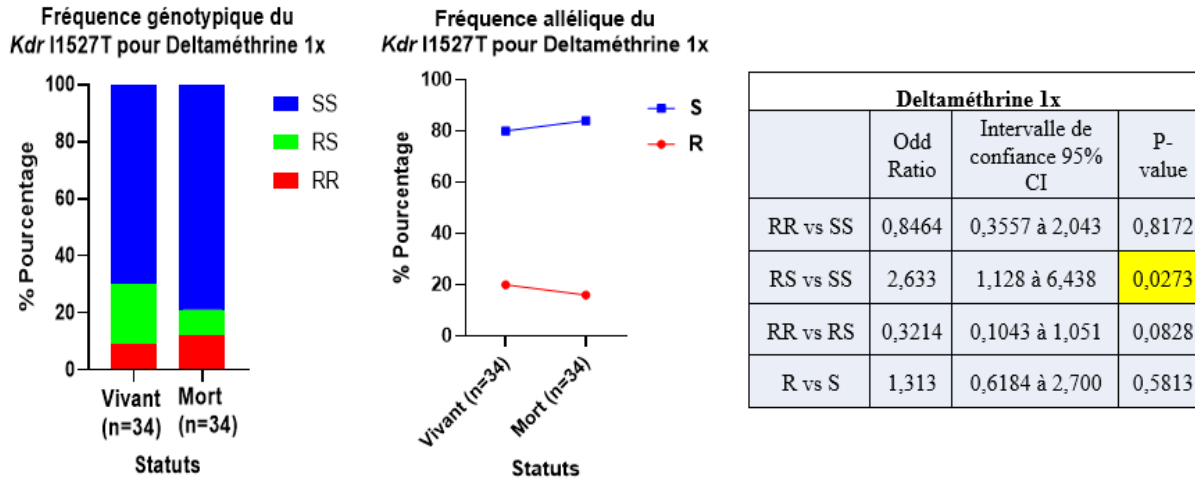
S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

Odd Ratio (Rapport de cote) : mesure de l'association entre une exposition et un résultat,

P-value : probabilité d'obtenir des résultats d'essai au moins aussi extrême que les résultats réellement observés.

### III.1.5.2. Implication de la mutation I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux pyréthrinoïdes

La distribution des fréquences génotypiques et alléliques révèle une association forte entre la présence de l'allèle mutant (R) et la résistance à la Deltaméthrine 1X, avec un Odd Ratio de 1,313 pour l'allèle mutant par rapport à l'allèle sauvage (S). Dans cette population d'Anopheles, l'allèle mutant était présent chez 20 % des moustiques survivants au test de sensibilité à la Deltaméthrine 1X, contre 16 % chez ceux qui ont succombé au traitement, ce qui représente une différence de 4 %. L'analyse génotypique met en évidence que l'hétérozygote RS est associé à une meilleure survie des moustiques face à la Deltaméthrine 1X, avec un Odd Ratio de 2,633 pour les génotypes hétérozygote RS par rapport aux génotypes homozygote sauvage SS. De plus, cette association est statistiquement significative, comme en témoigne une valeur de p de 0,0273 (Figure 16). Ces résultats suggèrent que la présence de l'allèle mutant R et le génotype hétérozygote RS pourraient jouer un rôle crucial dans la résistance des moustiques à la Deltaméthrine 1X.



**Figure 19 :** Fréquence génomique et allélique de la mutation I1527T et association avec le phénotype de résistance à la Deltaméthrine 1X.

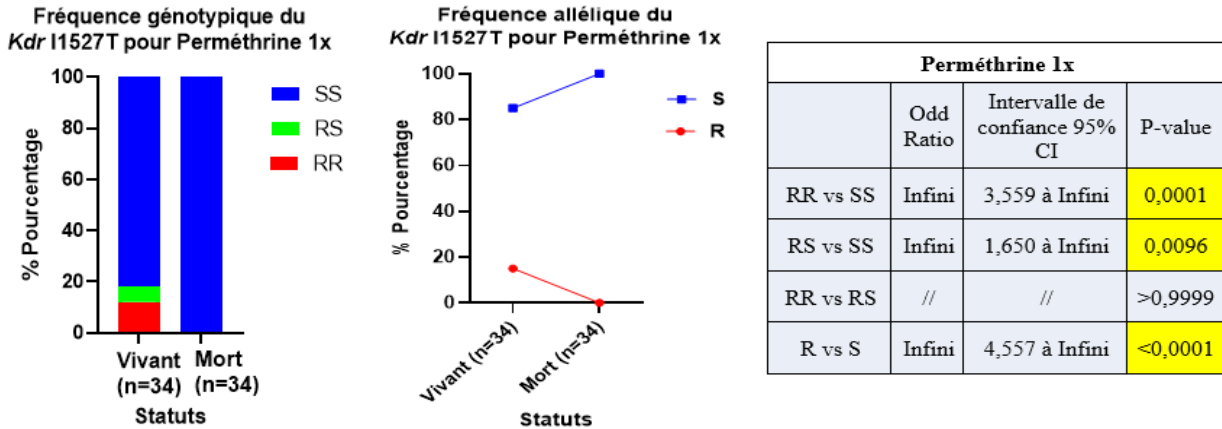
**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

Odd Ratio (Rapport de cote) : mesure de l'association entre une exposition et un résultat,

P-value : probabilité d'obtenir des résultats d'essai au moins aussi extrême que les résultats réellement observés.

La distribution des fréquences génomiques et alléliques révèle une association significative entre la présence de l'allèle mutant (R) et la résistance à la perméthrine 1X, avec un Odd Ratio infini pour la comparaison R vs S et une valeur de p inférieure à 0,0001. Dans cette population d'anophèles, l'allèle mutant n'était présent que chez les moustiques ayant survécu au test de sensibilité à la perméthrine 1X, représentant 15 % des individus testés. L'analyse génomique montre que les homozygotes mutants (RR) et les hétérozygotes (RS) sont fortement associés à la survie des moustiques face à la perméthrine 1X. En effet, les Odd Ratios infinis pour les comparaisons RR vs SS et RS vs SS, accompagnés de valeurs de p significatives de 0,0001 et 0,0096 respectivement (voir figure 17), soulignent l'importance de ces génotypes dans le mécanisme de résistance. Ces résultats suggèrent que la présence de l'allèle mutant (R) confère un avantage sélectif aux moustiques exposés à la perméthrine, ce qui pourrait avoir des implications cruciales pour les stratégies de lutte contre le paludisme.



**Figure 20 :** Fréquence génomique et allélique de la mutation I1527T et association avec le phénotype de résistance à la Perméthrine 1X.

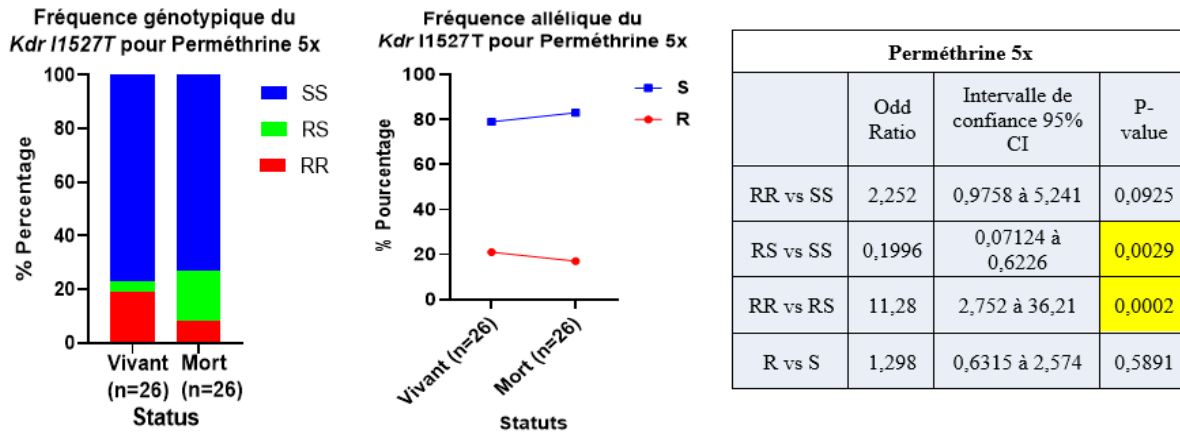
**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

Odd Ration (Rapport de cote) : mesure de l'association entre une exposition et un résultat,

P-value : probabilité d'obtenir des résultats d'essai au moins aussi extrême que les résultats réellement observés.

La distribution des fréquences génotypiques et alléliques révèle une association forte entre la présence de l'allèle mutant (R) et la résistance à la perméthrine 5X, avec un Odd Ratio de 1,298 pour l'allèle mutant par rapport à l'allèle sauvage (S). Dans cette population d'anophèles, l'allèle mutant était présent chez 21 % des moustiques survivants au test de sensibilité à la perméthrine 5X, contre 17 % chez ceux qui sont morts, ce qui représente une différence de 4 %. L'analyse génotypique montre que les homozygotes mutants (RR) et les hétérozygotes (RS) sont associés à une survie accrue de ces moustiques face à la perméthrine 5X. Les Odd Ratios observés pour les comparaisons RS vs SS et RR vs RS sont respectivement de 0,1996 et 11,28, avec des valeurs P significatives de 0,0029 et 0,0002 (Figure 18). Ces résultats suggèrent que la présence de l'allèle mutant (R) joue un rôle crucial dans la résistance des moustiques à la perméthrine.



**Figure 21 :** Fréquence génomique et allélique de la mutation I1527T et association avec le phénotype de résistance à la Perméthrine 5X.

**Légende :** SS : génotype homozygote sauvage ; RS : génotype hétérozygote ; RR : génotype homozygote mutant,

S : allèle sauvage ; R : allèle mutant.

Odd Ration (Rapport de cote) : mesure de l'association entre une exposition et un résultat,

P-value : probabilité d'obtenir des résultats d'essai au moins aussi extrême que les résultats réellement observés.

### III.2. Discussion

La résistance aux pyréthriinoïdes représente un obstacle majeur pour les programmes de lutte contre le paludisme, car ils dépendent largement de l'utilisation de cette classe d'insecticide. Parmi les différents mécanismes de résistances aux insecticides, celles liées à la modification du site cible sont les plus étudiées à l'instar de la mutations L995F/S du gène VGSC (mutation la plus étudiée et la mieux caractérisée de ce gène) (J. Hemingway *et al.*, 2004). Cependant, en amont de cette mutation, d'autres mutations toutes aussi importantes tel que la mutation V402L et I1527T semblent se développer indépendamment de L995F/S. La compréhension de l'impact de ces mécanismes moléculaires devient cruciale pour une réussite des actions de lutte antivectorielle. Cette dans cette optique que ce travail vise à évaluer l'implication des mutations V402L(T) et I1527T dans la résistance aux pyréthriinoïdes chez *A. coluzzii*.

Sur les 982 moustiques de la bio-banque du CRID, une reclassification a permis d'identifier des *Anopheles coluzzii* au sein des échantillons initialement identifiés comme *Anopheles gambiae* s.l. Cela a permis d'étudier la distribution des mutations de résistance aux pyréthriinoïdes Kdr

V402L(T) et Kdr I15247T chez *A. coluzzii* au Cameroun. Nos résultats indiquent la présence de ces mutations dans toutes les régions étudiées en 2022, avec des fréquences qui sont plus élevées dans le Nord (Gounougou) avec chacun des marqueurs respectif 41% et 41% d'homozygotes mutants (RR) et 54% et 55% d'allèles mutants (R). En seconde position nous avons la région de l'Extrême-Nord (Simatou) avec 31% et 31% d'homozygotes mutants et 52% et 53% d'allèles mutants pour chacun. La fréquence de ces mutations allait décroissante à mesure qu'on s'approchait du grand Sud Cameroun à savoir (Centre-Sud-Littoral). Cette distribution a été corrélée à la dominance d'*A. coluzzii* dans ces zones, et favorisée par certains facteurs environnementaux tels que la végétation et le climat et aussi son caractère ubiquiste tel que décrit par plusieurs auteurs (Christophe Antonio-Nkondjio *et al.*, 2019 ; Atangana, Fomena, Tamesse, & Fondjo, 2012 ; Tene-Fossog *et al.*, 2022 ; Vectorlink, 2022). En outre, il convient de souligner que l'utilisation intensive des pyréthrinoïdes dans les années 2010 a exercé une forte pression de sélection sur les populations de moustiques. En effet, en 2012, plus de la moitié des ménages africains disposaient de moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII) à base de pyréthrinoïdes, et près des deux tiers des programmes de lutte antivectorielle (PID) utilisaient ces insecticides (Janet Hemingway *et al.*, 2016), Parallèlement, l'emploi de pyréthrinoïdes en agriculture, notamment dans les cultures de coton, a contribué à accroître l'exposition des populations de moustiques à ces insecticides (Reid & McKenzie, 2016). Les différences dans l'application des interventions à base de pyréthrinoïdes d'une région à l'autre pourraient expliquer la variabilité observée dans la fréquence des mutations de résistance. Des facteurs tels que l'intensité de la couverture des programmes de lutte antivectorielle, la durée de l'utilisation des pyréthrinoïdes, et la présence concomitante d'autres insecticides pourraient avoir influencé l'émergence et la diffusion de ces mutations (Chris S Clarkson *et al.*, 2020).

L'analyse spatio-temporelle des fréquences alléliques des mutations Kdr V402L(T) et I1527T chez *Anopheles coluzzii* au Cameroun révèle une dynamique évolutive contrastée selon les régions. À Simatou, les augmentations des fréquences des génotypes mutants (RR) et des allèles résistants (R) entre 2018 et 2022, bien que présentes, ne sont pas statistiquement significatives ( $p > 0,05$ ). En revanche, à Gounougou, ces augmentations sont significatives ( $p < 0,0001$ ), ceci pour les deux mutations, témoignant d'une pression de sélection plus intense favorisant les allèles de résistance dans cette région. Ces résultats sont en accord avec les études menées dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest tel que le Ghana et la Côte d'Ivoire, où des variations temporelles et spatiales

des fréquences alléliques des mutations Kdr ont été observées, suggérant des pressions de sélection hétérogènes exercées sur les populations de moustiques. Ces variations pourraient être liées à des différences dans l'intensité et la durée des campagnes de lutte antivectorielle, ainsi qu'à des facteurs environnementaux locaux (Chris S Clarkson *et al.*, 2020 ; C. S. Clarkson *et al.*, 2021 ; Longo-Pendy *et al.*, 2021 ; Perugini *et al.*, 2024). La co-occurrence des mutations Kdr I1527T et V402L suggère une sélection positive simultanée de ces deux allèles, formant ainsi un haplotype avantageux conférant une résistance accrue aux pyréthriinoïdes. Cette association étroite, observée sans différences significatives dans l'homozygotie des haplotypes, indique que ces deux mutations ont probablement été sélectionnées de manière conjointe sous la pression des pyréthriinoïdes, qui ont dominé les stratégies de lutte antivectorielle pendant plusieurs décennies. Bien que le DDT ait également été utilisé, l'intensité et la durée de l'utilisation des pyréthriinoïdes rendent ces derniers plus probables comme principal moteur de la sélection de ces mutations (C. S. Clarkson *et al.*, 2021). Des études génomiques plus approfondies, combinées à une analyse fine des historiques d'utilisation des insecticides, seraient nécessaires pour préciser la chronologie de ces événements de sélection et mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette résistance multiple.

Les résultats de cette étude montrent une forte association entre la mutation du Kdr V402L(T) et la résistance à la Deltaméthrine 1X, avec un Odds Ratio de 2,068. L'homozygote résistant (RR) montre une survie accrue face à cet insecticide, avec des Odds Ratios infinis et les valeurs significatives de p de 0,0013 et 0,0083 pour les comparaisons RR vs SS et RR vs RS. De même, l'allèle R est associé à la résistance à la Perméthrine 1X, affichant également des Odds Ratios infinis et une valeur de p significative de 0,0032 pour de R vs S. L'hétérozygote (RS) montre une forte survie face à la Perméthrine 1X, avec un Odds Ratio infini pour RS vs SS et une valeur significative de p inférieur à 0,0001. En outre, l'homozygote RR est significativement lié à la survie des moustiques exposés à la perméthrine 5X, avec un Odds Ratio infini pour RR vs RS et  $p = 0,0414$ . Ces résultats suggèrent que l'haplotype 402L(T) confère un avantage sélectif aux moustiques face aux pyréthriinoïdes (type I, Perméthrine et type II, Deltaméthrine), renforçant l'hypothèse que la résistance à la perméthrine est cruciale pour leur survie. Des études antérieures ont identifié le site de liaison aux pyréthriinoïdes dans le domaine transmembranaire des canaux sodiques (DIIS4-S5 et les hélices IIS5, IIS6 et IIS6), où des substitutions comme L995F et L995S modifient allostériquement le site de liaison (site se trouvant sur l'hélice IIS6). La position du résidu V402

est similaire à celle de ces substitutions (position vers le milieu de l'hélice IS6), indiquant qu'elles pourraient contribuer à la résistance en altérant la formation du site de liaison aux pyréthriinoïdes (Fisher, Dressel, Silva, & Scott, 2023 ; Goindin *et al.*, 2017 ; O'Reilly *et al.*, 2006). Par ailleurs, les substitutions au codon 402 ont été trouvées dans plusieurs espèces d'insectes et suffisent à elles seules à conférer une résistance aux pyréthriinoïdes (Dong *et al.*, 2014 ; Haddi *et al.*, 2017 ; Rinkevich, Du, & Dong, 2013).

L'analyse des fréquences génotypiques et alléliques du Kdr I1527T montre que l'hétérozygote RS a une meilleure survie face à la Deltaméthrine 1X, affichant un Odds Ratio de 2,633 et une valeur p significative de 0,0273. Une association forte est observée entre l'allèle R et la résistance à la Perméthrine 1X, avec un Odds Ratio infini et une valeur p inférieure à 0,0001. L'homozygote mutant (RR) et l'hétérozygote (RS) sont fortement associés à la survie des moustiques exposés à la Perméthrine 1X, avec des Odds Ratios infinis pour les comparaisons RR vs SS et RS vs SS, et des valeurs p significatives de 0,0001 et 0,0096 respectivement. De plus, Les génotypes RR et RS montrent également une survie accrue face à la Perméthrine 5X, avec des Odds Ratios respectifs de 0,1996 et 11,28 pour les comparaisons RS vs SS et RR vs RS, accompagnés de valeurs p significatives de 0,0029 et 0,0002. Ces résultats corroborent des études antérieures montrant que la substitution I1527T chez les moustiques *A. coluzzii* au Burkina Faso se situe dans le segment IIIS6 du canal sodique. Cette substitution est proche de résidus sensibles aux pyréthriinoïdes dans le site de liaison. Des substitutions similaires ont été identifiées dans d'autres espèces comme *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, où elles sont liées à la résistance aux pyréthriinoïdes. L'allèle I1527T est étroitement associé à deux autres allèles causant une substitution V402L. La co-occurrence d'I1527T et V402L suggère une sélection positive dans certaines populations. L'importance de ces mutations souligne la nécessité d'une surveillance continue pour gérer efficacement la résistance aux insecticides dans les populations de moustiques (Dong *et al.*, 2014 ; Ishak, Jaal, Ranson, & Wondji, 2015 ; Y. Li *et al.*, 2018 ; Xu *et al.*, 2016). L'allèle 1527T a été en liaison étroite avec deux allèles causant une substitution V402L (*M. domestica* V410L) : le fait que nous trouvions I1527T et V402L dans une association mutuelle aussi étroite est intrigant car l'haplotype portant V402L seul devrait également avoir été sélectionnés positivement et donc être présents dans une ou plusieurs populations (C. S. Clarkson *et al.*, 2021).

Notre étude enrichit les outils pour détecter la résistance Knock down (Kd) chez le vecteur du paludisme *A. coluzzii*, soulignant le rôle des mutations VGSC dans la résistance aux pyréthrinoïdes. Nous avons observé une augmentation évolutive de la fréquence des haplotypes 402L(T), 1527T dans le Nord et l'Extrême-nord du Cameroun. La surveillance de ces haplotypes et des études supplémentaires sur sa résistance sont essentielles pour comprendre les mécanismes évolutifs et optimiser les stratégies de contrôle des vecteurs. De plus, nos résultats mettent en lumière l'émergence de nouvelles mutations sur le gène VGSC, au-delà des mutations Kdr classiques L995F et L995S.

|  |  |  |
|--|--|--|
|  | <p><b>CONCLUSION PERSPECTIVES ET<br/>RECOMMANDATIONS</b></p> |  |
|--|--|--|

Cette étude a évalué le rôle des mutations V402L (T) et I1527T sur le gène VGSC dans la résistance aux Pyréthriinoïdes chez *Anopheles coluzzii* au Cameroun. Elle fournit une boîte à outils enrichie pour cribler la résistance Knock down (Kd) chez *A. coluzzii*, espèce vectrice du paludisme et démontre le rôle des mutations VGSC supplémentaires dans la résistance aux pyréthriinoïdes. Nous avons montré que :

- l'espèce prédominante a été *A. coluzzii* et les mutations étudiées sont présentes dans toutes les localités en 2022, avec une domination de l'allèle mutante dans l'Extrême-Nord et le Nord.
- Ces mutations sont présentes depuis 2018-2019 et la fréquence des allèles mutants a augmenté avec le temps, suggérant une sélection de ces marqueurs.
- les mutations V402L (T) et I1527T confèrent la résistance aux pyréthriinoïdes chez *A. coluzzii* au Cameroun et ces mutations semblent évoluer ensemble.

Les recherches futures viseront à évaluer le rôle de ces mutations dans la résistance aux pyréthriinoïdes dans les régions où l'allèle mutant prédomine, ainsi qu'à comparer leur fréquence avec d'anciennes mutations connues comme L995F/S.

Cette étude souligne la nécessité de surveiller la résistance aux insecticides pour adapter les stratégies de lutte contre le paludisme au Cameroun et en Afrique. Les programmes de surveillance doivent rester vigilants face à l'émergence de nouveaux marqueurs de résistance afin d'assurer une gestion efficace de la lutte contre le paludisme.

Nous recommandons :

- Aux populations : l'usage généralisé et quotidien de moustiquaires et de répulsifs pour limiter le contact vecteur - Homme.
- Aux chercheurs : surveiller l'évolution de la transmission du paludisme, approfondir les recherches sur la lutte biologique contre les vecteurs, investiguer les mécanismes moléculaires (Génomique et Transcriptomique) de résistance pouvant expliquer la super-résistance et la résistance croisée observées.
- Aux pouvoirs publics : intégrer dans les programmes antivectoriels la distribution de moustiquaires de nouvelle génération, envisager les pulvérisations intra-domiciliaires et spatiales d'insecticides rémanents de nouvelle génération, et éduquer les populations sur le bon usage des moustiquaires.

## REFERENCES

- Abagli, A. Z., Alavo, T. B. C., & Brodeur, J. (2014). Microorganismes entomopathogènes, prédateurs et parasites des moustiques: Perspectives pour la lutte raisonnée contre les vecteurs du paludisme en Afrique sub-saharienne. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(1), 340. doi:10.4314/ijbcs.v8i1.29
- ANOFEL. (2014). <poly-parasitologie.pdf>.
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., & Corbellino, M. (2012). Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 4(1), e2012013. doi:10.4084/MJHID.2012.013
- Antonio-Nkondjio, C., Kerah, C. H., Simard, F., Awono-Ambene, P., Chouaibou, M., Tchuinkam, T., & Fontenille, D. (2006). Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of medical entomology*, 43(6), 1215-1221.
- Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Njiokou, F., Bigoga, J. D., Awono-Ambene, P., Etang, J., . . . Wondji, C. S. (2019). Review of malaria situation in Cameroon: technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & vectors*, 12, 1-23.
- Antonio-Nkondjio, C., Tene Fossog, B., Kopya, E., Poumachu, Y., Menze Djantio, B., Ndo, C., . . . Wondji, C. S. (2015). Rapid evolution of pyrethroid resistance prevalence in *Anopheles gambiae* populations from the cities of Douala and Yaounde (Cameroon). *Malar J*, 14, 155. doi:10.1186/s12936-015-0675-6
- Atangana, J., Fomena, A., Tamesse, J. L., & Fondjo, E. (2012). Pratiques agricoles et épidémiologie du paludisme en zone soudano-sahélienne du Cameroun. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 105(1), 23-29.
- Aubry, P., Gaüzère, D. B.-A., & Vandroux, D. (2019). Orientation diagnostique devant une méningo-encéphalite aiguë infectieuse en zones tropicales. *Médecine tropicale*, 10.
- Awono-Ambene, H. P., Kengne, P., Simard, F., Antonio-Nkondjio, C., & Fontenille, D. (2004). Description and bionomics of *Anopheles (Cellia) ovengensis* (Diptera: Culicidae), a new malaria vector species of the *Anopheles nili* group from south Cameroon. *J Med Entomol*, 41(4), 561-568. doi:10.1603/0022-2585-41.4.561
- Balkew, M., Ibrahim, M., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., Engers, H., Aseffa, A., . . . Elhassen, I. (2010). Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from villages

- in central, northern and south west Ethiopia and detection of kdr mutation. *Parasites & vectors*, 3, 1-6.
- Barron, M. G., Paupy, C., Rahola, N., Akone-Ella, O., Ngangue, M. F., Wilson-Bahun, T. A., . . . Ayala, D. (2019). A new species in the major malaria vector complex sheds light on reticulated species evolution. *Sci Rep*, 9(1), 14753. doi:10.1038/s41598-019-49065-5
- Bawin, T., Seye, F., Boukraa, S., Zimmer, J. Y., Delvigne, F., & Francis, F. (2014). La lutte contre les moustiques (Diptera: Culicidae): diversité des approches et application du contrôle biologique. *The Canadian Entomologist*, 147(4), 476-500. doi:10.4039/tce.2014.56
- Bonning, B. C., Hemingway, J., Romi, R., & Majori, G. (1991). Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. *Bulletin of Entomological research*, 81(1), 5-10.
- Bronner, U., Divis, P. C., Farnert, A., & Singh, B. (2009). Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malar J*, 8, 15. doi:10.1186/1475-2875-8-15
- 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.
- Brooke, B. D., Kloke, G., Hunt, R. H., Koekemoer, L. L., Temu, E. A., Taylor, M. E., . . . Coetzee, M. (2001). Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*, 91(4), 265-272. doi:10.1079/ber2001108
- Carnevale, P., & Mouchet, J. (1990). Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. *Médecine tropicale*, 50(4), 391-398.
- Choi, L., Pryce, J., & Garner, P. (2017). The combination of indoor residual spraying with insecticide-treated nets versus insecticide-treated nets alone for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd012688
- Clarkson, C. S., Miles, A., Harding, N. J., Lucas, E. R., Battey, C. J., Amaya-Romero, J. E., . . . Lawniczak, M. K. (2020). Genome variation and population structure among 1142 mosquitoes of the African malaria vector species *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Genome research*, 30(10), 1533-1546.

- Clarkson, C. S., Miles, A., Harding, N. J., O'Reilly, A. O., Weetman, D., Kwiatkowski, D., . . . Anopheles gambiae Genomes, C. (2021). The genetic architecture of target-site resistance to pyrethroid insecticides in the African malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii*. *Mol Ecol*, *30*(21), 5303-5317. doi:10.1111/mec.15845
- Cohuet, A., Simard, F., Wondji, C. S., Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P., & Fontenille, D. (2004). High malaria transmission intensity due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a village of savannah–forest transition area in Cameroon. *Journal of medical entomology*, *41*(5), 901-905.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0011010
- Davies, T. G., Field, L. M., Usherwood, P. N., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, *59*(3), 151-162. doi:10.1080/15216540701352042
- Djogbenou, L., Labbe, P., Chandre, F., Pasteur, N., & Weill, M. (2009). Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. *Malar J*, *8*, 70. doi:10.1186/1475-2875-8-70
- Djouaka, R. F., Bakare, A. A., Coulibaly, O. N., Akogbeto, M. C., Ranson, H., Hemingway, J., & Strode, C. (2008). Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*, *9*, 538. doi:10.1186/1471-2164-9-538
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., . . . Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol*, *50*, 1-17. doi:10.1016/j.ibmb.2014.03.012
- Du, W., Awolola, T., Howell, P., Koekemoer, L., Brooke, B., Benedict, M., . . . Zheng, L. (2005). Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology*, *14*(2), 179-183.
- Enayati, A., & Hemingway, J. (2010). Malaria management: past, present, and future. *Annual review of entomology*, *55*(1), 569-591.

- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol*, *14*(1), 3-8. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x
- Etang, J., Manga, L., Toto, J.-C., Guillet, P., Fondjo, E., & Chandre, F. (2007). Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon. *Journal of Vector Ecology*, *32*(1), 123-133. doi:10.3376/1081-1710(2007)32[123:somrtd]2.0.co;2
- Etang, J., Mbida Mbida, A., Ntonga Akono, P., Binyang, J., Eboumbou Moukoko, C. E., Lehman, L. G., . . . Mimpfoundi, R. (2016). *Anopheles coluzzii* larval habitat and insecticide resistance in the island area of Manoka, Cameroon. *BMC Infect Dis*, *16*, 217. doi:10.1186/s12879-016-1542-y
- Fadel, A. N., Ibrahim, S. S., Tchouakui, M., Terence, E., Wondji, M. J., Tchoupo, M., . . . Wondji, C. S. (2019). A combination of metabolic resistance and high frequency of the 1014F *kdr* mutation is driving pyrethroid resistance in *Anopheles coluzzii* population from Guinea savanna of Cameroon. *Parasit Vectors*, *12*(1), 263. doi:10.1186/s13071-019-3523-7
- Fisher, C. R., Dressel, A. E., Silva, J. J., & Scott, J. G. (2023). A globally distributed insecticide resistance allele confers a fitness cost in the absence of insecticide in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the Yellow Fever mosquito. *Journal of medical entomology*, *60*(3), 494-499.
- Fontenille, D., & Simard, F. (2004). Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *27*(5), 357-375.
- Fontenille, D., Wanji, S., Djouaka, R., & Awono-Ambene, H. (2000). *Anopheles hancocki*, vector secondaire du paludisme au Cameroun. *Bull Liaison OCEAC*, *33*, 23-26.
- Goindin, D., Delannay, C., Gelasse, A., Ramdini, C., Gaude, T., Faucon, F., . . . Fouque, F. (2017). Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infectious diseases of poverty*, *6*, 1-15.
- Grant, C., Singh, K. S., Hayward, A., Hunt, B. J., Troczka, B. J., Pym, A., . . . Leroux, A. (2023). Overexpression of the UDP-glycosyltransferase UGT34A23 confers resistance to the diamide insecticide chlorantraniliprole in the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *159*, 103983.

- Gueye, O. K., Tchouakui, M., Dia, A. K., Faye, M. B., Ahmed, A. A., Wondji, M. J., . . . Konaté, L. (2020). Insecticide resistance profiling of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* populations in the southern Senegal: role of target sites and metabolic resistance mechanisms. *Genes*, *11*(12), 1403.
- Guillet, P., N'guessan, R., Darriet, F., Traore-Lamizana, M., Chandre, F., & Carnevale, P. (2001). Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one'treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Medical and veterinary entomology*, *15*(1), 105-112.
- Haddi, K., Tome, H. V. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., . . . Oliveira, E. E. (2017). Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Sci Rep*, *7*, 46549. doi:10.1038/srep46549
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, *34*(7), 653-665. doi:10.1016/j.ibmb.2004.03.018
- Hemingway, J., & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, *45*(1), 371-391.
- Hemingway, J., Shretta, R., Wells, T. N., Bell, D., Djimdé, A. A., Achee, N., & Qi, G. (2016). Tools and strategies for malaria control and elimination: what do we need to achieve a grand convergence in malaria? *PLoS biology*, *14*(3), e1002380.
- Hosie, A., Buckingham, S., Presnail, J., & Sattelle, D. (2001). Alternative splicing of a *Drosophila* GABA receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency. *Neuroscience*, *102*(3), 709-714.
- Ibrahim, S. S., Ndula, M., Riveron, J. M., Irving, H., & Wondji, C. S. (2016). The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid cross-resistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Mol Ecol*, *25*(14), 3436-3452. doi:10.1111/mec.13673
- Ishak, I. H., Jaal, Z., Ranson, H., & Wondji, C. S. (2015). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & vectors*, *8*, 1-13.

- Kilama, M., Smith, D. L., Hutchinson, R., Kigozi, R., Yeka, A., Lavoy, G., . . . Drakeley, C. (2014). Estimating the annual entomological inoculation rate for *Plasmodium falciparum* transmitted by *Anopheles gambiae* sl using three sampling methods in three sites in Uganda. *Malaria journal*, *13*, 1-13.
- Lecollinet, S., Fontenille, D., & Failloux, A.-B. (2022). *Le moustique, ennemi public n° 1? :* éditions Quae.
- Lee, S., & Barron, M. G. (2016). A mechanism-based 3D-QSAR approach for classification and prediction of acetylcholinesterase inhibitory potency of organophosphate and carbamate analogs. *J Comput Aided Mol Des*, *30*(4), 347-363. doi:10.1007/s10822-016-9910-7
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol*, *52*, 231-253. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151104
- Li, Y., Xu, J., Zhong, D., Zhang, H., Yang, W., Zhou, G., . . . Cai, S. (2018). Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. *Parasites & vectors*, *11*, 1-10.
- Lofgren, C., Dame, D., Breeland, S., Weidhaas, D. E., Jeffery, G., Kaiser, R., . . . Baldwin, K. (1974). Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. III. Field methods and population control.
- Longo-Pendy, N. M., Tene-Fossog, B., Tawedi, R. E., Akone-Ella, O., Toty, C., Rahola, N., . . . Costantini, C. (2021). Ecological plasticity to ions concentration determines genetic response and dominance of *Anopheles coluzzii* larvae in urban coastal habitats of Central Africa. *Scientific Reports*, *11*(1), 15781.
- Low, V. L., Chen, C. D., Lee, H. L., Tan, T. K., Chen, C. F., Leong, C. S., . . . Sofian-Azirun, M. (2013). Enzymatic characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of Malaysian *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *PLoS One*, *8*(11), e79928. doi:10.1371/journal.pone.0079928
- Malaria, R. B. (2005). World malaria report 2005. *World Health Organization and UNICEF*.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Berge, J. B., Devonshire, A. L., . . . Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* ss. *Insect Molecular Biology*, *7*(2), 179-184.

- Menze, B. D., Riveron, J. M., Ibrahim, S. S., Irving, H., Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P. H., & Wondji, C. S. (2016). Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations. *PLoS One*, *11*(10), e0163261. doi:10.1371/journal.pone.0163261
- Menze, B. D., Wondji, M. J., Tchapgá, W., Tchoupo, M., Riveron, J. M., & Wondji, C. S. (2018). Bionomics and insecticides resistance profiling of malaria vectors at a selected site for experimental hut trials in central Cameroon. *Malar J*, *17*(1), 317. doi:10.1186/s12936-018-2467-2
- Messenger, L. A., Shililu, J., Irish, S. R., Anshebo, G. Y., Tesfaye, A. G., Ye-Ebiyo, Y., . . . Yewhalaw, D. (2017). Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* from Ethiopia (2012-2016): a nationwide study for insecticide resistance monitoring. *Malar J*, *16*(1), 469. doi:10.1186/s12936-017-2115-2
- Molineaux, L., Storey, J., Cohen, J. E., & Thomas, A. (1980). A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different Plasmodium species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg*, *29*(5), 725-737.
- Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012). The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance-A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *107*, 437-449.
- Mouatcho, J., Cornel, A. J., Dahan-Moss, Y., Koekemoer, L. L., Coetzee, M., & Braack, L. (2018). Detection of *Anopheles rivulorum*-like, a member of the *Anopheles funestus* group, in South Africa. *Malar J*, *17*(1), 195. doi:10.1186/s12936-018-2353-y
- Mouchet, J. (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*: John Libbey Eurotext.
- Mugenzi, L. M., Akosah-Brempong, G., Tchouakui, M., Menze, B. D., Tekoh, T. A., Tchoupo, M., . . . Osae, M. (2022). Escalating pyrethroid resistance in two major malaria vectors *Anopheles funestus* and *Anopheles gambiae* (sl) in Atatam, Southern Ghana. *BMC infectious diseases*, *22*(1), 799.
- Mulamba, C., Riveron, J. M., Ibrahim, S. S., Irving, H., Barnes, K. G., Mukwaya, L. G., . . . Wondji, C. S. (2014). Widespread pyrethroid and DDT resistance in the major malaria

- vector *Anopheles funestus* in East Africa is driven by metabolic resistance mechanisms. *PLoS One*, 9(10), e110058. doi:10.1371/journal.pone.0110058
- Nguiffo-Nguete, D., Mugenzi, L. M., Manzambi, E. Z., Tchouakui, M., Wondji, M., Tekoh, T., . . . Wondji, C. S. (2023). Evidence of intensification of pyrethroid resistance in the major malaria vectors in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Scientific Reports*, 13(1), 14711.
- O'Reilly, A. O., Khambay, B. P., Williamson, M. S., Field, L. M., Wallace, B., & Davies, T. E. (2006). Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal*, 396(2), 255-263.
- Odero, J. O., Nambunga, I. H., Masalu, J. P., Mkandawile, G., Bwanary, H., Hape, E. E., . . . Okumu, F. O. (2024). Genetic markers associated with the widespread insecticide resistance in malaria vector *Anopheles funestus* populations across Tanzania. *Parasit Vectors*, 17(1), 230. doi:10.1186/s13071-024-06315-4
- Perugini, E., Pichler, V., Guelbeogo, W. M., Micocci, M., Poggi, C., Manzi, S., . . . Pombi, M. (2024). Longitudinal survey of insecticide resistance in a village of central region of Burkina Faso reveals co-occurrence of 1014F, 1014S and 402L mutations in *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis*. *Malaria journal*, 23(1), 250.
- Petersen, M., & Wengel, J. (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol*, 21(2), 74-81. doi:10.1016/S0167-7799(02)00038-0
- Pietra, Y., Procacci, P., Sabatinelli, G., Kumlien, S., Lamizana, L., & Rotigliano, G. (1991). Impact de l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine sur le paludisme dans une zone rurale de haute transmission au Burkina Faso. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 84(4), 375-385.
- PNLP. (2022). <Profil Entomologique\_2021-FINAL\_9Nov21\_ANK.pdf>.
- Pruss-Ustun, A., & Corvalan, C. (2007). How much disease burden can be prevented by environmental interventions? *Epidemiology*, 18(1), 167-178. doi:10.1097/01.ede.0000239647.26389.80
- Rauh, J. J., Holyoke, C. W., Kleier, D. A., Presnail, J. K., Benner, E. A., Cordova, D., . . . Baylis, H. A. (1997). Polycyclic dinitriles: a novel class of potent GABAergic insecticides provides a new radioligand, [3 H] BIDN. *Invertebrate Neuroscience*, 3, 261-268.

- Reid, M. C., & McKenzie, F. E. (2016). The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. *Malaria journal*, *15*, 1-8.
- Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and Convergence of Sodium Channel Mutations Involved in Resistance to Pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol*, *106*(3), 93-100. doi:10.1016/j.pestbp.2013.02.007
- Riveron, J. M., Irving, H., Ndula, M., Barnes, K. G., Ibrahim, S. S., Paine, M. J., & Wondji, C. S. (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*(1), 252-257.
- Riveron, J. M., Yunta, C., Ibrahim, S. S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B. D., . . . Albert, A. (2014). A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome biology*, *15*, 1-20.
- Robert, V., & Carnevale, P. (2009). *Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*: IRD Éditions.
- Rodhain, F., & Perez, C. (1985). *Precis d'entomologie medicale et veterinaire; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs*.
- Rubert, A., Guillon-Grammatico, L., Chandénier, J., Dimier-Poisson, I., & Desoubieux, G. (2016). Insecticide resistance in *Anopheles* mosquitoes : additional obstacles in the battle against malaria. *Med Sante Trop*, *26*(4), 423-431. doi:10.1684/mst.2016.0634
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual 3rd ed* Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor: NY.
- 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. *Malar J*, *7*, 163. doi:10.1186/1475-2875-7-163
- Schleier III, J. J., & Peterson, R. K. (2011). Pyrethrins and pyrethroid insecticides. *Green trends in insect control*, *11*, 94-131.
- Sighomnou, D. (2004). Analyse et redéfinition des régimes climatiques et hydrologiques du Cameroun: perspectives d'évolution des ressources en eau. *These doct Etat Univ Yaoundé I, Cameroun*.

- Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S., Cox-Singh, J., . . . Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*, 363(9414), 1017-1024. doi:10.1016/S0140-6736(04)15836-4
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294-302.
- Spillings, B. L., Brooke, B. D., Koekemoer, L. L., Chipwanya, J., Coetzee, M., & Hunt, R. H. (2009). A new species concealed by Anopheles funestus Giles, a major malaria vector in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 81(3), 510-515.
- Steketee, R. W., Choi, M., Linn, A., Florey, L., Murphy, M., & Panjabi, R. (2021). World Malaria Day 2021: commemorating 15 years of contribution by the United States President's malaria initiative. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 104(6), 1955.
- Suchel, J. (1987). Les climats du Cameroun (these d'É tat). *Université de Bordeaux III*, 1186.
- Swierczynski, G., & Gobbo, M. (2008). Atlas of Human Malaria (Atlante della Malaria Umana). *Journal of Travel Medicine*, 15(2), 143-144. doi:10.1111/j.1708-8305.2008.00196.x
- Tanya L Russell, K. S., Thomas R Burkot. (2022). PacMOSSI-SOP\_Larval-sampling-Anopheles.
- Tchouakui, M., Mugenzi, L. M., D. Menze, B., Khaukha, J. N., Tchapgá, W., Tchoupo, M., . . . Wondji, C. S. (2021). Pyrethroid resistance aggravation in Ugandan malaria vectors is reducing bednet efficacy. *Pathogens*, 10(4), 415.
- Tene-Fossog, B., Fotso-Toguém, Y. G., Amvongo-Adjia, N., Ranson, H., & Wondji, C. S. (2022). Temporal variation of high-level pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles gambiae s.l. in Yaounde, Cameroon, is mediated by target-site and metabolic resistance. *Med Vet Entomol*, 36(3), 247-259. doi:10.1111/mve.12577
- Townson, H., Nathan, M., Zaim, M., Guillet, P., Manga, L., Bos, R., & Kindhauser, M. (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(12), 942-947.
- Vectorlink, T. P. (2022). <Entomological-Monitoring-Report-Cameroon-2021.pdf>.
- 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. doi:10.1016/j.pestbp.2012.05.008

- Weill, M., Duron, O., Labbe, P., Berthomieu, A., & Raymond, M. (2003). [Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*]. *Med Sci (Paris)*, *19*(12), 1190-1192. doi:10.1051/medsci/200319121190
- WHO. (2017). *World malaria day 2017: malaria prevention works, let's close the gap*. Retrieved from
- WHO. (2018). *High burden to high impact: a targeted malaria response*. Retrieved from
- WHO. (2023). *World malaria report 2023*: World Health Organization.
- Williams, J., Cowlishaw, R., Sanou, A., Ranson, H., & Grigoraki, L. (2022). In vivo functional validation of the V402L voltage gated sodium channel mutation in the malaria vector *A. gambiae*. *Pest Manag Sci*, *78*(3), 1155-1163. doi:10.1002/ps.6731
- Wondji, C. S., Coleman, M., Kleinschmidt, I., Mzilahowa, T., Irving, H., Ndula, M., . . . Hemingway, J. (2012). Impact of pyrethroid resistance on operational malaria control in Malawi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(47), 19063-19070. doi:10.1073/pnas.1217229109
- 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 Biochem Mol Biol*, *41*(7), 484-491. doi:10.1016/j.ibmb.2011.03.012
- Wondji, C. S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N. F., Collins, F. H., Hunt, R. H., . . . Ranson, H. (2009). Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res*, *19*(3), 452-459. doi:10.1101/gr.087916.108
- Wood, O., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L., & Brooke, B. (2010). Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & vectors*, *3*, 1-7.
- Xu, J., Bonizzoni, M., Zhong, D., Zhou, G., Cai, S., Li, Y., . . . Sheen, R. (2016). Multi-country survey revealed prevalent and novel F1534S mutation in voltage-gated sodium channel (VGSC) gene in *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(5), e0004696.
- Zhou, Y., Fu, W.-B., Si, F.-L., Yan, Z.-T., Zhang, Y.-J., He, Q.-Y., & Chen, B. (2019). UDP-glycosyltransferase genes and their association and mutations associated with pyrethroid resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Malaria journal*, *18*, 1-17.

# ANNEXES


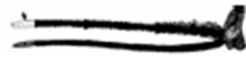

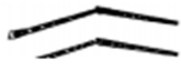

## Annexe 1 : Clés d'identification des anophèles

### CLES DES ANOPHELES VECTEURS MAJEURS AU CAMEROUN (adultes)



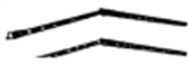





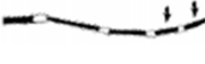



#### CARACTERES COMMUNS

- Abdomen SANS touffes d'écailles 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

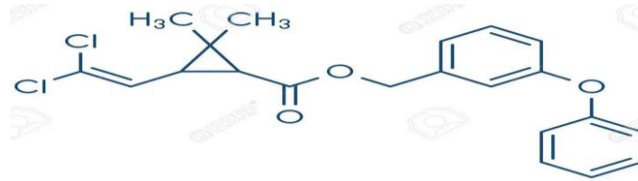
1. - Palpe entièrement noire .....*An. obscurus* (non vector)   
 - Palpe avec bandes pâles ⇨ 2
2. - Palpe avec une seule bande pâle sur l'apex ..... *An. nili*   
 - Palpe avec plus d'une bande pâle ⇨ 3
3. - Pattes entièrement noires ..... *An. funestus*   
 - Pattes pas complètement noires ⇨ 4
4. - Pattes tachetées ..... *A. gambiae* s.l.   
 - Pattes avec bandes pâles sur l'apex de chaque tarse ..... *An. m. moucheti* 

#### AUTRES CRITERES BIOMETRIQUES

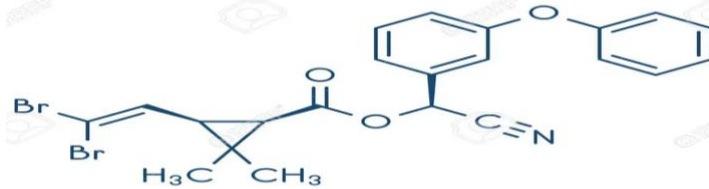
|                          | palpe   | aile  | patte   |
|--------------------------|---|---|---|
| - <i>A. gambiae</i> s.l. |  |  |  |
| - <i>An. funestus</i>    |  |  |  |
| - <i>An. moucheti</i>    |  |  |  |
| - <i>An. nili</i>        |  |  |  |

Source : Coetzee, M., 2020. Key to the females of Afrotropical Anopheles mosquitoes (Diptera: Culicidae). Malar. J. 19, 70. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3144-9>

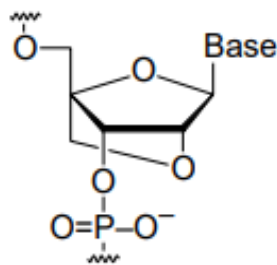
**Annexe 2 : Structure chimique et mécanisme d'action des pyréthrinoïdes, de l'acide nucléique verrouillé**



**Molécule chimique d'insecticide de perméthrine**  
(Source : <https://fr.123rf.com/clipart-vecteurs/>)

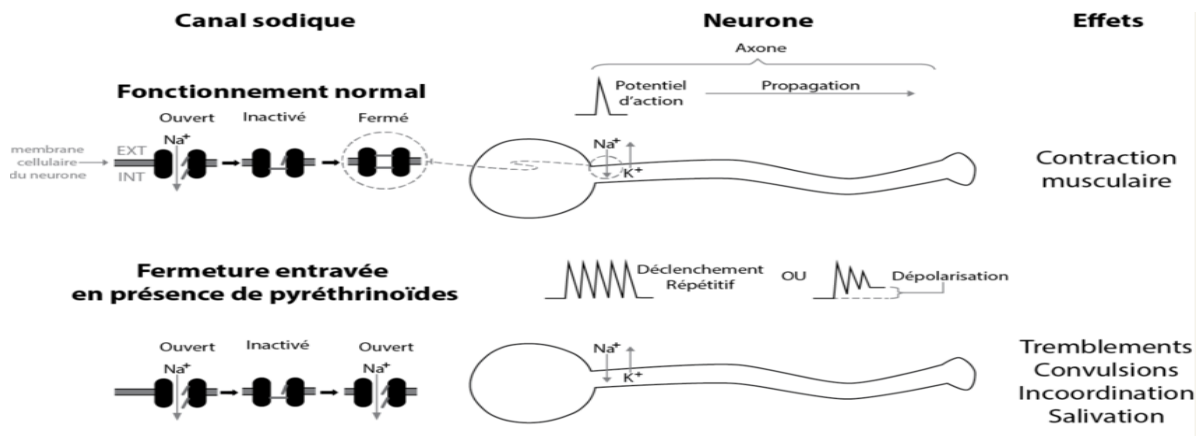


**Molécule chimique d'insecticide de deltaméthrine**  
(Source : <https://fr.123rf.com/clipart-vecteurs/>)



**LNA definition:** An oligonucleotide that contains one or more LNA monomer(s) [2'-O,4'-C-methylene-β-D-ribofuranosyl monomer(s)]

**La structure chimique et la définition de l'acide nucléique verrouillé (LNA)**  
(Source : Michael Petersen & Jesper Wengel, 2003)



**Mécanisme d'action de pyréthrinoïdes**

(Source : Research Gate, Mode d'action des pyréthrinoïdes sur les neurones. | Download Scientific Diagram )

### Annexe 3 : Clairance éthique

## 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° 2021/07/1379/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 28 juillet 2021

[setcominae@yahoo.com](mailto:setcominae@yahoo.com)

### CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session extraordinaire du 18 mai 2021, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Etude de l'impact de la résistance aux insecticides sur les outils de lutte antivectorielle chez les vecteurs du paludisme au Cameroun à travers les cages pièges**» soumis par le **Professeur WONDJI Charles**, Investigateur Principal, Centre de Recherche des Maladies Infectieuses.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est d'établir les bases moléculaires de la super-résistance aux insecticides et d'évaluer son influence des outils de lutte antivectorielle et la transmission du paludisme. La procédure de l'étude est bien documentée et claire. Les risques liés à l'étude sont précisés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. Les notices 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



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.